

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTERES FOSFATO CON PARTICIPACIÓN DE  
COMPLEJOS DE LANTÁNIDOS CON AMINOALCOHOLES**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

ANTONIO CALDERÓN COLÍN



TUTOR: ANATOLI K. IATSIMIRSKI

AÑO: 2005

M: 350379



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE  
PRIMER VOCAL  
SEGUNDO VOCAL  
TERCER VOCAL  
SECRETARIO  
PRIMER SUPLENTE  
SEGUNDO SUPLENTE

Dra. Silvia Elena Castillo Blum  
Dr. Cecilio Álvarez Toledano  
Dr. Guillermo Mendoza Díaz  
Dra. Laura María Gasque Silva  
Dra. Guadalupe Bárbara Gordillo Román  
Dra. Verónica García Montalvo  
Dra. Mónica Mercedes Moya Cabrera

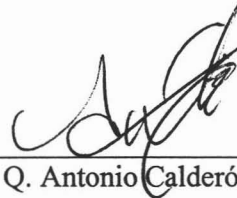
Asesor



---

Dr. Anatoli K. Iatsimirski

Sustentante



---

Q. Antonio Calderón Colín

Ante la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Antonio Calderón Colín

FECHA: 14 octubre 2005

FIRMA: 

## **Agradecimientos**

Al doctor Anatoli Iatsimirski, por su constante dirección y apoyo incondicionales.

A DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM) por el apoyo económico para la realización de este trabajo mediante el proyecto DGAPA-PAPIIT IN208901.

Al CONACYT y a la DGEP, por las becas otorgadas durante mis estudios de maestría y doctorado.

Al doctor Alexander Dikiy, por su colaboración en los experimentos de RMN y su ayuda en la interpretación de los mismos.

Al departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la UNAM.

A la UNAM.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio 213 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

## **1. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

$k_{obs}$	constante de velocidad observada
$k_{cat}$	constante catalítica
$K_M$	constante de Michaelis
$t_{1/2}$	tiempo de vida media
$S_N1$	sustitución nucleofílica de primer orden
$s^s pH$	valor de pH medido en el disolvente "s" con un electrodo calibrado en el disolvente "s"
$K_{PS}$	constante de producto de solubilidad
RMN	resonancia magnética nuclear
$\delta$	desplazamiento químico
$\epsilon$	absortividad molar
$l$	longitud de paso óptico
BNPP	<i>bis</i> (4-nitrofenil)fosfato
MNPP	4-nitrofenil fosfato
NP	nitrofenolato
HPNPP	4-nitrofenil-2-hidroxipropil fosfato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosintrifosfato
ADP	adenosindifosfato
ApAp	adenil(3',5')adenosín fosfato
M	metal de transición
Ln	lantánido
L	ligante

Bicina, bic	<i>N,N-bis(2-hidroxietil)Glicina</i>
Tricina, tric	<i>N-tris(hidroximetil)metilglicina</i>
TES	ácido <i>N-[tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetansulfónico</i>
Tris	<i>tris(hidroximetil)Aminometano</i>
Bis-Tris	<i>bis[2-hidroxietil]iminotris-[hidroximetil]metano</i>
Bis-Tris-Propano, BTP	<i>1,3-bis[tris(hidroximetil)metil-amino]propano</i>
Gly	glicina
Glygly	glicilglicina
ADA	ácido <i>N-carbamoilmetil-iminodiacético</i>
MES	ácido-2- <i>[N-morfolino]etansulfónico</i>
MOPSO	ácido-3- <i>[N-morfolino]-2-hidroxopropansulfónico</i>
ACES	ácido <i>N-(2-acetamido)-2-aminoetansulfónico</i>
BES	ácido <i>N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfónico</i>
HEPES	<i>N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido-2-etansulfónico]</i>
CyD	ciclodextrina
DOTA	ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético
[X]anoN <sub>Y</sub>	ciclo de X miembros con Y grupos -NH- en el ciclo
Cyclen	1,4,7,10-tetraazaciclododecano
tdci	1,3,5-tridesoxi-1,3,5-triamín- <i>cis</i> -inositol
phen	fenantrolina
trien	trimetiletilentetramina
bpy	bipiridina
trpy	terpiridina
CR	2,12-dimetil-3,7,11,17-tetraazabicyclo[11.3.1]heptadeca-1(17),2,11,13,15-pentano
NTA	nitrilotriacetato

## ÍNDICE

1. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	7
3.1 Ésteres de fosfato	7
3.2 Fosfoesterólisis no catalítica	9
3.3 Fosfoesterólisis enzimática	14
3.4 Fosfoesterólisis con cationes orgánicos	17
3.5 Mecanismos de fosfoesterólisis con iones metálicos	17
3.5.1 Hidrólisis de ácidos nucleicos	20
3.5.2 Hidrólisis de sustratos aromáticos activados	22
3.6 Fosfoesterólisis catalizada por lantánidos	26
3.7 Propiedades de los acuacaciones de los lantánidos	35
3.8 Bicina y ligantes similares	39
4. HIPÓTESIS	50
5. OBJETIVOS	51
6. PARTE EXPERIMENTAL	53
6.1 Sustancias	53
6.2 Metodologías experimentales y equipo utilizado	54
6.2.1 Preparación de disoluciones	54
6.2.2 Estandarización de disoluciones	54
6.2.3 Titulaciones potenciométricas	56
6.2.4 Titulaciones espectrofotométricas	57
6.2.5 Titulaciones por RMN de $^1\text{H}$	57
6.2.6 Cinéticas	58
6.2.7 Modelos y cálculos matemáticos	59
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
7.1 Estudios potenciométricos	60
7.1.1 Bicina	60
7.1.2 Lantano-Bicina	62
7.1.3 Bicina con otros lantánidos	68
7.1.4 Tricina con los lantánidos	70

7.2 Estudios cinéticos	72
7.2.1 Lantano-bicina	72
7.2.1.1 Hidrólisis de BNPP	72
7.2.1.2 Hidrólisis del monoéster	84
8.2.2 Ln(III) - tricina	87
7.2.3 Ln(III) - TES	91
7.2.4 Y(III) - bicina	92
7.3 Estudios de resonancia magnética nuclear	93
7.3.1 Bicina	93
7.3.2 Lantano – bicina (5 mM : 5 mM)	96
7.3.3 Lantano – bicina (5 mM : 2.5 mM)	104
7.3.4 Neodimio – bicina	108
7.4 Estudios de espectrofotometría	113
8. CONCLUSIONES	118
9. REFERENCIAS	120
10. APÉNDICES	129
10.1 Modelos cinéticos	129
10.1.1 Modelo de velocidades iniciales	129
10.1.2 Constantes de primer orden	131
10.1.3 Constantes de hidrólisis consecutiva de BNPP	133
10.1.4 Modelo de Michaelis – Menten	136
10.2 Modelo para el desplazamiento químico de las señales de la bicina en función del pH	138
10.3 Modelo para la absorbancia del nitrofenolato en función del pH	140
10.4 Constantes de desprotonación de complejos en Hyperquad	142
10.5 Titulaciones Hyperquad	144
10.5.1 Bicina	144
10.5.2 Lantano-bicina	145
10.5.3 Pr, Nd, y Eu - bicina	151
10.5.4 Tricina	155
10.5.5 Lantánidos – Tricina	156
10.6 Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis	158
10.7 Efecto de la fuerza iónica en la velocidad de hidrólisis	160
10.7.1 Sistemas con bicina	160
10.7.2 Sistemas con tricina	162
10.8 Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de hidrólisis	163



## RESUMEN

Las titulaciones potenciométricas de *N,N*-bis(2-hidroxietil) glicina (bicina, Hbic) en presencia de cationes de lantánidos(III) (lantano, praseodimio, neodimio y europio), en valores de pH hasta ca. 9.5 indican la presencia de dos tipos de complejos hidroxobinucleares ( $\text{Ln}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  y  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ ), además de los complejos  $\text{Ln}(\text{bic})_2^{2+}$  y  $\text{Ln}(\text{bic})_2^+$  previamente informados, que predominan en valores de pH menores a 8.

Por medio de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de mezclas lantano(III)-bicina en  $\text{D}_2\text{O}$ , se determina que la formación de los complejos con bicina es lenta en la escala de tiempo de la RMN y se confirma la formación de complejos hidroxobinucleares y no alcoxobinucleares en medios básicos.

La formación de un hidroxobinucleares complejo distinto con exceso de metal se confirma con estudios de espectroscopía electrónica del sistema neodimio(III)-bicina en la región hipersensible (550 - 610 nm) con diferentes proporciones metal-ligante.

Los complejos binucleares hidroxobinucleares son estables a valores de pH superiores a 9 y obedecen al siguiente orden de estabilidad:  $\text{La} < \text{Pr} \approx \text{Nd} < \text{Eu}$ . Éstos muestran una alta actividad catalítica en la hidrólisis del bis(4-nitrofenil)fosfato (BNPP) a temperatura ambiente. Al comparar los diagramas de distribución de especies y los perfiles de actividad catalítica dependientes del pH, se deduce que el complejo activo es  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  y el mecanismo es de tipo Michaelis-Menten.

Para todos los lantánidos estudiados, las constantes de velocidad y las de Michaelis están en el intervalo  $0.002 - 0.004 \text{ s}^{-1}$  y  $0.35 - 1.5 \text{ mM}$ , respectivamente.

El tiempo de vida media de la hidrólisis del BNPP se reduce de 2000 años a cerca de 10 minutos a  $25^\circ\text{C}$  y pH 9.2 en presencia de  $\text{La(III)}$  5 mM y bicina 2.5 mM.

Con fines de comparación, también se hicieron estudios cinéticos y potenciométricos de *N*-tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina, Htric). El comportamiento de este ligante es similar al de la bicina, con la diferencia de que en este caso además de los hidroxobinucleares complejos identificados para la bicina, se detecta la presencia de  $\text{Ln}(\text{tric})(\text{OH})^+$ . De los tres hidroxobinucleares complejos, para lantano, sólo  $\text{Ln}_2(\text{tric})_2(\text{OH})_4$  es inactivo. Para neodimio los tres hidroxobinucleares complejos son activos y con praseodimio y europio sólo  $\text{Ln}_2(\text{tric})(\text{OH})_4^+$  no presenta actividad catalítica.

El *N*-[tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetánsulfonato (TES) no estabiliza a los lantánidos estudiados, por lo que sólo con grandes excesos de este ligante se tienen disoluciones estables y actividad catalítica apreciable. Lo anterior no justifica un estudio más detallado de este sistema.

## **ABSTRACT**

Potentiometric titrations of *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine (bicine, Hbic) in the presence of Ln(III) cations (Ln = La, Pr, Nd and Eu) in the pH range extended to *ca.* 9.5 reveal formation of two types of binuclear hydroxo complexes  $\text{Ln}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  and  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  in addition to previously reported mononuclear mono- and bis-complexes  $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$  and  $\text{Ln}(\text{bic})_2^+$ , which predominate at pH below 8.

$^1\text{H}$  NMR titrations of La(III)-bicine mixtures in  $\text{D}_2\text{O}$  show that the complex formation with bicine is slow in the NMR time scale and confirm formation of hydroxide rather than alkoxide complexes in basic solutions.

Formation of a different type of hydroxide species under conditions of an excess of metal over ligand is confirmed by studying the absorption spectra of the Nd(III)-bicine system in the hypersensitive region.

The binuclear hydroxide complexes are predominant species at pH above 9 and their stabilities increase in the order  $\text{La} < \text{Pr} \approx \text{Nd} < \text{Eu}$ . They show fairly high catalytic activity in the hydrolysis of bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) at room temperature. Comparison of concentration and pH-dependences of the reaction rates with the species distribution diagrams shows that the catalytic hydrolysis of BNPP proceeds via a Michaelis-Menten type mechanism, which involves the  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  complex as the reactive species.

The values of the catalytic rate constants and the Michaelis constants are in the range  $0.002 - 0.004 \text{ s}^{-1}$  and  $0.35 - 1.5 \text{ mM}$  respectively for all lanthanides studied.

The half-life for the hydrolysis of BNPP is reduced from 2000 years to *ca.* 10 min at  $25^\circ\text{C}$  and pH 9.2 in the presence of 5 mM La(III) and 2.5 mM bicine

For comparison, kinetic and potentiometric studies were performed with *N*-tris(hydroxymethyl)methylglycine (tricine, Htric) as a ligand. This ligand behaves in a similar way as bicine does. Besides the hydroxo-complexes found for bicine, the complex  $\text{Ln}(\text{tric})(\text{OH})^+$  is found in this system. With lanthanum only  $\text{Ln}_2(\text{tric})_2(\text{OH})_4$  doesn't show hydrolytic activity. All three neodymium hydroxo-complexes show hydrolytic activity, and with praseodymium and europium only  $\text{Ln}_2(\text{tric})(\text{OH})_4^+$  isn't hydrolytically active.

The studied lanthanides are poorly stabilized by *N*-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethanesulfonate (TES). Stable solutions and reliable kinetic data can only be obtained with a great excess of this ligand. A more detailed study of this system is not justified therefore.

## 2. INTRODUCCIÓN

El interés en el estudio de la ruptura catalítica de los diésteres del ácido fosfórico se despertó hace aproximadamente 20 años debido a la importancia de este proceso para la fragmentación de los ácidos nucleicos, que son esenciales para la vida por la información genética que guardan. Tanto el ADN, que guarda la información genética y la libera mediante la transcripción, como el ARN, que está relacionado con el mecanismo de traducción son especies cinéticamente estables, aunque termodinámicamente el equilibrio está favorecido hacia los productos de hidrólisis. Debido a la gran estabilidad de los diésteres de fosfato ante la hidrólisis, éstos fueron escogidos como puentes para guardar esta información genética. Por ejemplo, el ADN tiene un tiempo de vida media estimado entre 130 000 años a pH neutro y 25 °C<sup>1</sup> y 200 millones de años en condiciones fisiológicas<sup>2</sup> (ver figura 1). El ARN, a pesar de ser una molécula activada por el hidroxilo en la posición 2', tiene un tiempo de vida media de 100 años aproximadamente<sup>2</sup>. Aunque su estabilidad es muchas veces menor que la del ADN, su función en el organismo es efímera, tanto así, que son necesarias enzimas para degradarlo y metabolizar los nucleótidos una vez desempeñada su función.

Aunque la conservación del material genético es de vital importancia, existe un grupo de enzimas encargadas de destruir a los biopolímeros ADN y ARN. A estas enzimas se les conoce como nucleasas. Sus funciones son, entre otras:

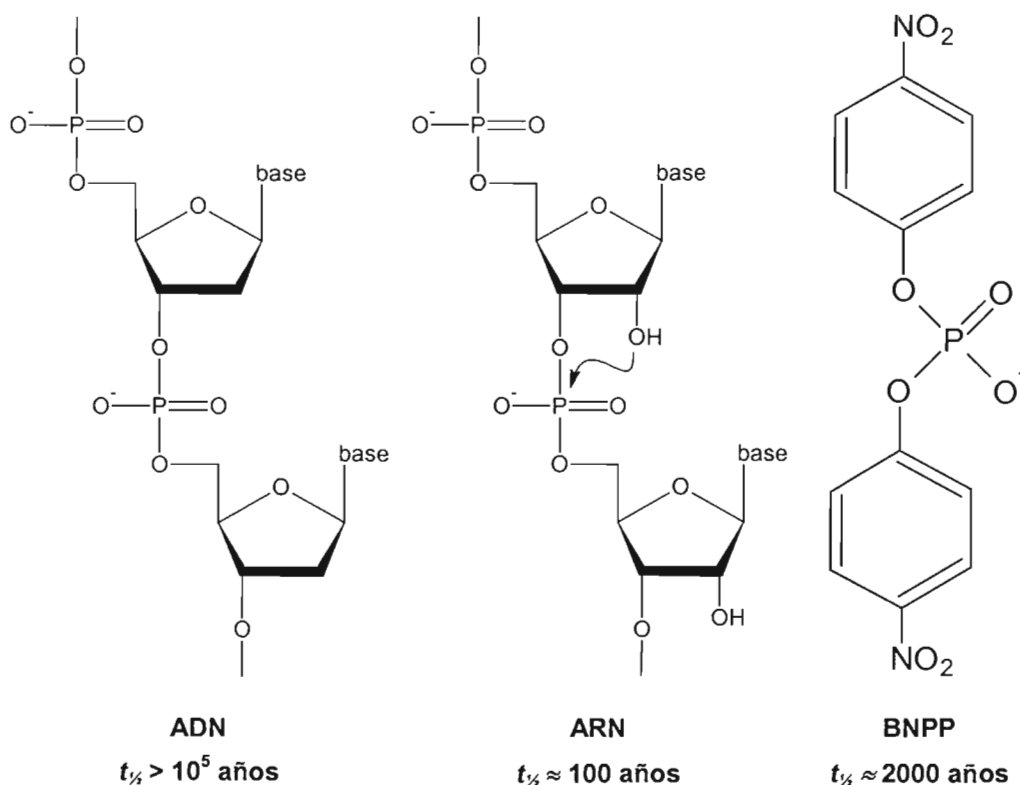
- Eliminación de agentes patógenos. Las *enzimas de restricción* destruyen al ADN del agente patógeno, mediante el proceso de *restricción*. El ADN del organismo huésped no es afectado, ya que ha sido modificado previamente en los sitios que reconoce la enzima de restricción por las *metilasas modificadoras*, que inducen metilaciones en ciertos residuos de adenina. A este proceso se le conoce como *modificación*.<sup>3</sup> Los virus tienen un mecanismo similar para destruir el ADN del huésped después de la infección.

- Reparación de ADN. Cuando hay un error en una hebra de ADN, el primer paso para su reparación es la ruptura de la cadena por una *endonucleasa*, luego la *ADN polimerasa I* completa la secuencia, una *exonucleasa* corta el fragmento sobrante y finalmente la *ADN ligasa* cierra la cadena.<sup>4</sup>
- Recombinación de ADN. Es el intercambio de genes entre cromosomas, en este mecanismo actúa una *endonucleasa*, la *ADN polimerasa* y la *ADN ligasa*.<sup>3</sup>

Debido a sus aplicaciones en bioquímica y biología molecular, en los últimos 20 años ha habido numerosos grupos interesados en el estudio y desarrollo de nucleasas artificiales. Una razón importante para realizar estos estudios es que a partir de ellos podemos entender mejor los mecanismos catalíticos de las nucleasas naturales. Además, si se desarrollan nucleasas artificiales, éstas pueden ser utilizadas en terapia genética y en procesos de clonación, si son específicas. Los sistemas no específicos también son de utilidad, por ejemplo para eliminar al ácido nucleico unido a una proteína antes de realizar el proceso de "footprinting", ya que de otro modo se pierde resolución debido al tamaño de la molécula. También pueden ser utilizadas para estudiar ácidos nucleicos altamente estructurados. Otra aplicación es la hidrólisis de algunos ésteres de fosfato y sus derivados que son utilizados como pesticidas y armas químicas<sup>5</sup>. El tratamiento para pacientes intoxicados con gas *sarin* y *parathion* es la administración de yoduro de pralidoxima, el cual reactiva a la *acetilcolinesterasa*, hidrolizando la unión fosfato-receptor<sup>6</sup>.

Las nucleasas artificiales que han sido desarrolladas tienen actividad muy variada, las más activas, sin embargo, involucran un mecanismo de acción redox o de radicales libres, por ejemplo cobre(I)-1,10 fenantrolina<sup>7</sup>, por lo que no siempre son útiles para manipulación genética o uso terapéutico. Para que lo sean, generalmente es necesario que el mecanismo de acción sea hidrolítico, el cual involucra un ataque nucleofílico. Este tipo de mecanismo y los principales agentes hidrolíticos serán discutidos en los antecedentes.

Por la dificultad y costo de utilizar ácidos nucleicos y por la ventaja de que el producto de hidrólisis es colorido, se utiliza como modelo de estudio al *bis(p-nitrofenil)fosfato* (BNPP), que es una molécula activada por un grupo nitro (ver figura 1). A pesar de esta activación, su tiempo de vida media en agua a 50 °C es de 53 años<sup>8</sup> y 2000 años a 20°C (estabilidad cercana a la del ARN).



**Figura 1. Estructura y tiempos de vida media de algunos fosfodiésteres.**

Se ha encontrado que los lantánidos trivalentes muestran actividades altas en la hidrólisis de ésteres de fosfato, por lo que numerosos grupos han desarrollado y estudiado gran variedad de sistemas.<sup>9</sup> En general, el estudio de la hidrólisis promovida por lantánidos presenta varias dificultades. Los acuacationes de  $\text{Ln}^{3+}$  tienen valores de  $\text{pK}_a$  altos, alrededor de 9 y sólo se forman cantidades apreciables de sus hidroxocomplejos (presumiblemente las especies activas) en disoluciones básicas. Por otro lado, los hidróxidos y algunas sales de  $\text{Ln}^{3+}$  tienen productos de solubilidad pequeños  $10^{-20} - 10^{-22} \text{ mol}^4 \text{ L}^{-4}$  y se forman fácilmente.<sup>10</sup>

Una posible solución a estos problemas puede ser el uso de ligandos apropiados que puedan proteger a los cationes  $\text{Ln}^{3+}$  de la precipitación sin disminuir mucho su electrofilia, la cual es necesaria para generar al  $\text{OH}^-$  coordinado y activar al sustrato. Se han informado resultados con este tipo de sistemas sin observar precipitación en las disoluciones básicas<sup>11</sup>, obteniéndose un incremento de 100 veces en la actividad al ir de  $\text{pH}=7$  a  $\text{pH}=9.5$ . Schneider y sus colaboradores<sup>12</sup> han probado los efectos de varios ligandos en la reactividad hidrolítica de  $\text{Eu}^{3+}$  hacia BNPP a  $\text{pH}=7$ . Con este sustrato se encontró que las aminas, los aminoéteres y los polialcoholes producen resultados pobres y los ligandos de ácidos carboxílicos inhiben

fuertemente la hidrólisis. De sus resultados se puede concluir que los ligantes neutros como aminoalcoholes pueden funcionar como estabilizadores no desactivantes de los cationes de  $\text{Ln}^{3+}$  a valores elevados de pH.

Algunos de los llamados *buffers* biológicos están constituidos precisamente de aminas polihólicas y en el presente proyecto se pretende utilizarlos para estabilizar complejos de lantánidos a valores altos de pH y probar su eficiencia como promotores de la hidrólisis de BNPP. Aunque estos compuestos presentan un grupo aniónico, se espera que esto sirva para aumentar la estabilidad de los complejos y que no desactive la capacidad hidrolítica de éstos.



### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 ÉSTERES DE FOSFATO

Por analogía con los ácidos carboxílicos, a los derivados sustituidos del ácido fosfórico se les conoce como ésteres de fosfato. El fósforo tiene carga parcial positiva, al igual que en los ésteres el átomo de carbono del carbonilo. (Ver la figura 2).

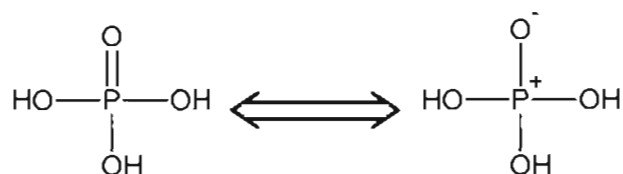


Fig. 2. Estructuras mesoméricas del ácido fosfórico.

El grupo fosfato es la especie binaria más estable de fósforo(V) y oxígeno. Tiene cuatro átomos de oxígeno, carga 3- y geometría tetraédrica. La geometría tetraédrica se explica con la hibridación  $sp^3$  de los orbitales del fósforo. El carácter de enlace doble P=O se explica por medio de transferencia de carga  $\pi$  del oxígeno al fósforo ( $p \rightarrow d$ ), mientras que el enlace  $\sigma$  es dativo o de coordinación del fósforo al oxígeno ( $sp^3 \rightarrow sp^2$ ).

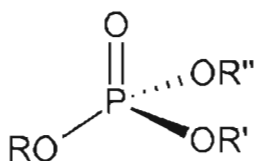


Fig. 3. Grupo fosfato.

La unión consecutiva de cada uno de los tres átomos de oxígeno con valencia libre con un átomo de carbono (esterificación) nos da mono, di y triésteres de fosfato (ver figura 3). Los oxígenos no esterificados actúan como bases, y en agua tienen valores de  $pK_a$  según se muestra en la tabla 1.<sup>13</sup>

Tabla 1. Valores de  $pK_a$  de algunos ésteres fosfato.

	ácido fosfórico $R=R'=R''=H$	monoéster de fosfato $R=R'=H$ $R''=Me$	monoéster de fosfato $R=R'=H$ $R''=C_6H_5$	diéster de fosfato $R=H$ $R'=R''=Me$	diéster de fosfato $R=H$ $R'=R''=C_6H_5$
$pK_{a1}$	2.25	1.52	1.22	1.29	1.85
$pK_{a2}$	7.20	6.31	6.28	--	--
$pK_{a3}$	12.33	--	--	--	--

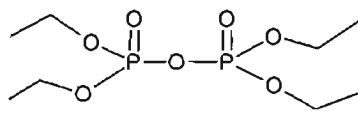
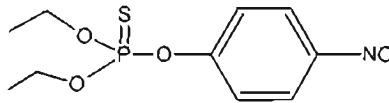
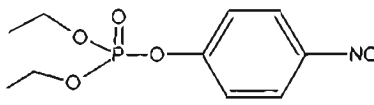
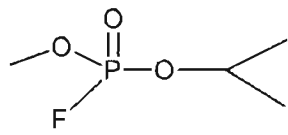
El grupo fosfato y sus ésteres son de vital importancia en los sistemas vivos. La energía necesaria para la vida proviene de los alimentos, la cual se conserva como adenosina trifosfato (ATP), sintetizada a partir de adenosina difosfato (ADP) y una fuente de fosfato.

La fosforilación reversible de proteínas en los grupos serina, treonina y tirosina (mediada por *fosfatasas* y *fosforilasas*) es determinante en muchas funciones celulares vitales, tales como metabolismo, control de crecimiento y regulación celular, respuesta inmune, diferenciación celular, organización estructural, respuestas al estrés y señalización para mantener la homeostasis natural de la célula.<sup>14</sup>

La función más interesante de los ésteres de fosfato, desde nuestro punto de vista es la función de puente que desempeñan en los ácidos nucleicos.

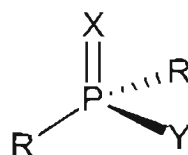
Como ya se mencionó en la introducción, en las células hay enzimas encargadas de hidrolizar a los ácidos nucleicos. Este proceso es importante en la reparación del ADN y en la eliminación de agentes patógenos, entre otros. Por lo anterior, en este trabajo nos interesa crear catalizadores químicos capaces de llevar a cabo esta función.

Además de sus aplicaciones en biología molecular, otra razón importante para hidrolizar ésteres de fosfato es que éstos han sido utilizados ampliamente como insecticidas en plantas. Como insecticidas el problema es que son *sistémicos* (la planta los absorbe y distribuye en todo su sistema) y son tóxicos para los mamíferos. Debido a esto son utilizados como armas químicas (agentes neurotóxicos). A continuación se muestran algunos ejemplos de insecticidas y agentes neurotóxicos (esquema 1).<sup>15</sup>

	<p style="text-align: center;"><b>HETP</b></p> <p>Primero en ser utilizado en agricultura (1942). Gracias al éxito obtenido con él, el desarrollo de insecticidas organofosforados creció de manera notable.</p>
	<p style="text-align: center;"><b>Parathion</b></p> <p>Remplazó a HETP por más difícil de hidrolizar, no muestra reactividad fosforilante <i>in vitro</i>. Toxicidad similar en insectos y mamíferos.</p>
	<p style="text-align: center;"><b>Paraoxon</b></p> <p>Forma activa del parathion, el cual se oxida en el organismo. Mucho más tóxico para mamíferos que para insectos.</p>
	<p style="text-align: center;"><b>Sarin</b></p> <p>Creado en Alemania (1938) como insecticida. Utilizado como arma química en la guerra de Iran-Irak y en los ataques terroristas de Japón 1994-1995.</p>

**Esquema 1. Ejemplos de Insecticidas y agentes neurotóxicos.**

La estructura general de estos agentes se muestra en la figura 4. El grupo R debe ser alcoxo o amino, X es oxígeno o azufre y Y es un buen grupo saliente aniónico.



**Fig 4. Agente neurotóxico.**

### 3.2 FOSFOESTERÓLISIS NO CATALÍTICA

La hidrólisis de los ésteres de fosfato puede llevarse a cabo mediante la ruptura de los enlaces P-O ó C-O. Lo anterior se puede discriminar mediante experimentos en agua enriquecida con  $^{18}\text{O}$ . Si el  $^{18}\text{O}$  aparece en el fosfato, la ruptura es en el enlace P-O. Si aparece en el alcohol producido, la ruptura es en el enlace C-O. Aunque en sistemas biológicos siempre se lleva a cabo la ruptura en el enlace P-O, en la hidrólisis no catalítica la ruptura del enlace C-O puede existir e incluso ser predominante en algunos casos.<sup>16</sup>

Por muchos años se consideró a la hidrólisis de monoésteres de fosfato como un proceso disociativo tipo  $S_N1$ . El paso rápido de la reacción sería el ataque del nucleófilo al anión metafosfato altamente inestable (figura 5).<sup>17</sup>

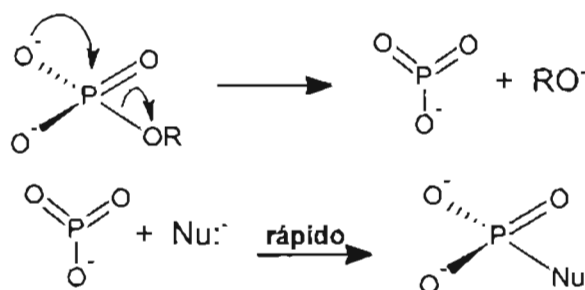


Fig. 5. Hidrólisis de un monoéster de fosfato por proceso disociativo.

Si este mecanismo es el único presente, la velocidad de hidrólisis no debe depender de la basicidad del nucleófilo, sin embargo, aunque de manera muy sutil, sí lo hace.<sup>18</sup> Lo anterior indica que el enlace con el nucleófilo ya se empezó a formar en el estado de transición.

El hecho de que los monoésteres quirales, al ser hidrolizados en agua, presenten inversión en vez de racemización, habla a favor de un mecanismo asociativo.<sup>19</sup> En disolventes orgánicos es más probable el mecanismo disociativo, ya que el medio no polar favorecería al monoanión metafosfato en relación con el monoéster dianiónico. De hecho se ha observado racemización en disolventes orgánicos polares.<sup>20</sup> A manera de conclusión puede decirse que estos mecanismos no pueden ser discriminados fácilmente.

La mayor reactividad de los monoésteres en forma monoaniónica con respecto a la de los diésteres y su menor sensibilidad con respecto a la basicidad del grupo saliente requieren de una explicación. El siguiente mecanismo (figura 6) puede proveerla. Este mecanismo también explica el máximo de velocidad de hidrólisis observado en valores de pH en los que la forma monoprotonada tiene la máxima abundancia.

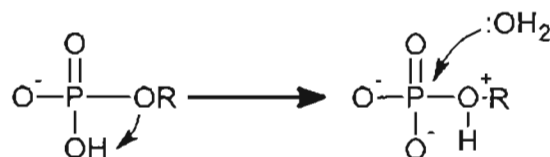


Fig. 6. Mecanismo de hidrólisis de un monoéster de fosfato por transferencia de protón.

La activación del grupo saliente se da mediante la transferencia intramolecular de un protón.<sup>21</sup> Un mecanismo alternativo sería el que se muestra en la figura 7:<sup>22</sup>

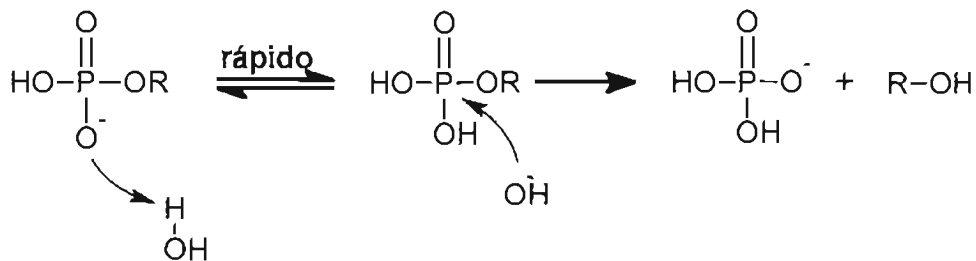


Fig. 7. Mecanismo de hidrólisis de un monoéster de fosfato por catálisis ácida del agua.

Sin embargo, el primer paso tiene una constante de equilibrio aproximada de  $10^{-14}$ , por lo que la constante de velocidad del segundo paso debería ser  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para explicar el valor de las constantes de velocidad observadas para diferentes grupos R. Sin embargo, esta constante de velocidad debería ser similar a la de hidrólisis alcalina del trimetilfosfato, por la analogía de  $\text{RO}(\text{HO})_2\text{PO}$  con  $(\text{MeO})_3\text{PO}$ . Esta constante tiene un valor de  $0.03 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Razón por la cual este mecanismo se descarta.

Para un dianión se propone el siguiente mecanismo (figura 8):

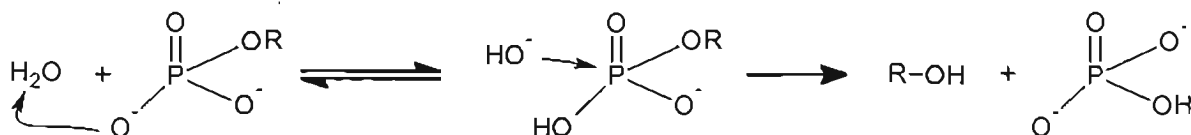


Fig. 8. Mecanismo propuesto para la hidrólisis acuosa de un monoéster de fosfato dianiónico.

Si se hace un análisis similar al del caso anterior, nuevamente la constante para la segunda etapa debe ser muy grande ( $3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  para  $\text{R} = 2,4\text{-dinitrofenilfosfato}$ ) pero la constante de velocidad para metil 2,4-dinitrofenilfosfato sólo vale  $0.028 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ . Esto nos indica que el modelo es incorrecto.<sup>23</sup>

Para di y triésteres se tiene el siguiente mecanismo (figura 9):

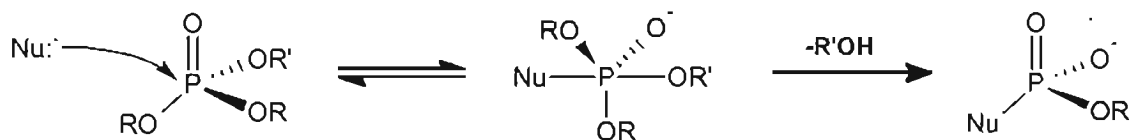


Fig. 9. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de di y triésteres de fosfato.

El intermediario pentacoordinado tiene al grupo entrante y al grupo saliente en posiciones axiales, con distancias al fósforo mayores que las de las posiciones ecuatoriales.<sup>17</sup>

En general la hidrólisis de fosfodiésteres es más lenta que la de los monoésteres. Los arílicos se hidrolizan con la ruptura del enlace P-O y los alquílicos con ruptura C-O. Los triésteres se hidrolizan más rápido que los monoésteres<sup>16</sup>, la hidrólisis básica rompe el enlace P-O y en la acuosa hay participación de la ruptura C-O.

Kirby y Younas estudiaron la velocidad de hidrólisis acuosa de diésteres activados (anillos aromáticos con grupos inductores de carga) como función de la basicidad del grupo saliente a 100 °C<sup>24</sup> ( $k$  en  $\text{min}^{-1}$ ).

La pendiente en la gráfica de Bronsted (ecuación 1) es -0.97 y la ordenada al origen es 1.57.

$$\log k = m \text{p}K_a + b$$

**Ecuación 1**

En el caso de los diésteres no activados, los valores de las constantes de velocidad no pueden ser medidos directamente, ya que se trata de reacciones muy lentas. Para calcularlos se recurre a extrapolaciones. Se estimaron las constantes de velocidad de hidrólisis del dimetilfosfato a 25 °C. En pH neutro, se rompe mayoritariamente el enlace C-O, con una constante de velocidad de  $1.6 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ . Para la hidrólisis alcalina, la constante de velocidad de segundo orden es  $3 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , se estima que el enlace C-O se rompe en un 90%, por lo que la constante de hidrólisis en el fósforo es de  $3 \times 10^{-12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Si la hidrólisis alcalina domina a pH 7, la constante de velocidad de primer orden observada es  $3 \times 10^{-19} \text{ s}^{-1}$ . Del valor anterior se propone un valor de tiempo de vida media de  $10^{11}$  años para la hidrólisis del ADN en condiciones fisiológicas.

En un diésterfosfato en el cual la ruptura C-O no es posible por efectos estéricos (figura 10), se obtiene una constante de velocidad de hidrólisis de segundo orden de  $10^{-15} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , extrapolada a 25 °C. Si a pH 7 domina la hidrólisis alcalina, esta tendría una constante de velocidad de  $10^{-22} \text{ s}^{-1}$ . Ahora el valor estimado para el tiempo de vida media de la hidrólisis del ADN en condiciones fisiológicas sería  $10^{14}$  años.<sup>25</sup>

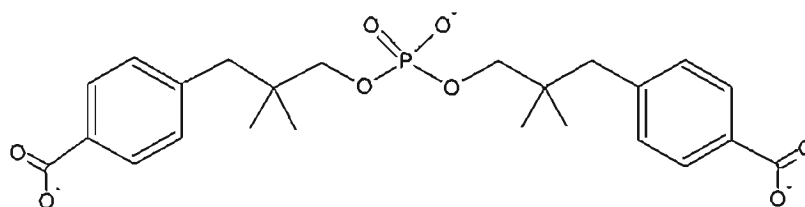


Fig. 10. Diésterfosfato en el cual la ruptura C-O no es posible por efectos estéricos.

Existen dos tipos de fosfodiésteres activados. Los  $\beta$ -hidroxialquildifosfatos (Fig. 11a) y los arilfosfatos con anillos activados (Fig. 11b).

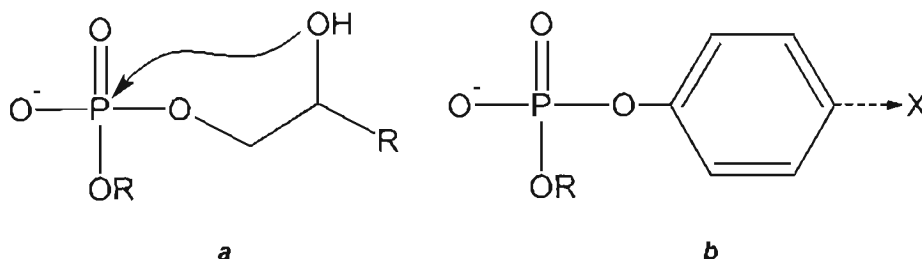


Fig. 11. Fosfodiésteres activados por los grupos  $\beta$ -hidroxialquilo (a) y arilfosfato con un anillo activado (b).

Los  $\beta$ -hidroxialquildifosfatos son activados debido al grupo hidroxilo en posición  $\beta$ , que actúa como nucleófilo intramolecular. Este tipo de activación es responsable de que el ARN sea muchas veces más fácil de hidrolizar que el ADN. En los ácidos nucleicos esta activación acelera  $\sim 10^6$  veces la hidrólisis y con sustratos más sencillos se observa un efecto similar.

Los fosfatos aromáticos pueden variar en su nivel de activación, dependiendo de los sustituyentes que tengan. La activación de estos sustratos se debe a que el sustituyente retira densidad electrónica del anillo, haciéndolo un mejor grupo saliente. Un activador clásico es el grupo nitro por la carga positiva sobre el átomo de nitrógeno. En la gráfica (Fig. 12) se muestra la gráfica de Brønsted de las catálisis básica y acuosa de algunos diésteres del tipo  $(RO)_2PO_2^-$ . (ecuación 1)

Las constantes son de segundo orden<sup>21</sup>. Para calcular las constantes de segundo orden de la hidrólisis acuosa, la constante de primer orden se dividió por 55.5 M, concentración aproximada del agua en medios acuosos.

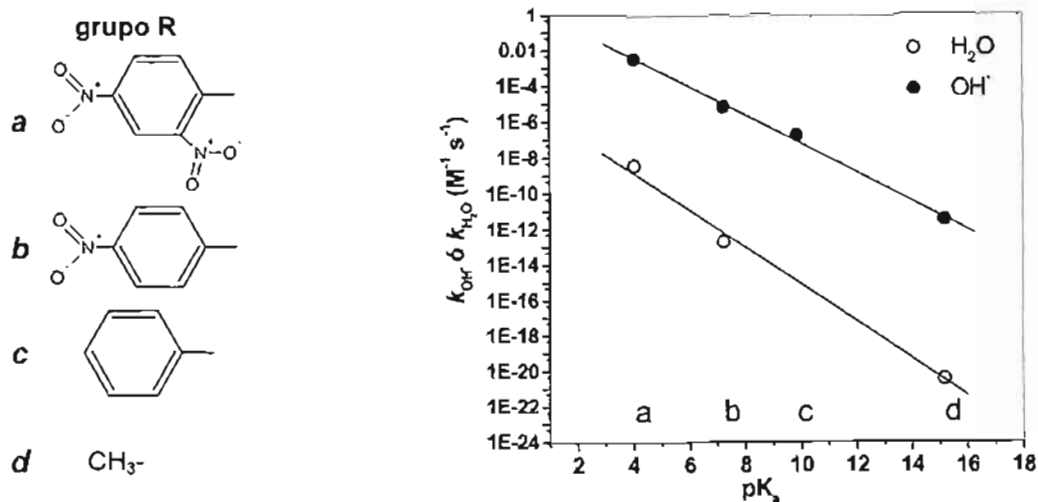


Fig. 12. Gráficas de Brønsted para fosfodiésteres con diferente activación por el grupo arilo.

La influencia del nucleófilo es notable, siendo las reacciones catalizadas con hidróxido casi seis órdenes de magnitud más rápidas que las catalizadas por agua. ( $b=0.74$  y  $-4.59$ , respectivamente).

Con respecto al grupo saliente, en ambos casos se observa una fuerte dependencia de la reactividad con la basicidad del mismo.

Para la hidrólisis acuosa la pendiente (ecuación 1) es  $-1.06 \pm 0.08$ . Este valor indica una dependencia muy grande con la basicidad del grupo saliente, lo cual se interpreta como que el estado de transición es principalmente disociativo o tardío (se parece más a los productos).

Con hidróxido el efecto es menos marcado, la reactividad es más alta y la dependencia con la basicidad del grupo saliente es menor ( $m=-0.80 \pm 0.03$ ). El intermediario es más temprano (principalmente asociativo), se parece más a los reactivos. En este caso la ruptura P-O contribuye menos al paso limitante.

### 3.3 FOSFOESTERÓLISIS ENZIMÁTICA

Las enzimas utilizan a los grupos funcionales de los aminoácidos y comúnmente a iones metálicos para acelerar las reacciones. Para lo anterior, en el caso de las reacciones de fosfoesterólisis, las enzimas disminuyen la energía de activación mediante uno o más de los siguientes procesos: catálisis básica y ácida generales, estabilización electrostática de cargas en intermediarios y estados de transición, estabilización de grupos salientes y aumento de concentraciones efectivas.



A las enzimas encargadas de hidrolizar monoésteres de fosfato se les conoce como fosfatasa. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 2 (a-d). Como puede observarse, éstas tienen dos metales en su sitio activo.

Tabla 2. Ejemplos de algunos grupos de fosfohidrolasas con cationes metálicos en su sitio activo.<sup>26</sup>

	Enzimas	Sustrato	Sitio activo	M-M (Å)
a	Fosfatasa púrpura ácida	monoésteres	$\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}$	3.5
b	Fosfatasa alcalina	monoésteres	$\text{Zn}^{2+}\text{-Zn}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$	3.9
c	Inositol monofosfatasa	inositol-1-fosfato	$\text{Mg}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$	3.88
d	Fructosa-1,6-bisfosfatasa	fructosa-1,6-bisfosfato	$\text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}$ (binuclear)	3.6-3.8
e	Fosfoproteínofosfohidrolasas	fosfoproteínas (unidas por ser / thr o por tyr)	$\text{Zn}^{2+}\text{-Fe}^{3+}$	3.3
f	Pirofosfatasa inorgánica	pirofosfato	$\text{Mg}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ (trinuclear)	3.5, 4.2, 5.3
g	Fosfolipasas	fosfolípidos	$\text{Zn}^{2+}\text{-Zn}^{2+}\text{-Zn}^{2+}$	3.3, 6.0, 4.7
h	Fosfotriesterasas	arildialquilfosfatos	$\text{Zn}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ (binuclear)	3.3

Otro tipo de fosfohidrolasas muy importantes son las **nucleasas**. Como ya se mencionó, su función es hidrolizar a los ácidos nucleicos y son indispensables para el desarrollo celular y viral.

Un ejemplo muy ilustrativo de la participación de iones metálicos en el mecanismo enzimático de fosfoeterólisis lo constituye la 5'-nucleotidasa de *E. Coli*, que contiene dos iones  $\text{Zn}^{2+}$  en su sitio activo. En la figura 16 se muestra el mecanismo catalítico propuesto para esta enzima.<sup>27</sup> En el sitio activo, los iones de Zn se encuentran a una distancia de 3.5 Å (típica para sitios activos dinucleares, ver la tabla 2). Se encuentran unidos por una molécula de agua (u  $\text{OH}^-$ ) y por el carboxilato de Asp84, que sirven de puentes. En la figura 13a se muestra el complejo de Michaelis-Menten, en el cual el fosfato está coordinado a la molécula de agua (u  $\text{OH}^-$ ) puente y al Zn2. La molécula de agua (u  $\text{OH}^-$ ) en Zn1 está en posición de atacar nucleofílicamente al fosfato desde la posición opuesta al grupo saliente. El fosforilo se encuentra activado electrofílicamente por la coordinación con Zn2 y por interacciones electrostáticas con His117 y Arg410. En el estado de transición (Fig. 13b), después del ataque nucleofílico, ya se ha formado el intermediario pentavalente, el cual se

estabiliza por la coordinación con Zn1, Zn2 y la molécula de agua (u OH<sup>-</sup>) puente. Después, la figura 13c muestra al producto coordinado. Aquí, ya se llevó a cabo la ruptura P-O y por una transferencia de protón los productos son el fosfato inorgánico y el grupo R-OH.

Numerosos grupos de investigación trabajan en la creación de nucleasas artificiales a partir de complejos de metales de transición. En la siguiente sección se hace un análisis de los mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo la activación por metales de transición y se discute sobre las principales nucleasas artificiales que se han desarrollado hasta el momento.

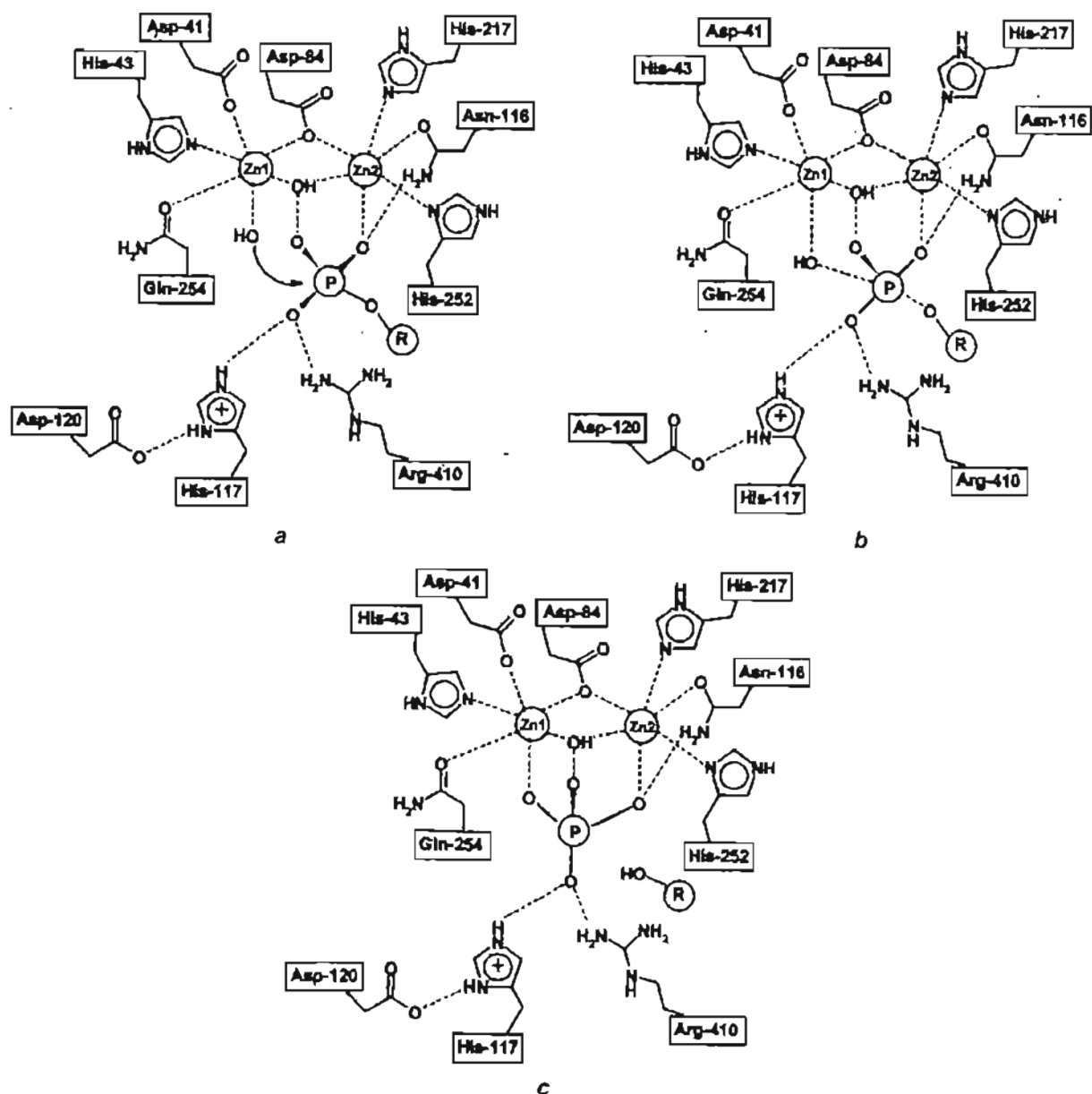


Fig. 13. Mecanismo para la catálisis de un éster de fosfato por la 5'nucleotidasa.

### 3.4 FOSFOESTERÓLISIS CON CATIONES ORGÁNICOS

Se tienen registros del desarrollo de nucleasas artificiales de desde hace 16 años. Los primeros intentos se basaban en la hidrólisis de RNA con compuestos orgánicos cargados positivamente. Barbier y Brack<sup>28</sup> informaron que algunos polipéptidos básicos catalizan la hidrólisis de ApAp a pH 8. La reacción se realizó en agua a 50 °C durante siete días. El aumento en la velocidad de hidrólisis es por un factor de 150.

Basándose en la premisa de que la ribonucleasa pancreática de bovino utiliza en su sitio activo a los imidazoles de dos histidinas, una desprotonada (como base general) y una protonada (como ácido general), Breslow y Labelle<sup>29</sup> publicaron una serie de artículos donde investigan la actividad catalítica del imidazol en polirribonucleótidos. Encuentran que, al menos *in vitro*, el mecanismo es más complicado de lo previsto, pero se confirma la actividad hidrolítica del imidazol.

En 1991 Yoshinari *et. al*<sup>30</sup> informan actividad de oligoaminas (principalmente etilendiamina) para hidrolizar poli(A). Estos resultados son, sin embargo, cualitativos y no se informan ni el mecanismo ni las velocidades de hidrólisis, aunque por los datos que presentan podemos ver que el factor de aumento en la velocidad no es muy grande (en el mejor de los casos 48% de hidrólisis después de dos días a pH 7 y 50 °C).

### 3.5 MECANISMOS DE FOSFOESTERÓLISIS CON IONES METÁLICOS

Los aspectos generales de la catálisis de hidrólisis de fosfodiésteres con iones metálicos han sido estudiados ampliamente<sup>31</sup>. Se pueden contar al menos seis mecanismos diferentes en los que un ion metálico puede activar la reacción de hidrólisis.

#### I. Activación por un ácido de Lewis.

Por medio de la coordinación entre el catión metálico y el oxígeno aniónico del fosfato se incrementa la carga positiva sobre el átomo de fósforo, lo cual facilita la aproximación del nucleófilo. Además la carga negativa sobre el oxígeno disminuye, por lo que de igual manera se disminuye la posible repulsión entre éste y un nucleófilo negativo.

## II. Activación del grupo saliente.

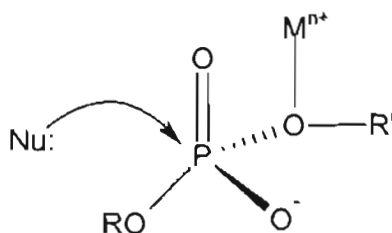


Fig. 14. Activación del grupo saliente.

La coordinación con el grupo saliente disminuye la energía del producto, que aquí es el alcoholato. El alcoholato libre tiene una energía muy alta, y al estar coordinado es más estable. (Fig. 14) Este efecto es análogo a disminuir la basicidad del grupo saliente.

## III. Activación nucleofílica

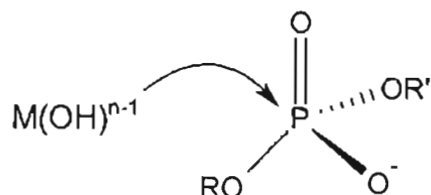


Fig. 15. Activación nucleofílica.

En este caso por medio de la coordinación se disminuye el  $pK_a$  del ácido conjugado del nucleófilo, aumentando de esta manera su concentración a un determinado valor de pH. Por ejemplo, si el nucleófilo es hidróxido, el  $pK_a$  del agua al coordinarse con un complejo de Co(III) disminuye hasta en 10 unidades logarítmicas.

## IV. Catálisis básica general

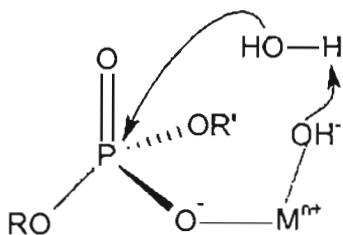


Fig. 16. Catálisis básica general.

La catálisis básica general (Fig. 16) se define como una reacción en la cual la base en cuestión desprotona a una especie, bajando la energía libre del estado de transición. En este caso lo que se facilita es la desprotonación del agua para generar al nucleófilo (hidróxido).

## V. Catálisis ácida general

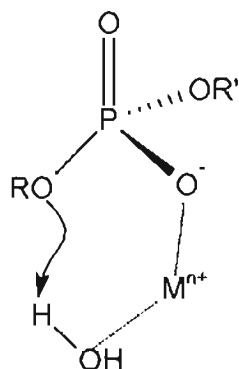


Fig. 17. Catálisis ácida general.

En este caso el catalizador funciona como un generador de protones para estabilizar al estado de transición. (Fig. 17) Este caso implica una estabilización del grupo saliente, sólo que en vez del metal, es el protón liberado quien lleva a cabo dicha estabilización.

Una combinación de estos mecanismos llevaría a la sinergización del efecto producido. Por ejemplo, si al mismo tiempo se da la activación por ácido de Lewis y la activación nucleofílica, esto debe llevar a una catálisis más fuerte, como se ilustra en la figura 18.

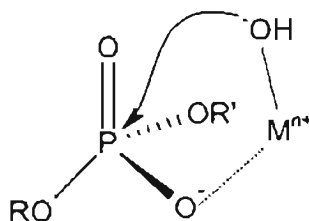


Fig. 18. Activación por ácido de Lewis y activación nucleofílica.

No siempre es fácil comprobar si la activación por ácido de Lewis está acompañada por la activación nucleofílica. Para ello es necesario aislar al intermediario, lo cual sólo es

posible con metales cinéticamente inertes. De cualquier manera la sinergización de los efectos no es completa, ya que en todos los casos es necesario que el metal se coordine, lo que disminuye su capacidad para una segunda coordinación. En realidad lo que ocurre es que ambas se dan, pero de manera más débil. Además para que dos de estos mecanismos se produzcan, existen requerimientos geométricos y estéricos que no siempre se pueden controlar.

Una forma de superar estos problemas es que cada uno de estos efectos sea producido por un catión metálico independiente. Por ejemplo, la catálisis por ácido de Lewis puede cooperar con la estabilización del grupo saliente (Fig. 19a), con la activación nucleofílica (Fig. 19b) y con otra activación por ácido de Lewis (Fig. 19c).

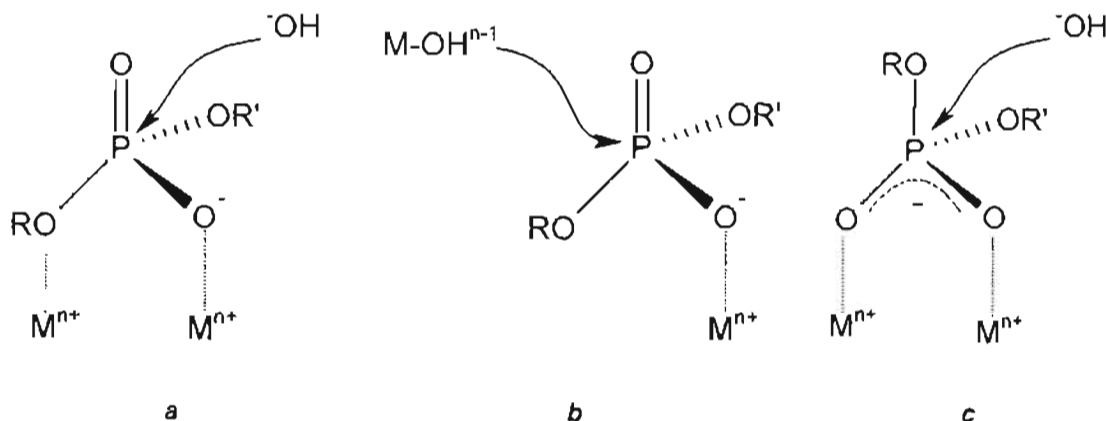


Fig. 19. Efecto sinérgico de la catálisis con dos cationes metálicos.

Este tipo de activación es la que se le atribuye a las fosfohidrolasas, en gran medida porque la mayoría de éstas tiene dos cationes metálicos en su sitio activo, los cuales se encuentran separados por una distancia adecuada para este efecto.

### 3.5.1 HIDRÓLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Sobre la reactividad de cationes metálicos ante el RNA, se tienen registros muy viejos. Por ejemplo, Butzow y Eichorn<sup>32</sup> informan que el catión  $Zn(II)$  hidroliza polirribonucleótidos y oligorribonucleótidos. En este trabajo no se profundiza en la eficiencia catalítica del metal, sino en su selectividad con respecto a la longitud de la cadena, la base nitrogenada y la posición del fosfato terminal.

Hay muchas investigaciones sobre la hidrólisis de ribonucleótidos con complejos dinucleares de Co(II)<sup>33</sup>, Zn(II)<sup>34</sup> y Cu(II)<sup>35</sup>, pero también hay complejos mixtos, como Mg(II)/Ca(II) y Zn(II)/M, donde M = Mg(II), Pb(II), Al(III), Ga(III), In(III) y Fe(III).<sup>36</sup> Los complejos dinucleares son altamente reactivos, como ya se mencionó.

El ataque intramolecular es clásico en ribonucleótidos y es responsable de la alta reactividad de éstos. Aunque este sistema no es de los más rápidos, es ilustrativo del tipo de mecanismos presentes en los ribonucleótidos.

El hecho de que en muchos de estos casos se forme un complejo catalizador-sustrato lleva a tener cinéticas con saturación, las cuales suelen ser analizadas empleando el modelo de Michaelis-Menten.<sup>37</sup> (ver la sección 10.1.4)

Otros ejemplos de complejos de metales de transición que hidrolizan ribonucleótidos son: [Co(trien)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup><sup>38</sup> a 50 °C y 5 < pH < 8, y Cu(trpy)<sup>2+</sup>, Cu(bpy)<sup>2+</sup>, CuCl<sub>2</sub>, Zn-N-metil-(CR)<sup>2+</sup>, Zn(NTA), ZnCl<sub>2</sub>, Ni-(CR)<sup>2+</sup> y NiCl<sub>2</sub><sup>39</sup> a pH 7 y 37 °C. En todos estos casos la velocidad de hidrólisis no es muy alta ( $k_{obs} = 8.7 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  en el primero y del orden de  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  en el segundo).

El complejo Cu([9]anoN<sub>3</sub>)<sup>2+</sup>, que hidroliza tanto a proteínas como al ADN<sup>40</sup>, frente a un oligorribonucleótido también presenta actividad, la cual se ve disminuida por el equilibrio de formación de un dímero inactivo del complejo<sup>41</sup>.

En 1986 Dervan<sup>42</sup> reporta que al unir Fe(II)·EDTA a distamicina produce rupturas específicas en ADN, ya que la distamicina reconoce una secuencia específica y el complejo de hierro lleva a cabo la hidrólisis. Al tratarse de ADN, se descarta el ataque del hidroxilo en 2', de hecho como se hidrolizan varios sitios contiguos, se asume un proceso redox. Lo importante en este caso es que se demuestra que es posible crear nucleasas artificiales específicas, por lo que se refuerza el interés en este tipo de estudios.

Otro ejemplo de hidrólisis selectiva lo presentan Komiyama *et. al.*<sup>43</sup> Para tener una hidrólisis selectiva, ellos unen un oligonucleótido a la acridina en presencia de varios metales de transición y lantánidos. Esto da una selectividad muy alta, y por la diferencia de reactividad entre los oligonucleótidos y los oligorribonucleótidos, sólo los últimos se hidrolizan. Los resultados muestran que el oligonucleótido necesita del metal (de transición o lantánido) para mostrar reactividad y que los metales solos sí la muestran, pero no son específicos. En presencia del oligonucleótido, el metal tiene cierto efecto en la selectividad

del sistema. En el artículo no se discute el papel de los metales en el mecanismo de la reacción.

Como la principal motivación para el estudio de la hidrólisis de diésteres de fosfato es su aplicación a la biología molecular, son comunes los estudios con ribonucleótidos. Sin embargo, el estudio de éstos tiene la limitación de que no es sencillo seguir cuantitativamente las reacciones y analizar los productos. Por ello en muchos casos no se reportan constantes catalíticas ni se propone un mecanismo detallado. Para salvar este problema se recurre a sustratos modelo. Con fines prácticos, se puede utilizar un sustrato aromático activado, ya que esto permite seguir las reacciones hasta el final, lo que nos da más información. Además, es más fácil seguir su aparición si el grupo saliente es colorido (nitrofenolato, por ejemplo). A continuación se revisan los trabajos con este tipo de sustratos.

### 3.5.2 HIDRÓLISIS DE SUSTRATOS AROMÁTICOS ACTIVADOS

En 1988, Morrow y Trogler<sup>44</sup> presentan estudios de la hidrólisis de BNPP y *p*-nitrofeniletilfosfato con cobre y bipyridina. Se encuentra que los complejos  $\text{Cu}(\text{bpy})^{2+}$  y  $\text{Cu}(\text{bpy})(\text{OH})^+$  tienen actividad.

Chin informa en 1989<sup>45</sup> que tres complejos (Fig. 20 **a-c**) de cobalto(III) con poliaminas a 50 °C muestran el mismo comportamiento descrito por Morrow.

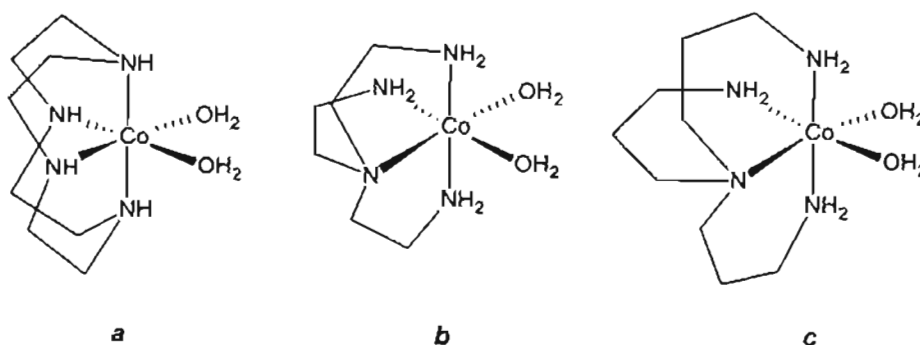


Fig. 20. Complejos de Co(III) con poliamnas.

Las constantes de primer orden son  $4.6 \times 10^{-3}$ ,  $8.1 \times 10^{-5}$  y  $2.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  para **a**, **b** y **c**, respectivamente. Para **a** y **c** podemos observar velocidades más altas, si tomamos en cuenta que las mediciones fueron hechas a 50 y no a 75 °C, como en el caso anterior. Probablemente esto se deba a la mayor acidez del Co(III) con respecto a Cu(II).



Varios metales divalentes (Ni, Cu, Zn, Pd y Pt) muestran actividad con bpy y tren.<sup>46</sup> Los complejos, a 75 °C, aceleran la reacción en el orden Cu > Ni > Zn > Pd > Pt y los ligantes en el orden bpy > tren. Al utilizar un ligante cíclico ([15]anoN<sub>4</sub>) se fuerza la geometría plana cuadrada del níquel. Como este complejo no muestra reactividad, se comprueba la necesidad de sitios *cis* libres para la coordinación e hidrólisis del sustrato.

Este mismo tipo de ligantes cíclicos (ciclen y [12]anoN<sub>3</sub>) a 35 °C en presencia de Zn(II)<sup>47</sup> muestran reactividad. Aquí al ser ciclos más pequeños el complejo no es plano, permitiendo así la interacción del fosfato con el metal y el ataque del hidroxio anión coordinado al fosfato.

En artículos posteriores ese mismo grupo introduce modificaciones a los macrociclos aminados, un grupo alcohólico colgante hidroxietilo<sup>48</sup> y un grupo 2-hidroxi-2-feniletilo<sup>49</sup>. Estos grupos alcohol al coordinarse se vuelven más reactivos, como se observa en la figura 21.

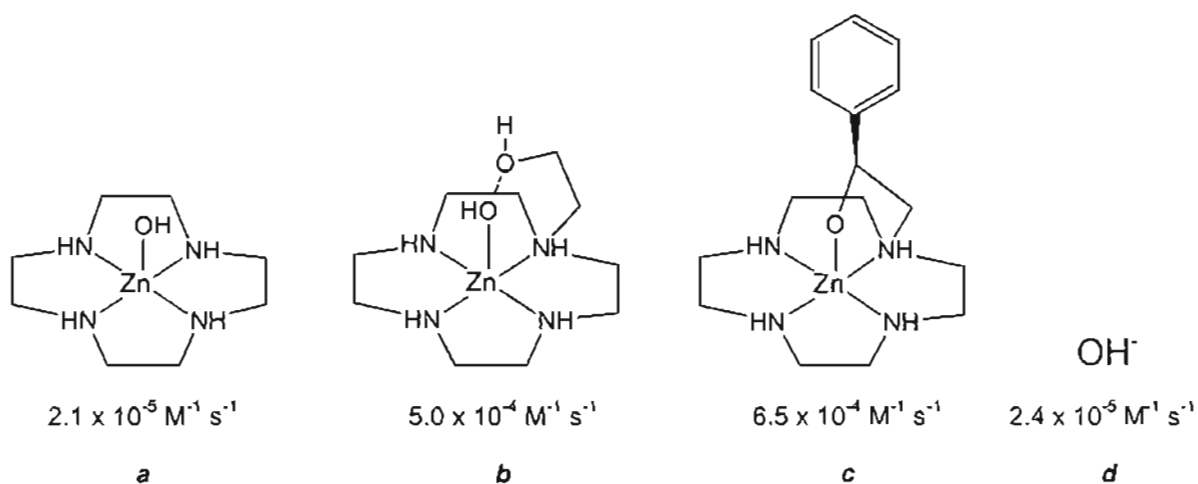


Fig. 21. Estructura de complejos macrocíclicos aminados de Zn<sup>2+</sup> y constantes de segundo orden para la hidrólisis de BNPP por los mismos y de hidrólisis alcalina.

Con este tipo de sistemas, Chin introduce una serie de ligantes pero abiertos, para permitir la interacción del fosfato en forma *cis*<sup>50</sup> con Cu(II). El ligante sin alcohol colgante y con hidroxietilo presentan reactividad similar y no se observa transesterificación, mientras el ligante con un hidroxipropilo colgante sí presenta transesterificación y es ca. 100 veces más rápido. Lo anterior pone de manifiesto no sólo la importancia del grupo colgante, sino que también es importante el tamaño del ciclo que se va a formar. En ese artículo se hace mención de que los hidróxidos metálicos pueden formar dímeros inactivos, lo cual como se demuestra más adelante no es forzosamente correcto, aunque Burstyn y Deal<sup>51</sup> observan este comportamiento con el complejo Cu[9]anoN<sub>3</sub>. Al sustituir al ligante con grupos

voluminosos observan una reducción en la formación del dímero y con ello la reactividad aumenta 60 veces sobre el sistema con el ligante sin esos grupos<sup>52</sup>.

Con un complejo de Zn(II) y un macrociclo de 24 miembros, Jurek y Martell<sup>53</sup> encuentran que se forman complejos 1:1 y 2:1. Ambos complejos se desprotonan y la reactividad del primero es mayor que la del segundo. El complejo 1:1 muestra un  $pK_a$  mayor que el 2:1 (9.10 contra 6.94) debido a que el agua coordinada a dos Zn(II) se desprotona más fácilmente que la que está coordinada sólo a uno. El ligante (**a**) y los mecanismos de reacción propuestos (**b** y **c**) se muestran en la figura 22.

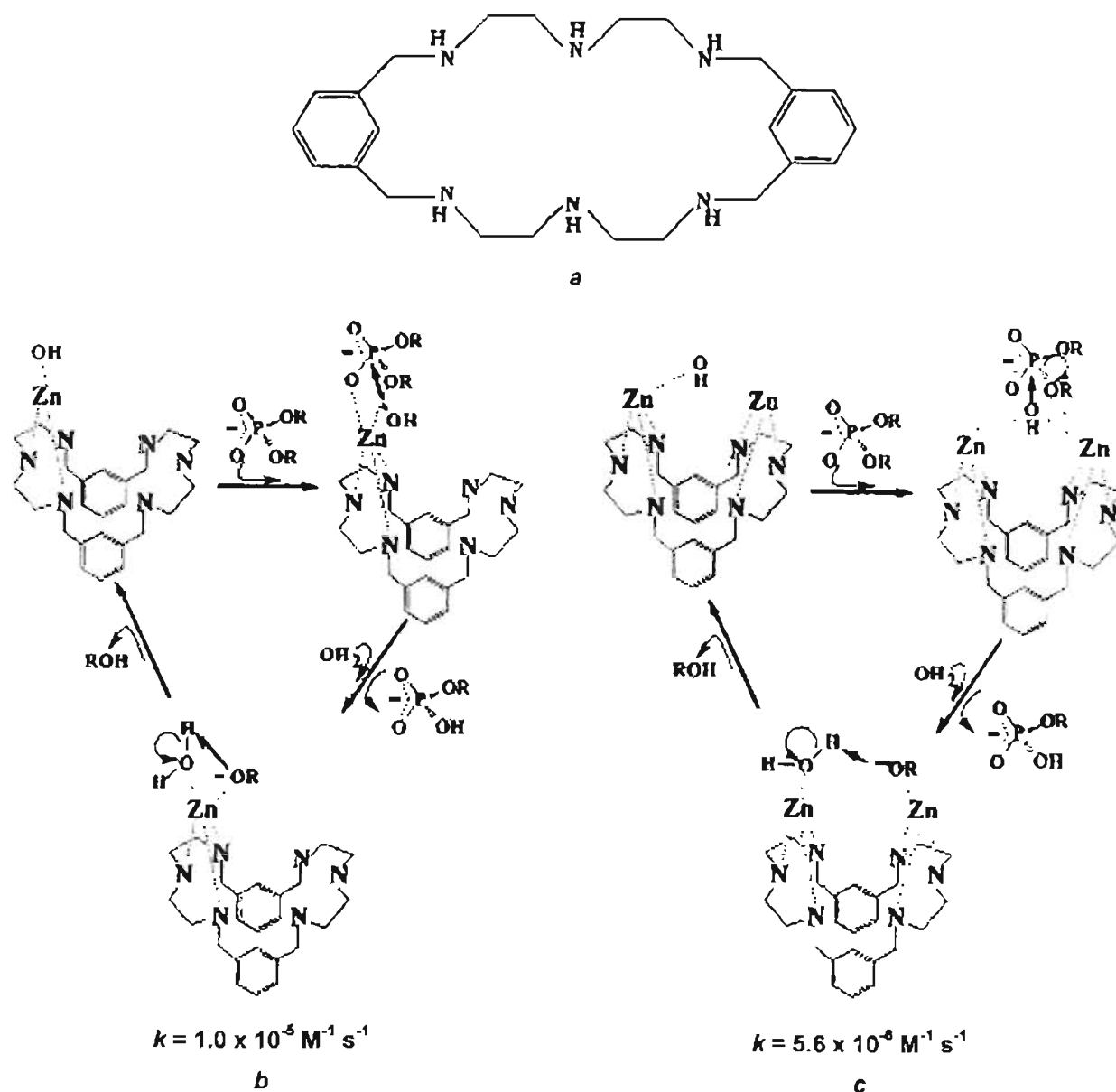


Fig. 22. Ligante macrocíclico de 24 miembros (a) y los dos mecanismos de fosfodiesterólisis propuestos (b y c).

La menor reactividad del complejo dinuclear se justifica porque el nucleófilo está coordinado a dos centros metálicos, lo que hace que su nucleofilia disminuya.

Con el ligante tdc1 (figura 23) y Cu(II) se forman varios complejos, de los cuales, el  $\text{Cu}_2\text{LH}_3$  muestra actividad fosfodiesterolítica.<sup>54</sup>

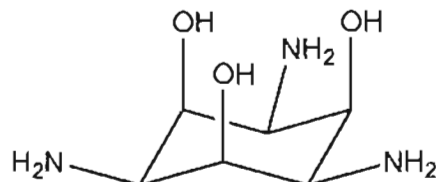


Fig. 23. Estructura del ligante tdc1.

Se propone que las desprotonaciones sean: una de un alcohol coordinado a dos Cu(II) y una de una molécula de agua coordinada a cada centro metálico. A pH 8.6 y una concentración 4 mM del complejo, el aumento de la velocidad es de  $3.5 \times 10^7$  veces comparado con la autohidrólisis. Se observa saturación debida a un mecanismo tipo Michaelis-Menten. El complejo  $\text{CuLH}_1$  es inactivo, lo que habla a favor de la importancia de la cooperatividad de los centros metálicos vía una doble activación de Lewis. El ataque nucleofílico es intramolecular.

Esta cooperatividad de entre dos centros metálicos también se presenta al modificar al ligante [9]anoN<sub>3</sub>, uniendo dos unidades de éste por medio de un 2-hidroxipropilo<sup>55</sup> (bis-[9]anoN<sub>3</sub>) y haciéndolo reaccionar en presencia de Zn(II). (Fig. 24)

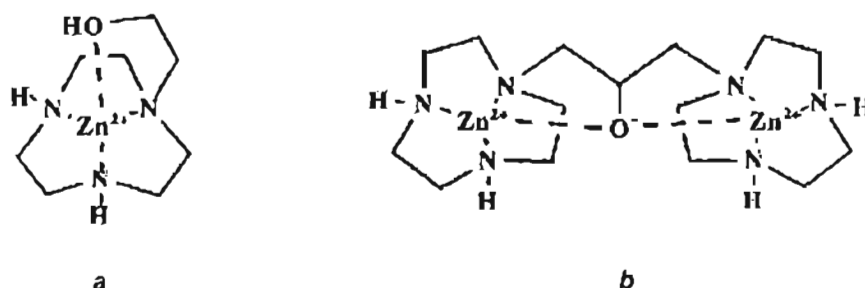


Fig. 24. Estructura de los complejos  $\text{Zn}(\text{L1OH})$  (a) y  $\text{Zn}_2(\text{L2O})$  (b).

El complejo  $\text{Zn}_2(\text{L2O})$  es 10 veces más reactivo que  $\text{Zn}(\text{L1OH})$  ante la transesterificación de HPNPP.

Como conclusión podemos decir que los complejos de metales de transición presentan actividad fosfodiesterolítica en presencia de ciertos ligantes si hay un nucleófilo intramolecular y si hay interacción metal-sustrato.

Los complejos dinucleares son inactivos si el nucleófilo es un grupo hidroxilo coordinado a ambos metales, pero si se da la interacción de los metales con el sustrato y hay presente otro tipo de nucleófilo, no desactivado, la velocidad de hidrólisis aumenta considerablemente.

### 3.6 FOSFOESTERÓLISIS CATALIZADA POR LANTÁNIDOS

Desde 1955 se sabe que los geles de hidróxido de lantano promueven la hidrólisis de  $\beta$ -metoxietil y  $\beta$ -aminoetil fosfatos<sup>56</sup> a pH 8.5 y 78 °C. También se ha encontrado que los hidróxidos de La(III), Ce(III) y Th(IV) catalizan la hidrólisis de  $\alpha$ -glicerofosfato a  $7 < \text{pH} < 10$ .<sup>57</sup>

En esos sistemas no es posible proponer un mecanismo detallado debido a su complejidad y a la naturaleza heterogénea del sistema. De hecho, es muy posible que una fracción soluble de hidroxocomplejos sea la responsable de dicha actividad y no los hidróxidos insolubles.

Para salvar este problema Blewett y Watts<sup>58</sup> utilizan como ligante a la piridina-2-carbaldehidooxima en presencia de Y(III) a 25 °C. El sistema resultante es homogéneo, pero aún muy complicado y se proponen complejos hidroxilo poliméricos, en los cuales el papel del ligante se desconoce. El nucleófilo es un hidroxilo coordinado y la actividad catalítica sobre el *p*-nitrofenil metilfosfonato es notable (aumento de  $10^{5-6}$  veces con respecto a la hidrólisis no catalítica).

En los años 80 se desarrollan numerosos trabajos en los que se informa sobre la síntesis y propiedades de los complejos de lantánidos con macrociclos,<sup>59</sup> sin embargo no es sino hasta 1990 que Hay y Govan<sup>60</sup> informan la actividad fosfoesterolítica de un complejo de lantano, el ligante  $L^1$  (figura 25a) es una base de Schiff y el sustrato es el 2,4-dinitrofenil dietilfosfato (figura 25b). El complejo es sumamente estable ante la precipitación con hidróxidos y fluoruros. La actividad catalítica se atribuye al complejo  $\text{La}L^1(\text{OH})^{2+}$ .

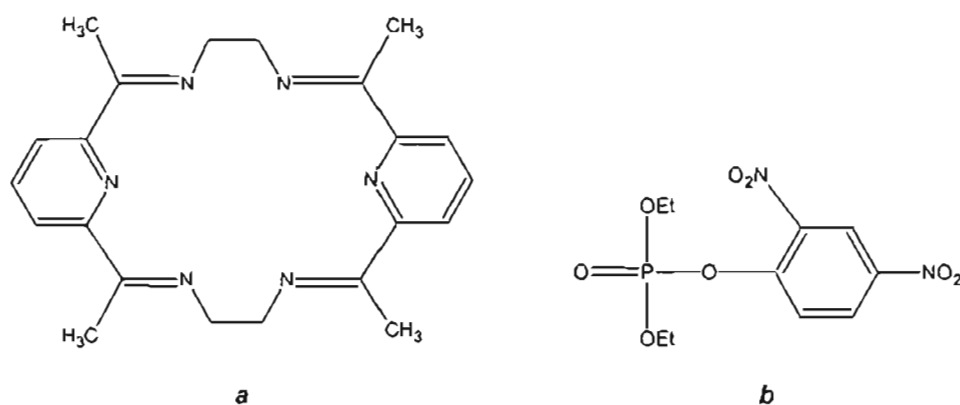


Fig. 25. a) Ligante L<sup>1</sup> y b) 2,4-dinitrofenil dietilfosfato.

Con esta misma idea de estabilizar lantánidos por medio de ligantes, Breslow<sup>61</sup> publica las constantes de velocidad de la hidrólisis de algunos dinucleótidos con lantánidos, además de Ca(II), Mg(II), Zn(II) y Pb(II) y las compara con las actividades de estos mismos en presencia de ciclodextrinas e imidazol. Los lantánidos son mejores (aumento  $\sim 10^4$  veces) que los otros metales utilizados (aumento entre 3 y  $10^3$  veces) y en presencia de las  $\beta$ -ciclodextrinas la actividad catalítica aumenta ca 1.5 veces más. Contrario a lo que afirman Matsumoto y Komiyama<sup>62</sup>, no se observa selectividad alguna en estos sistemas. El efecto de estos ligantes es pobre, al parecer el reconocimiento molecular que se esperaba es contrarrestado por impedimentos estéricos.

La mayoría de los complejos de lantánidos con macrociclos presentan la desventaja de que, en disolución acuosa después de un tiempo el metal se libera, lo que lleva a la pérdida de la actividad catalítica. Morrow *et. al*<sup>63</sup> demuestran que con el ligante L<sup>1</sup> (Fig. 33a), el europio forma un complejo estable y prueban verdadera actividad catalítica para la transesterificación del RNA en condiciones fisiológicas.

En otro trabajo, este mismo grupo presenta la transesterificación del *p*-nitrofenil 2-hidroxipropilfosfato con una gran variedad de metales a pH 6.85 y 37 °C.<sup>64</sup> Los lantánidos muestran actividades catalíticas muy superiores a los demás metales y en general se tiene un mecanismo tipo Michaelis-Menten. (ver sección 10.1.4)

En varios trabajos se ha utilizado el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con los lantánidos para hidrolizar al BNPP. Chin informó un aumento de  $10^8$  veces con respecto a la hidrólisis alcalina<sup>65</sup>, el mayor hasta ese momento. Se propone un mecanismo en el que el complejo dimérico La<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub><sup>2+</sup> (figura 26) coordina al sustrato y luego un O<sub>2</sub><sup>2-</sup> puente sirve de nucleófilo- $\alpha$ . En un artículo posterior<sup>66</sup>, demuestran este mecanismo, pero también plantean la posibilidad de que un

tercer  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduzca a un  $\text{O}_2^{2-}$  puente para formar un puente  $\text{OH}^-$  y uno  $\text{O}^{2-}$ , el cual en este caso sería el nucleófilo.

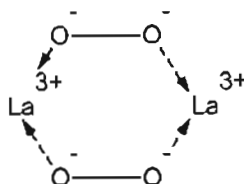


Fig. 26. Complejo  $\text{La}_2(\text{O}_2)_2^+$ .

En presencia de un dímero de ciclodextrina (figura 27), Breslow y Zhang<sup>67</sup> observan que la reacción se da con un  $\text{La}(\text{III})$  y un  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A concentraciones bajas del lantano hay aceleración de la reacción y a concentraciones altas hay inhibición de ésta. Lo anterior se debe a que entra en juego el mecanismo con  $\text{La}_2(\text{O}_2)_2^{2+}$  y el sustrato interactúa con el macrociclo.

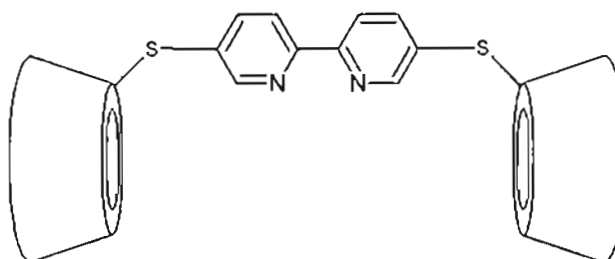


Fig. 27. Dímero de ciclodextrina.

Yatsimirsky y Mejía<sup>68</sup> estudiaron a fondo la hidrólisis de BNPP con peróxido de hidrógeno. En medio básico, el BNPP reacciona rápidamente con  $\text{HO}_2^-$  sin iones metálicos para liberar un equivalente de nitrofenolato.<sup>68a</sup> El intermediario formado reacciona por dos vías, una produce la liberación del segundo nitrofenolato y la otra produce *p*-nitrofenilfosfato. Este mecanismo se comprobó utilizando un sustrato más lábil, el *p*-nitrofenilfosfodicloridato (Fig. 28), que produce el mismo intermediario que BNPP al reaccionar con  $\text{HO}_2^-$ .

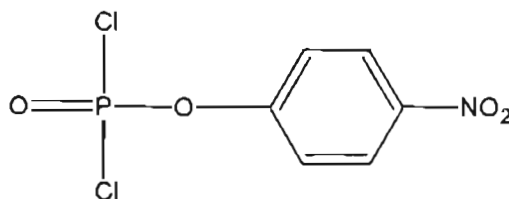


Fig. 28. *p*-nitrofenilfosfodicloridato.

En presencia de itrio(III).<sup>68b</sup> Los resultados potenciométricos muestran que además del complejo  $M_2(O_2)_2^{2+}$ , como el reportado con lantano, también se forma el complejo  $Y_2(O_2)_2(OH)_2$ . Los resultados cinéticos indican la participación de dos moléculas de este último complejo en la hidrólisis del BNPP.

En 1988 Komiyama *et. al*<sup>69</sup> retoman el sistema lantano- $H_2O_2$  para hidrolizar dirribonucleótidos, obteniendo las velocidades de hidrólisis más altas para ese sistema hasta entonces. Llama la atención, sin embargo, el hecho de que ellos asignan dicha actividad al agregado  $(La_2(O-O)_3)_3$  y el estudio potenciométrico está en acuerdo con la existencia de esa especie en vez del  $La_2(O-O)_2^{4+}$ , propuesto por Chin<sup>65,66</sup>. La diferencia en ambos casos puede ser que en el último se ocupa un exceso mayor de  $H_2O_2$ , lo que promueve la formación de nuevas especies. Los dirribonucleótidos necesitan una mayor cooperatividad, dos metales y una base general, para eliminar al un grupo saliente, que es mucho más pobre que el nitrofenolato.

Al estudiar los sistemas con La(III), Pr(III), Nd(III) y Eu(III) en presencia de  $H_2O_2$ , Mejía-Radillo y Yatsimirsky<sup>68c</sup> encuentran la presencia de complejos  $Ln_2(O_2)_2(OH)_2$  o su dímero  $Ln_4(O_2)_4(OH)_4$ , así como sus formas monoprotionadas. Con lantano se observa además al complejo  $La_2(O_2)_3$  y con europio al  $Eu_3(O_2)(OH)_4$ . La actividad cinética sobre el BNPP es complicada. A concentraciones bajas de metal el orden de reacción con respecto al metal es 4 para lantano y cae hasta 1.5 con europio. Este decremento en el orden con respecto al metal coincide con un incremento en la nuclearidad de las especies predominantes en cada sistema, por lo que se propone que en todos los casos se necesitan agregados hexa u octanucleares para llevar a cabo la hidrólisis. Las formas monoprotionadas tienen menor actividad que las desprotonadas.

Para estudiar el efecto de los ligantes en la hidrólisis de fosfodiésteres con lantánidos, Schneider y Rammo<sup>70</sup> utilizan una serie de poliaminas, polialcoholes y un criptando mixto de oxígeno y nitrógeno a pH 7 y 50 °C. Los lantánidos solos provocan un aumento de ca.  $10^6$  veces en la velocidad de hidrólisis y se observa saturación, indicativa de un mecanismo tipo Michaelis-Menten. En presencia de las poliaminas, el criptando y los polialcoholes con un grupo carboxilato las reacciones se ven inhibidas. Los polialcoholes presentan aumento en las velocidades de hidrólisis hasta de 2.5 veces. La principal conclusión de este trabajo es que modificando los ligantes es posible obtener velocidades de hidrólisis aún mayores.

En 1994 Komiyama *et al.*<sup>71</sup> demuestran que una mezcla de lantano(III) y hierro(III) tiene actividad superior a la suma de ambas por separado. Esta cooperatividad se atribuye a la formación de un dímero hidroxilo mixto de La y Fe. La forma curva de la gráfica de Job indica que la constante de formación del dímero no es muy alta (a pH 7 y 50 °C), sin embargo se logra tener un sistema homogéneo (la presencia de lantano evita la formación de un gel de Fe(III)). Aunque la actividad observada no es sobresaliente, el trabajo es importante porque demuestra una vez más la importancia de la cooperatividad entre dos centros metálicos para la hidrólisis del fosfodiéster.

Morrow<sup>72</sup> presenta la hidrólisis de BNPP con lantánidos y un azamacrociclo con cuatro grupos hidroxietilo colgantes (figura 29). Al coordinarse, el grupo alcohol disminuye su  $pK_a$  y puede desprotonarse en medios ligeramente básicos. Este grupo alcoholato sirve de nucleófilo y transesterifica al BNPP. Es el primer trabajo donde se informa este tipo de ataque de alcoholato facilitado por un ión metálico.

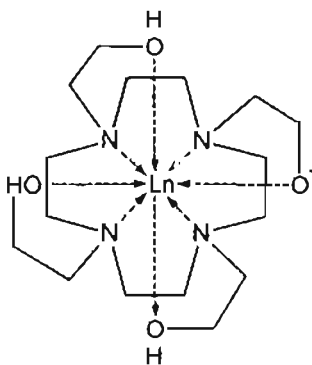


Fig. 29. Complejo lantánido-macrociclo hidrolizado.

Más tarde, Kalesse y Loos presentan modificaciones a ese ligante<sup>73</sup>, introduciendo tres grupos carboxilato en vez de los cuatro hidroxietilos. Lo anterior con la finalidad de aumentar la estabilidad de los complejos y evaluar la actividad de un complejo neutro. Las velocidades de hidrólisis son moderadas y no se observa beneficio alguno al ir de un complejo catiónico a uno neutro.

En otro trabajo, Ragunathan y Schneider evalúan diferentes macrociclos en presencia de Eu(III) y Pr(III) para hidrolizar BNPP y ADN<sup>74</sup>. A 50 °C y pH 7, el mejor ligante es mixto, con tres donadores por nitrógeno y tres por oxígeno. Los complejos formados son del tipo  $Ln_2L$ , y el análisis de la actividad catalítica se hace en función de la distancia entre los cationes metálicos. Nuevamente las velocidades de hidrólisis informadas son modestas.



En otro estudio, ese mismo grupo, analiza la influencia de un grupo carboxilato pendiente sobre el átomo de nitrógeno del ligante benzoaza-15-corona-5 éter.<sup>75</sup> Las constantes de estabilidad con europio indican que a 50 °C y pH 7 la fracción de complejo formado con europio varía entre 83 y 88% al variar la longitud de la cadena (Fig. 30).

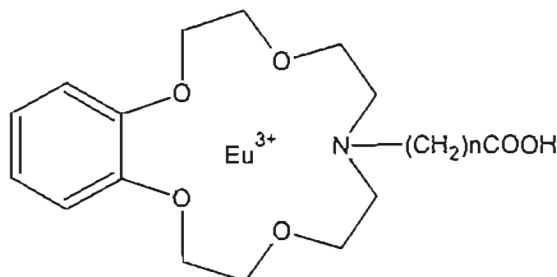


Fig. 30. Complejos de europio con el ligante benzoaza-15-corona-5 éter modificado.

La actividad catalítica en cambio aumenta 14 veces al aumentar la longitud de la cadena de uno a cinco metilenos. Podría pensarse que el carboxilato inhibe la catálisis, pero al quitarlo y poner un metilo, la actividad catalítica cae casi a la mitad que con el carboxilato y la cadena más corta. De este modo, la explicación que se da es que el carboxilato ayuda, pero necesita una cadena larga para formar enlaces más flexibles.

Para estabilizar a los lantánidos en disolución, también se han utilizado criptandos. Con el criptando (2,2,1), por ejemplo<sup>76</sup> (figura 31), en medio ácido se forman los complejos  $\text{Ln}(2,2,1)(\text{H}_2\text{O})_n$ , con  $\text{Ln} = \text{La}, \text{Ce}$  y  $\text{Eu}$ . En medio básico el complejo se desprotona para formar  $\text{Ln}(2,2,1)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{n-1}$ , el cual es activo ante la hidrólisis de BNPP. El orden de actividad es:  $\text{La} < \text{Ce} < \text{Eu}$ .

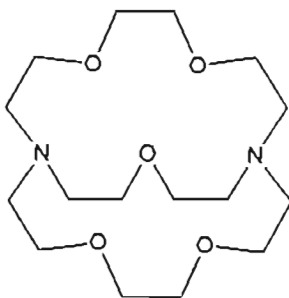


Fig. 31. Criptando (2,2,1)

En 1998 se publica un trabajo sobre la actividad catalítica de las acuaiones de los lantánidos en disolución.<sup>77</sup> A 50 °C y pH 7, se obtienen cinéticas que muestran saturación al aumentar la concentración de metal. Lo anterior es indicativo de un mecanismo tipo

Michaelis-Menten y se calculan los valores de  $K_M$  y  $k_{cat}$  para ocho lantánidos. El valor de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) correlaciona con el radio iónico del lantánido, teniéndose que a menor radio (mayor acidez) la constante catalítica es mayor. Yb(III) y Lu(III) se desvían de este comportamiento, la explicación que se propone es que estos últimos forman agregados, los cuales son inactivos y no son visibles. (ver figura 32)

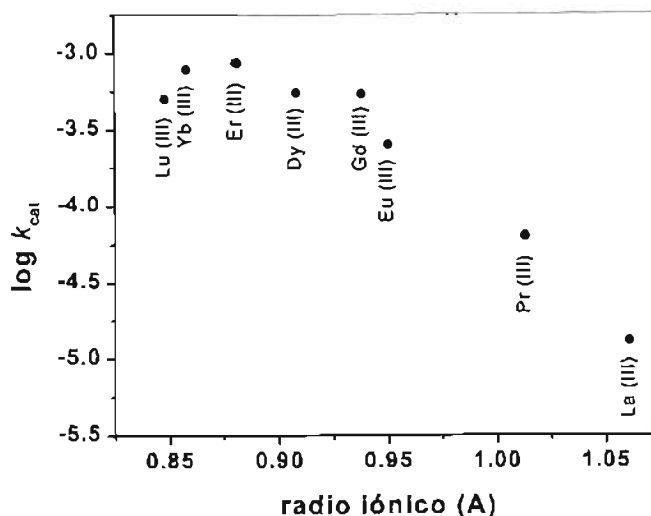


Fig. 32. Dependencia de la constante catalítica de los acuataciones de lantánidos con el radio iónico.

Otro enfoque que se ha utilizado para evitar la insolubilidad de los lantánidos en medios básicos es llevar a cabo las reacciones en otros disolventes. Por su parecido estructural y de propiedades con respecto al agua, el metanol ha sido escogido para tales fines con ésteres<sup>78</sup> y fosfodiésteres tanto desactivados<sup>79</sup> como activados.<sup>80</sup> De los datos cinéticos, de titulación potenciométrica y de RMN de  $^{31}\text{P}$ , se concluye que, a 25 °C, el triflato de lantano(III) en metanol forma solvatos mono y dinucleares<sup>80a</sup> (se utiliza triflato porque debido a la baja constante dieléctrica del metanol otros contraiones que no se coordinan en agua pueden sí hacerlo en metanol). Estos complejos se desprotonan a valores elevados de  $\text{pH}$  (ver abreviaturas y símbolos) para formar los complejos  $\text{La}(\text{CH}_3\text{O})(\text{CH}_3\text{OH})_x^{2+}$ ,  $\text{La}_2(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{CH}_3\text{OH})_y^{4+}$  y  $\text{La}_2(\text{CH}_3\text{O})_5(\text{CH}_3\text{OH})_z^+$ . Vale la pena hacer notar la analogía de estos complejos con los formados en agua ( $\text{La}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}$ ,  $\text{La}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_y^{4+}$  y  $\text{La}_2(\text{OH})_5(\text{H}_2\text{O})_z^+$ )<sup>81</sup> y que son responsables de la hidrólisis de RNA en agua. El aumento en la velocidad de metanólisis de BNPP es de  $10^{10}$  veces.

El uso de ligantes aniónicos provee disoluciones muy estables, sin embargo la actividad hidrolítica de los iones se ve disminuida considerablemente. Por otro lado, con

algunos ligantes neutros (criptandos y macrociclos) comúnmente no se obtienen disoluciones estables, por lo que algunos grupos optan por estudiar ligantes más sencillos, en particular aminas y alcoholes. Muchas de estas moléculas se utilizan como amortiguadores biológicos o de Good<sup>82</sup> y recientemente se ha descubierto que su capacidad coordinante es más importante de lo que se pensaba. Bis-Tris (figura 33a) forma un complejo bastante estable con La(III) ( $K_f = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). En medios básicos se forma la especie  $\text{La}_2\text{L}_2(\text{OH})_4^{2+}$ . Esta especie es activa en la hidrólisis de BNPP<sup>83</sup> ( $k_{\text{obs}} = 7.3 - 8.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  con  $[\text{La}] = [\text{L}] = 0.5 \text{ mM}$  y 2 equivalentes de  $\text{OH}^-$ ). El mecanismo propuesto es el que se muestra en la figura 33b.

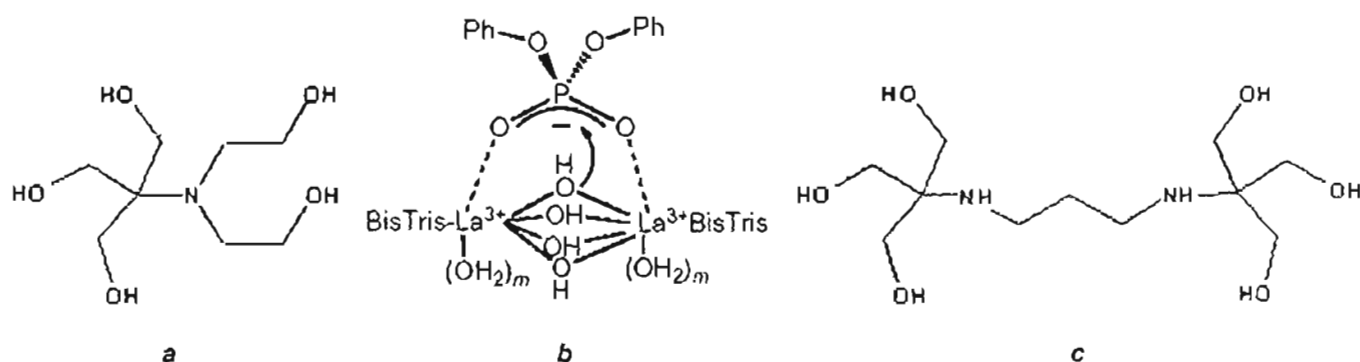


Fig. 33. Bis-Tris (a), Bis-Tris Propano (b) y el mecanismo de hidrólisis de BNPP por  $\text{La}_2(\text{Bis-Tris})_2(\text{OH})_4^{2+}$  (c).

Los ligantes Bis-Tris-Propano (BTP) (figura 33c) y Tris estabilizan, aunque moderadamente, al itrio y sus complejos presentan actividad catalítica ante el BNPP.<sup>84</sup> El BTP forma los siguientes complejos:  $\text{Y}(\text{BTP})^{3+}$  y  $\text{Y}_2(\text{BTP})(\text{OH})_n^{6-n}$ , con  $n = 2, 4, 5$  y  $6$ . La hidrólisis del BNPP es de segundo orden con respecto al metal. Los complejos involucrados son aquellos con  $n = 4$  y  $5$ . A pH 8.75 una disolución 1.8 mM de Y(III) y BTP 20 mM presenta una  $k_{\text{obs}}$  de  $5.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . El Tris forma complejos  $\text{Y}(\text{Tris})^{3+}$  y  $\text{Y}_2(\text{Tris})_2(\text{OH})_5^-$ . El hidroxilo complejo tiene actividad catalítica de primer y segundo orden. A pH 8.5 una disolución 2 mM de Y(III) y Tris 20 mM presenta una  $k_{\text{obs}}$  de  $5.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Con los lantánidos el BTP forma los mismos complejos que con itrio.<sup>85</sup> Para los iones de los lantánidos estudiados ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  y  $\text{Dy}^{3+}$ ) los complejos hidroxilo presentan actividad en la hidrólisis de BNPP, la cual se ajusta a la siguiente expresión:

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

Ecuación 2

Aunque la constante más grande es la de  $\text{Ln}(\text{OH})^{2+}$ , la escasa concentración que alcanza esta especie hace que en realidad no contribuya mucho a la hidrólisis del sustrato. Al ir hacia lantánidos más pesados y ácidos, los complejos hidroxilo con mayor  $n$  tienden a contribuir en mayor proporción a la reactividad.

Otro enfoque muy socorrido en los últimos 10 años es utilizar iones metálicos en estado de oxidación IV. Si pensamos que la acidez de los cationes de los lantánidos en estado de oxidación tres es responsable de su eficiencia catalítica, con estados de oxidación mayores las velocidades de hidrólisis deben ser aún mayores. Estos cationes tienen el inconveniente de que sus hidróxidos precipitan en valores de pH aún más ácidos que los de los lantánidos trivalentes, por ejemplo.

A principios de los años 90, proliferaron los trabajos en los que se reportaba la eficiente catálisis de la hidrólisis de ADN por disoluciones y geles de  $\text{Ce}(\text{IV})$ <sup>86</sup>. En un principio se especuló sobre la actividad de los geles en la hidrólisis, pero ahora es claro que la formación de éstos abate la velocidad de la hidrólisis de los fosfatos. Por ello se empezó a buscar la manera de mantener a los iones en disolución a valores neutros o alcalinos de pH.

Una manera de proteger al  $\text{Ce}(\text{IV})$  de la precipitación es haciéndolo interactuar con ciclodextrinas. Por ejemplo, en 1994 Sumaoka, Miyama y Komiyama<sup>87</sup> informaron las velocidades de hidrólisis de monofosfatos de nucleósidos 3',5'-cíclicos con  $\text{Ce}(\text{IV})$  y  $\gamma$ -ciclodextrina. En condiciones fisiológicas  $\text{Ce}(\text{IV})$  es  $10^4$  veces más activo que  $\text{Ce}(\text{III})$ . Además, en presencia de  $\gamma$ -CyD, se obtienen sistemas homogéneos que también son activos en la hidrólisis de los sustratos empleados. En presencia de la ciclodextrina, sin embargo, las velocidades de hidrólisis caen entre 10 y 40 veces. Proponen un mecanismo que involucra a un hidróxido coordinado como nucleófilo y a una molécula de agua coordinada como catalizador ácido.

Otro intento por estabilizar disoluciones de  $\text{Ce}(\text{IV})$  es mediante micelas. Con Brij-35 no iónico, en agua se forman micelas que protegen al  $\text{Ce}(\text{IV})$  de la precipitación y, en presencia de algunos ligantes se obtienen disoluciones estables a valores de pH tan básicos como 12<sup>88</sup>. La aceleración obtenida de la hidrólisis de BNPP es  $10^9$  ( $2.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) con respecto a la reacción no catalizada. Se presume que la activación se debe a la acidez del metal y a la presencia de hidróxidos coordinados, pero aunque la reactividad varía sensiblemente con el ligante empleado, con el pH y con las proporciones metal-ligante, no

se propone un mecanismo detallado ni qué especie(s) es(son) responsable(s) de dicha reactividad.

También se han empleado macrociclos para estabilizar las disoluciones de Ce(IV). Por ejemplo, con el 1,4,7-tris(carbamoimetil)-1,4,7-triazaciclononano,<sup>89</sup> la hidrólisis de HPNPP, es acelerada  $7.4 \times 10^3$  veces a pH 7.4. A pesar de que este sistema es más sencillo que los anteriores, tampoco se presenta un mecanismo detallado. Sin embargo, de estudios con ADN, se encuentra que la especie reactiva es  $[\text{Ce}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ ,<sup>90</sup> por lo que es probable que las racionalizaciones hechas para los Ln(III) también sean válidas con Ce(IV).

Con esta misma idea de utilizar iones metálicos altamente cargados, también se ha utilizado Zr(IV) para hidrolizar BNPP.<sup>91</sup> Un complejo con el buffer TRIS, a pH 4 y 20 °C, por ejemplo<sup>91a</sup>, presenta una velocidad de  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Con Th(IV), también se han hecho intentos. En un medio HEPES-Brij, la constante de velocidad observada aumenta de  $9.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a pH 3.5 a  $2.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 6.<sup>92</sup> Lo anterior es consistente con los valores de  $pK_a$  de Th(IV), que son 3.89 y 4.20,<sup>93</sup> por lo que se asume que estas especies participan en la hidrólisis.

A manera de conclusión, podemos afirmar que Ce(IV), Zr(IV) y Th(IV) son los cationes más reactivos ante la hidrólisis de fosfodiésteres (BNPP en particular). Sin embargo, la acidez de estos cationes impide tenerlos disueltos a valores de pH neutros o básicos, los ligantes que estabilizan estas disoluciones generalmente desactivan a los cationes y en general, la identificación de especies activas y por lo tanto la elucidación de los mecanismos de reacción es bastante complicada.

### 3.7 PROPIEDADES DE LOS ACUACIONES DE LOS LANTÁNIDOS

Las propiedades de los lantánidos coordinados en disolución acuosa se discuten en múltiples revisiones.<sup>94</sup> En general, éstos se comportan como ácidos de Lewis duros con enlaces de coordinación predominantemente no direccionales y de carácter electrostático. Tienen afinidad por ligantes duros, en particular donadores por oxígeno. También son afines a ligantes aniónicos (carboxilatos y fosfatos, por ejemplo).

Los números de coordinación son altos (hasta doce) ya que forman enlaces predominantemente iónicos y tienen radios iónicos grandes. Para lantano, el número de coordinación típico es nueve. Los estudios con rayos X muestran que las sales hidratadas

de todos los lantánidos de los que se disponen datos tienen número de coordinación nueve. Si los ligantes son voluminosos el número de coordinación puede disminuir al avanzar en la serie hasta llegar a seis. Esta variabilidad en los números de coordinación hace que las correlaciones de reactividad con el radio iónico sean, en ocasiones difíciles de interpretar.<sup>94c</sup>

El radio iónico decrece al aumentar el número atómico (ver figura 34) y varía según el número de coordinación.

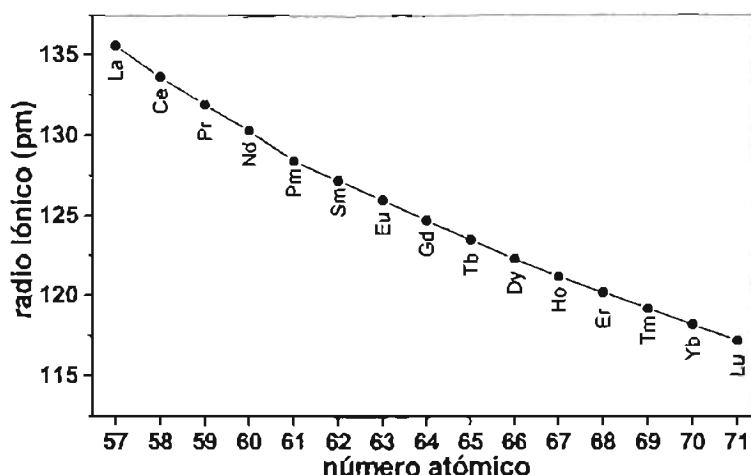


Fig 34. Radio iónico de los acuo-cationes  $\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_9^{3+}$ .

A este comportamiento se le llama contracción lantánida, y es causada por el aumento en la carga nuclear efectiva a lo largo del periodo. De manera contraria a lo que en algunos textos se afirma, los orbitales 5s y 5p (llenos) son los responsables de esta contracción y los orbitales 4f se oponen a ella.<sup>95</sup> Se ha informado que la disminución de los radios iónicos y las distancias de enlace calculadas obedecen a un decaimiento al menos cuadrático.<sup>96</sup>

Debido al balance entre las energías de ionización y la entalpía de hidratación, el estado de oxidación más estable en disolución acuosa de los lantánidos es III. Por medio de la reducción de Eu(III) se puede estabilizar Eu(II) (estabilización de capa semillena), el cual se oxida lentamente. De la misma forma, se pueden producir disoluciones de Sm(II) e Yb(II) (estabilización de capa llena), las cuales, sin embargo se oxidan más rápido. Ce(IV) es el único lantánido tetrapositivo de interés práctico. En disoluciones ácidas este estado de oxidación se conserva por días o hasta semanas, lo que hace posible el estudio de la reactividad de este ion.

En medio acuoso, los lantánidos en estado de oxidación III, no presentan afinidad por los ligantes poliamfónicos ni con amoníaco. Con los ligantes duros se forman complejos estables ( $\log K = 3.85 - 4.83$ , con  $F^-$ ). La estabilidad disminuye notablemente con ligantes menos duros ( $\log K \approx 0.3$ , con  $Cl^-$ ).

La estabilidad de los complejos depende del tamaño del ion, es decir de su acidez o dureza, como se observa en la gráfica de  $\log K$  contra el número atómico (Fig. 35).

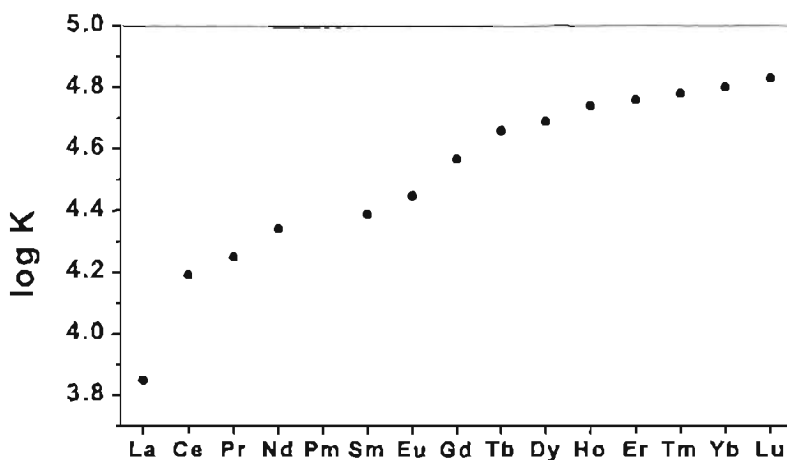


Fig 35. Constantes de estabilidad de los complejos  $LnF(H_2O)_n^{2+}$ .

La tendencia de las constantes de estabilidad no sigue exactamente el patrón de disminución de los radios iónicos. Se ha propuesto que la razón es que tanto el número de coordinación del acuaion como el del complejo son variables de un lantánido a otro.<sup>94a</sup>

La acidez de los acuaiones de los lantánidos(III) aumenta con el número atómico, ver la figura 36. ( $pK_a$  9.33 para  $La^{3+}$  y 8.17 para  $Lu^{3+}$ ).

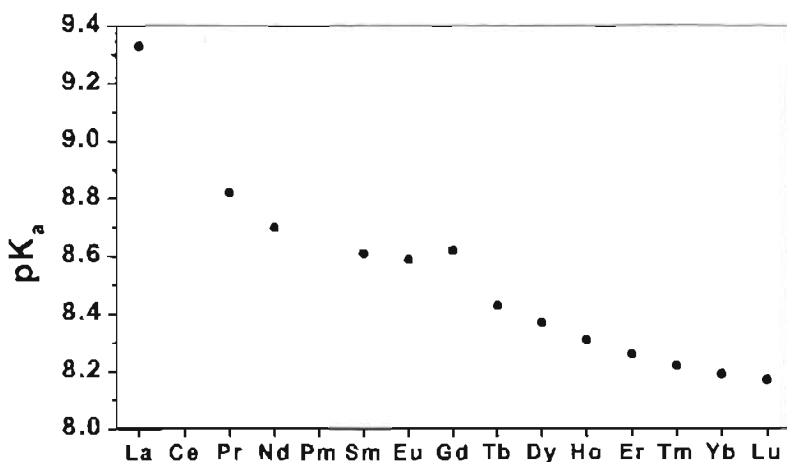


Fig. 36. Valores de  $pK_a$  de los acuo-iones de  $Ln(III)$ .

Aún para lantano, a valores ligeramente básicos de pH ya hay formación apreciable del complejo  $\text{Ln}(\text{OH})^{2+}$ . Se ha informado la existencia de complejos polinucleares, como lo son  $\text{Ln}_2(\text{OH})_2^{4+}$  y  $\text{Ln}_5(\text{OH})_9^{6+}$ ,<sup>97</sup> así como  $\text{La}_2(\text{OH})_5^+$ .<sup>98</sup>

Los valores de  $K_{PS}$  de los hidróxidos de los lantánidos son relativamente grandes, comparados con otros cationes trivalentes (ver figura 37). Sin embargo, el balance entre la acidez de los cationes y sus valores de  $K_{PS}$ , hace que los hidroxocomplejos de éstos se formen en cantidades muy pequeñas antes de la precipitación de los hidróxidos.

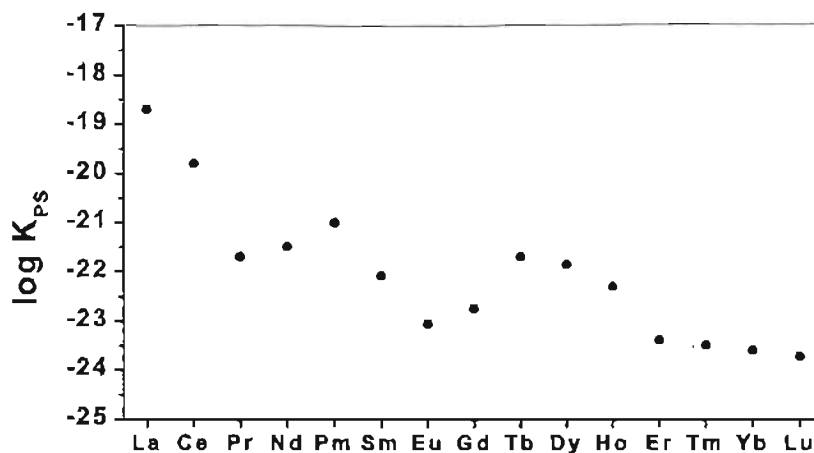


Fig. 37. Valores de  $\log K_{PS}$  de los hidróxidos de los lantánidos.

Con el fin de estabilizar las disoluciones básicas de los lantánidos, se han utilizado distintos tipos de ligantes. En particular se han utilizado ligantes quelatantes porque los complejos que forman los lantánidos son, en general débiles. A continuación se describe el tipo de ligantes utilizados, de los cuales, en la sección anterior se discutió la actividad fosfodiesterolítica de los complejos más representativos.

Los criptandos se coordinan a los lantánidos de manera no selectiva. En disolución acuosa el criptando [2.2.2] establece un equilibrio con el  $\text{Eu}(\text{III})$  en el cual cerca del 50% del ligante acepta en su interior al metal, aproximadamente el 30% forma un complejo tipo cazuela (figura 38a) y el resto del ligante permanece sin coordinarse.<sup>99</sup> Por su parte, el criptando [2.2.1] forma el complejo tipo cazuela (figura 38b).<sup>100</sup>



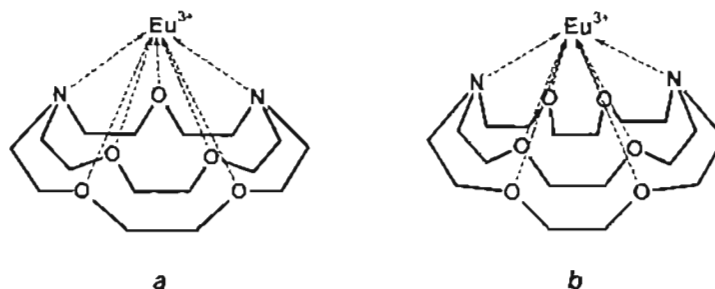


Fig. 38. Conformación de los complejos de europio con los criptandos [2,2,1] (a) y [2,2,2] (b).

A pesar de que los lantánidos no muestran afinidad por las poliaminas acíclicas, los complejos con macrociclos de nitrógeno son estables, el [18]anoN<sub>6</sub> (figura 39a) se coordina con los lantánidos, pero el 18-corona-6 no.<sup>94,101</sup> Si se introducen además grupos donadores por oxígeno, ya sean alcoholes o carboxilatos, la estabilidad de los complejos aumenta considerablemente. Se conocen complejos estables de los lantánidos con DOTA y análogos suyos (figura 39b).<sup>94d</sup>

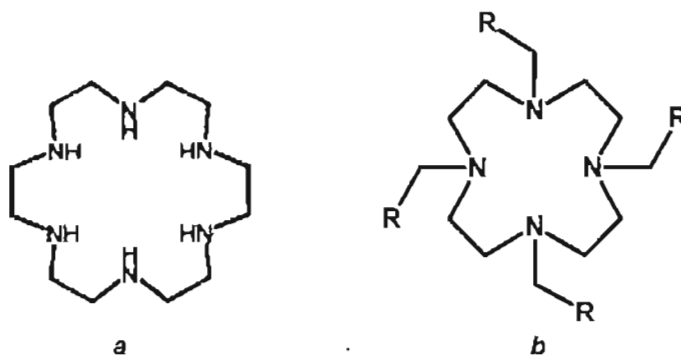


Fig. 39. Estructura de los ligandos 18anoN<sub>6</sub> (a) y DOTA (R = CO<sup>2-</sup>) y análogos suyos (R = CONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, CCH<sub>3</sub>OH) (b).

Los llamados *buffers* biológicos o de Good,<sup>82</sup> que pueden tener, además de grupo(s) amino, grupos carboxilato, polialcoholes (Tris,<sup>102</sup> Bis-Tris,<sup>103</sup> Bis-Tris Propano<sup>102b,104</sup>) o sulfonatos (MES, MOPSO, ACES, HEPES)<sup>100-105</sup> también forman complejos estables con los lantánidos. En medio básico forman hidroxocomplejos polinucleares,<sup>102b,104,105</sup> el estudio de los cuales es interesante desde el punto de vista hidrolítico por tener presente en la misma molécula uno o varios ácidos de Lewis y uno o varios nucleófilos coordinados.

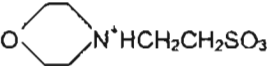
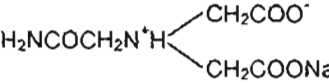

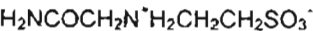
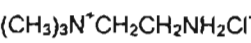


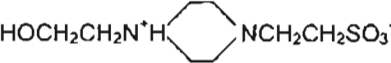
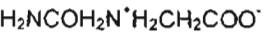
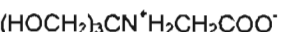

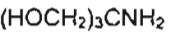


### 3.8 BICINA Y LIGANTES SIMILARES

Los anteriormente mencionados *buffers* de Good, se proponen para ser utilizados como amortiguadores de pH en sistemas biológicos en el intervalo de pH 6.15-8.35. En

general se trata de glicinas y taurinas sustituidas en el nitrógeno, que dan como resultado zwitteriones.

La justificación para esta propuesta se basa en el desempeño de estos compuestos en algunos sistemas biológicos y en las propiedades físicas que se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físicas de los *buffers* de Good.

Estructura	Nombre propuesto	pK <sub>a</sub> (20°C)	ΔpK <sub>a</sub> /°C	Solub. *	Const. de estabilidad log K <sub>M</sub>			
					Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
	MES	6.15	-0.011	0.65	0.8	0.7	0.7	-
	ADA	6.6	-0.011	-	2.5	4	4.9	9.7
	PIPES	6.8	-0.0085	-	-	-	-	-
	ACES	6.9	-0.020	0.22	0.4	0.4	-	4.6
	Cloruro de colamina	7.1	-0.027	4.2	-	-	-	-
	BES	7.15	-0.016	3.2	-	-	-	3.5
	TES	7.5	-0.020	2.6	-	-	-	3.2
	HEPES	7.55	-0.014	2.25	-	-	-	-
	Acetamidoglicina	7.7	-	Muy grande	-	-	-	-
	Tricina	8.15	-0.020	0.8	1.2	2.4	2.7	7.3
	Glicinamida	8.2	-0.029	4.6	-	-	-	-
	Tris	8.3	-0.031	2.4	-	-	-	-
	Bicina	8.35	-0.018	1.1	1.5	2.8	3.1	8.1
	Glicilglicina	8.4	-0.028	1.1	0.8	0.8	1.7	5.8

\* Solubilidad en agua a 0 °C expresada en mol/L.

Como se puede observar, en las 4 últimas columnas se presentan las constantes de estabilidad de estos compuestos con Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>.

De esta tabla resulta evidente que ADA, Tricina, Bicina y glicilglicina forman complejos estables, sobre todo con Cu<sup>2+</sup>. Dado lo anterior, resulta cuestionable la utilidad de estos *buffers* en presencia de iones metálicos.

La capacidad quelatante de ADA ante algunos cationes divalentes ( $M^{2+}$ ) se conoce desde 1955<sup>106</sup>, ( $M = Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb$ ). En estudios posteriores se confirma la estequiometría y estabilidad de estos complejos<sup>107</sup> y se propone la desprotonación del grupo amido para  $Co(ADA)_2$  y  $Zn(ADA)_2$ .<sup>107a</sup> También se han informado complejos ternarios con ADA como ligante principal.<sup>108</sup> Las estructuras de rayos-X de algunos complejos de ADA, muestran que éste actúa como un ligante tetradentado coordinado por los dos carboxilatos, por el nitrógeno y por el carbonilo del grupo amido.<sup>109</sup> La actividad fosfoesterolítica de los complejos de este ligante no es muy prometedora, ya que se ha comprobado que la presencia de dos carboxilatos, aunque promueve la coordinación con los lantánidos, generalmente los desactiva.

La glicilglicina también se coordina. Además de los complejos con  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , reportados por Good,<sup>82</sup> se conocen constantes de estabilidad para los complejos con  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ . Los valores de estas constantes son:  $\log K \approx 1$  para la glicilglicina protonada<sup>110</sup> y  $\log K(\text{condicional}) \approx 3$  para la formación del complejo con el ligante desprotonado.<sup>111</sup> A pesar de lo anterior, la glicilglicina no es un buen candidato para ser probado en la hidrólisis de fosfatos, ya que en presencia de algunos cationes y medios básicos, es susceptible de hidrolizarse y producir glicina.<sup>112</sup>

Aunque *tris* no es un ligante muy fuerte, algunos de sus complejos tienen actividad hidrolítica, como se discutió anteriormente.<sup>84</sup> Aunque estos no son muy estables, en medios básicos se desprotonan para dar lugar a complejos hidroxilo, los cuales son responsables de la actividad hidrolítica. Lo mismo ocurre con los complejos de *bis-tris* con lantano<sup>92</sup> y con los de *bis-tris-propano* con algunos lantánidos e itrio.<sup>84,85</sup>

Por lo anterior, surge el interés por complejos con ligantes de este tipo para hidrolizar ésteres de fosfato. Para estabilizar de manera más importante a los complejos de éstos con lantánidos, se puede introducir un grupo aniónico, esperando que la actividad hidrolítica no se vea afectada de manera importante, como ocurre al tener dos grupos aniónicos presentes.

Bicina, tricina y tes tienen este tipo de estructura. En 1991 Krishnamoorthy y Nakon cuestionan seriamente el desempeño de la bicina como buffer.<sup>113</sup> De hecho, las propiedades de la bicina como ligante se conocen desde los años cincuenta, época en la cual la bicina se utilizaba como agente secuestrante de  $Fe(III)$ . En 1953, se reportan las constantes de estabilidad para los complejos  $ML^+$  y  $ML_2$  de bicina con algunos metales divalentes.<sup>114</sup>

Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  tienen un comportamiento distinto. Con exceso de base, el complejo  $\text{Cu}(\text{bic})^+$  ( $\log K_{\text{ML}} = 8.15$ ) se hidroliza y da lugar al complejo  $\text{Cu}(\text{bic})\text{H}_{-1}$  ( $\log K_{\text{MLH-1}} = 13.35$ ). Se propone que en el complejo  $\text{Cu}(\text{bic})^+$ , la bicina actúe como un ligante tridentado, ya que la geometría plana cuadrada del ion  $\text{Cu}(\text{II})$  no permite la coordinación del segundo hidroxietilo. De este modo, la desprotonación se llevaría a cabo en el hidroxietilo coordinado, aunque muy probablemente también en agua coordinada, estableciéndose un equilibrio tautomérico entre estas dos especies. Un comportamiento similar se observa con  $\text{Zn}(\text{II})$ .

Con  $\text{Fe}(\text{III})$  la situación es muy distinta. El primer complejo que se forma es  $\text{Fe}(\text{bic})\text{H}_{-2}$  (debido a eso se le considera agente secuestrante). Aquí también se propone un tautomerismo entre los complejos hidroxilo y los alcoxo. Al ir a medios más básicos, el complejo se hidroliza nuevamente para dar lugar a  $\text{Fe}_2(\text{bic})_3\text{H}_{-6}$ . En este caso se propone que la desprotonación sea exclusivamente de los grupos alcoxo, con lo que cada  $\text{Fe}(\text{III})$  completa sus posiciones de coordinación con cuatro átomos donadores de un ligante terminal y dos de un puente.

En un artículo posterior, este mismo grupo estudia la interacción de varios ligantes, incluyendo bicina con  $\text{Zn}(\text{II})$ ,  $\text{Mn}(\text{II})$ ,  $\text{La}(\text{III})$ ,  $\text{Fe}(\text{III})$ ,  $\text{Cr}(\text{III})$ ,  $\text{Th}(\text{IV})$  y  $\text{Sn}(\text{IV})$ .<sup>115</sup> Informan la formación de un complejo  $\text{Cr}(\text{bic})\text{H}_{-2}$ , que presenta una posterior desprotonación para dar lugar a  $\text{Cr}(\text{bic})\text{H}_{-3}^-$ . Con respecto al  $\text{Fe}(\text{III})$ , no ratifican la existencia del complejo  $\text{Fe}_2(\text{bic})_3\text{H}_{-6}$ , ya que en las titulaciones 1:1 la formación de éste implicaría la liberación de un equivalente de  $\text{Fe}(\text{III})$  para formar  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  precipitado, el cual no se observa. Las titulaciones del sistema lantano-bicina indican la formación del complejo  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$ , con  $\log K_{\text{La}(\text{bic})} = 5.0$ .

Con aluminio se encontró que en medio ácido se forma el complejo de aluminio con bicina protonada ( $\text{AlH}(\text{bic})^{3+}$ ,  $\log K = 3.38$ ).<sup>116</sup> La interacción debe ser esencialmente entre el carboxilato y el aluminio. Al aumentar el pH, el complejo pierde tres protones para formar la especie  $\text{AlH}_2(\text{bic})$  ( $\log K = -13.72$ ). Se afirma que dos de estos protones provienen de los hidroxietilos, sin embargo no se presenta ningún tipo de argumentación que soporte esta afirmación. En la estructura propuesta, la bicina actúa como un ligante tetradentado, quedando dos posiciones de coordinación solvatadas. A falta de evidencia adicional, no es posible descartar que el agua coordinada en esas posiciones se desprotona, formando un hidroxocomplejo.

Kostromina y Romanenko, entre 1970 y 1974 estudian la interacción de bicina con los lantánidos en mezclas agua-metanol en distintas proporciones.<sup>117</sup> Las constantes de formación del complejo 1:1 en agua se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Constantes de formación de los complejos  $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$ .

$\text{Ln}^{3+}$	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Yb	Lu
$\log K_{\text{Ln}(\text{bic})}$	4.84	5.22	5.44	5.57	5.74	5.7	5.59	5.53	5.49	5.43	5.39	5.45	5.46

Por medio de estudios de  $^1\text{H}$  RMN, con un equipo de 60 MHz, determinan la constante de formación del complejo  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$ .<sup>118</sup> El valor obtenido ( $\log K = 4.61$ ) es muy cercano al obtenido potenciométricamente. En las condiciones que utilizaron ( $\text{LaCl}_3$  0.1 M y bicina 0.2 M) el sistema se mantiene sin precipitación hasta  $\text{pH} = 13$ . Para justificar lo anterior proponen la formación de complejos hidroxilo o alcoxilo.

En 1981, se presentó nuevamente un estudio potenciométrico de la formación de complejos de bicina con lantánidos.<sup>119</sup> Los complejos encontrados son  $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$  y  $\text{Ln}(\text{bic})_2^+$ . Los valores de las constantes de formación para el complejo 1:1 son muy similares a los previamente informados. En la figura 40 se muestra la variación de los valores de constante de estabilidad de ambos complejos a lo largo de la serie de los lantánidos, y la comparación con otros ligantes.

El valor de la constante de formación para el complejo  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$  en este artículo (4.99) coincide con los anteriormente reportados (4.61-5.0). Los valores de las constantes de bicina y de su análogo de alanina son ca. dos órdenes de magnitud menores que con iminodiacetato. La estabilidad del primer complejo aumenta de La hasta Eu, en Gd hay una pequeña caída y luego permanecen casi constantes hasta Lu.

Para el segundo complejo, la estabilidad aumenta de La hasta Tb y luego decrece hasta Lu. El decremento de las constantes de estabilidad para los últimos cationes de la serie se explica por un aumento en el impedimento estérico al disminuir el radio iónico. Las constantes de estabilidad con glicina son mucho menores, lo que apoya la intervención de los hidroxietilos en la quelatación. En este artículo no se menciona el comportamiento de los sistemas en medios básicos, ya que este no era el objetivo del trabajo.

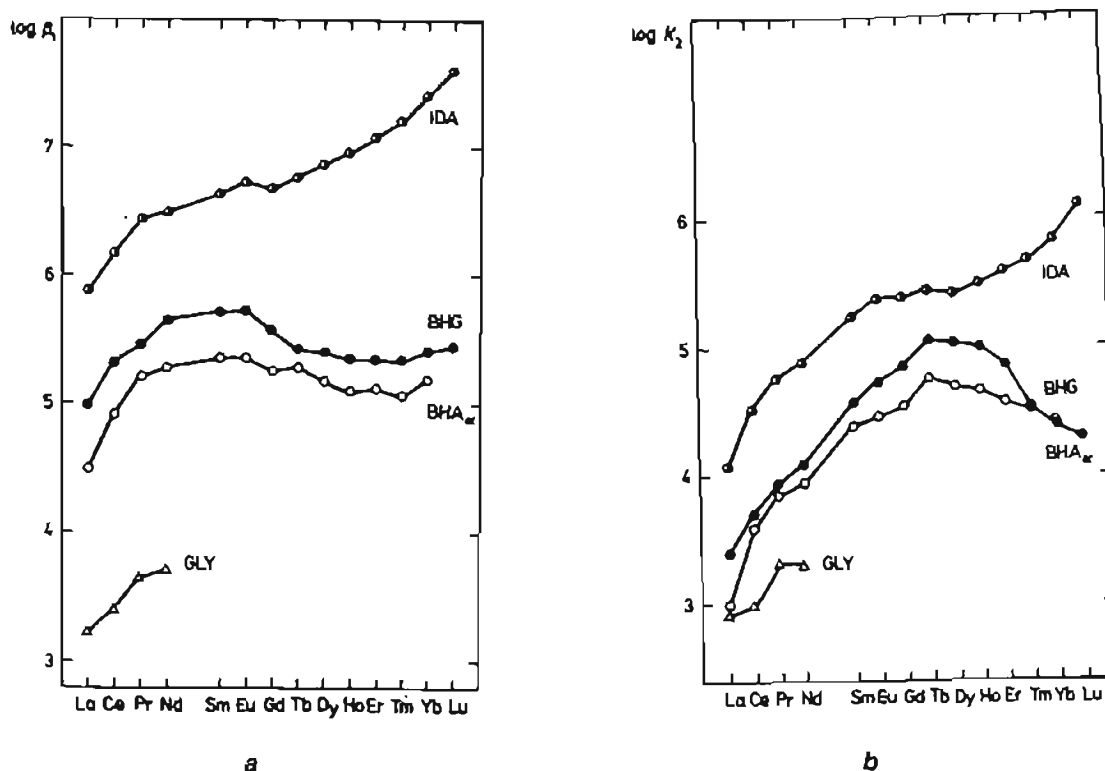


Fig. 40. a) Constantes de estabilidad de los complejos LnL. b) Constantes de estabilidad de los complejos LnL<sub>2</sub>. (IDA = iminodiacetato, BHG = bicina, BHA $\alpha$  =  $\alpha$ -bis(hidroxiethyl)alanina, GLY = glicina)

Hasta ahora, se ha demostrado que la bicina tiene una mayor utilidad práctica como ligante que como *buffer*. Al comparar la estabilidad de sus complejos con los de glicina, resulta lógico pensar que esto se debe a la coordinación de los grupos hidroxiethyl, los cuales además, en medios básicos pueden llegar a desprotonarse, para formar complejos alcoxido. Sin embargo en los trabajos revisados estas dos ideas no han sido probadas.

Para demostrar la coordinación de los grupos hidroxiethyl, Sigel y sus colaboradores llevan a cabo un estudio en el cual la constante de formación de los complejos 1:1 de bicina con Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> es separada en constantes según el número de posiciones de coordinación que ocupa la bicina.<sup>120</sup>

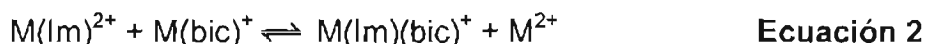
A partir de las constantes obtenidas, se calcula el porcentaje de cada tipo de complejo de bicina coordinada, según el número de átomos donadores. (ver tabla 5)

Tabla 5. Distribución de los modos de coordinación de la bicina en los complejos con algunos metales divalentes.

M <sup>2+</sup>	%M(bic) bidentado	%M(bic) tridentado	%M(bic) tetradentado
Mn	0.79	18	81
Co	0.32	12	88
Ni	0.32	12	88
Cu	0.79	39	60
Zn	0.40	14	86

Con esos resultados se plantea que la bicina además de ser un buen ligante, sus complejos pueden estar interconvirtiéndose en un equilibrio dinámico. En otras palabras estos complejos “*respiran*”. Esto último es importante, ya que la coordinación-descoordinación de grupos donadores débiles es similar a lo que ocurre en las metaloenzimas, por lo que estos complejos podrían considerarse modelos enzimáticos muy simples.

Sigel<sup>121</sup> demuestra que la bicina es capaz de formar complejos ternarios con imidazol y los mismos cationes metálicos que en el caso anterior. El equilibrio involucrado se describe a continuación.



Llama la atención el caso del zinc, en el cual el equilibrio se encuentra desplazado hacia los productos. La explicación es que al coordinarse con imidazol, el zinc tiene un número de coordinación menor, 4 ó 5, permitiendo la posterior coordinación de la bicina.

El primer estudio de complejos de bicina en estado sólido fue por medio de análisis elemental, espectroscopía de infrarrojo, reflectancia difusa, espectroscopía electrónica, susceptibilidad magnética y análisis térmico.<sup>122</sup> En la tabla 6 se muestran los complejos informados y la geometría propuesta.

Tabla 6. Estructuras\* propuestas para complejos de bicina con algunos metales divalentes.

Complejo	Estructura	Complejo	Estructura
Ni(bic) <sub>2</sub>	a	Cu(bic) <sub>2</sub>	b
Co(bic) <sub>2</sub>	a	Cu(bic) <sub>2</sub> Cl	d
Zn(bic) <sub>2</sub>	a	Cd(bic) <sub>2</sub> Cl·H <sub>2</sub> O	c
Fe(bic) <sub>2</sub>	a	Pb(bic)(NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	c

\*Los esquemas de estas estructuras se muestran en la figura 41.

La geometría se propone con base en la interpretación de los espectros de infrarrojo.

La capacidad coordinante de los hidroxietilos de la bicina ha sido comprobada por medio del estudio de cristales por espectroscopía de rayos-X. Las estructuras presentadas son principalmente con cobre como metal central. En ellas el cobre presenta números de coordinación 5 y 6, y ambos hidroxietilos se encuentran coordinados, como lo había anticipado Sigel.<sup>123</sup>

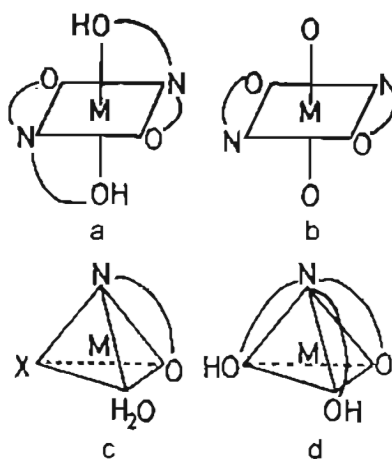


Fig 41. Estructuras a las que se refiere la tabla 6.

Al utilizar percloratos en vez de cloruros,<sup>124</sup> el fragmento Cu-bic es similar al del caso anterior, pero la quinta posición de coordinación la ocupa un carboxilato de la unidad vecina. Con isocianato, el complejo formado es octaédrico.<sup>125</sup> En las posiciones ecuatoriales se encuentran el nitrógeno, un hidroxietilo y el carboxilato del ligante, así como el nitrógeno del isocianato. En las posiciones axiales están el otro hidroxietilo del ligante y el azufre del isocianato. Con bromuro se presentan dos estructuras. La primera es una bipirámide



trigonal, análoga a la de cloruros. La segunda además tiene una molécula de agua coordinada, formando un octaedro distorsionado.<sup>126</sup>

Recientemente se informaron las estructuras cristalinas de algunos complejos de bicina con lantánidos. Inomata, Takei y Howell presentan la caracterización de los complejos  $[\text{Ln}(\text{bic})_2]\text{X}$  ( $\text{Ln} = \text{La}(\text{III}), \text{Nd}(\text{III}), \text{Ce}(\text{III})$  y  $\text{X} = \text{Cl}^-, \text{CH}_3\text{COO}^-$ ) en estado sólido por medio de análisis elemental, análisis térmico, susceptibilidad magnética y espectroscopía de IR.<sup>127</sup> También se presenta la estructura cristalina del complejo  $[\text{La}(\text{bic})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (fig. 42a). El número de coordinación es de 9, formando un prisma trigonal distorsionado centrado en las caras. Hay cuatro átomos donadores por cada bicina y la posición restante es ocupada por un oxígeno del carboxilato de la bicina de la unidad vecina. Lo anterior se confirma por espectroscopía de IR, ya que se observan bandas para dos carboxilatos distintos, uno monodentado y uno bidentado.

Posteriormente, Messimeri *et al.* informan la caracterización de los complejos  $[\text{Ln}(\text{CH}_3\text{COO})(\text{bic})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{phen}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  para  $\text{Ln} = \text{Gd}(\text{III}), \text{Er}(\text{III}), \text{Pr}(\text{III})$  y  $\text{Nd}(\text{III})$ .<sup>128</sup> Se propone que los complejos de erbio y gadolinio sean isoestructurales, por la similitud de los espectros de IR. La estructura cristalina obtenida por difracción de rayos-X del complejo  $[\text{Gd}(\text{CH}_3\text{COO})(\text{bic})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{phen}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se muestra en la fig 42b.

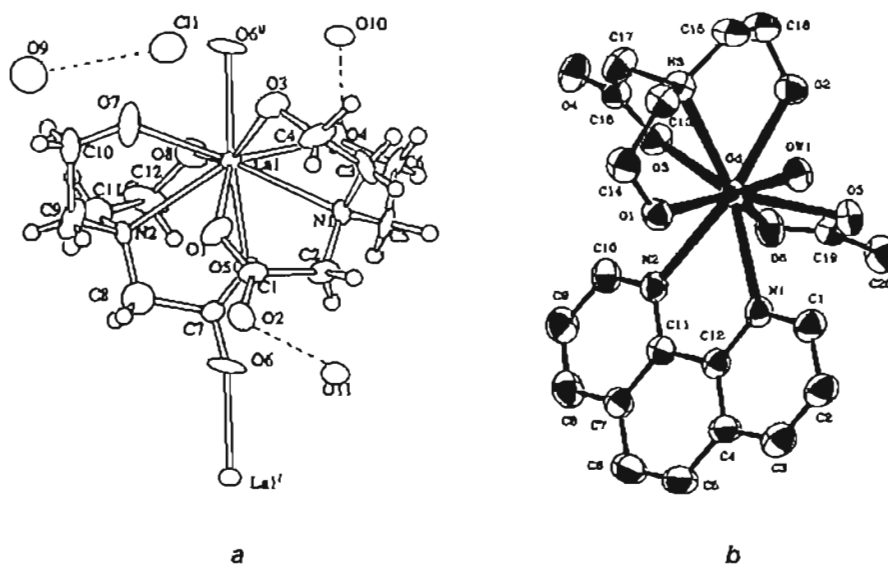


Fig 42. Estructuras cristalinas de los complejos  $[\text{La}(\text{bic})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (a) y  $[\text{Gd}(\text{CH}_3\text{COO})(\text{bic})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{phen}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (b).

Con base en las estructuras cristalinas para complejos de bicina (las propias y las previamente reportadas) hacen un resumen de los modos de coordinación de la bicina, el cual se presenta a continuación (tabla 7).

Tabla 7. Modos de coordinación de la bicina\* en algunos complejos.<sup>128</sup>

Complejo	Geometría	Modo de coord. de la bicina
[CuCl(bicH <sub>2</sub> )]	tbp	I
[Cu(bicH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> (ClO <sub>4</sub> ) <sub>n</sub> · n H <sub>2</sub> O	tbp	III
[Cu(NCS)(bicH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · n H <sub>2</sub> O <sup>b</sup>	doct	I
[CuBr(bicH <sub>2</sub> )]	tbp	I
[CuBr(bicH <sub>2</sub> )(H <sub>2</sub> O)]	doct	I
[Cu(bicH <sub>2</sub> )(Bz)](ClO <sub>4</sub> )	tbp	I
[Cu(bicH <sub>2</sub> )(Iq)](ClO <sub>4</sub> )	sp	I
[Cu(bicH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	doct	II
[Ni(bicH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	oct	II
[MnCl(bicH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · 2n H <sub>2</sub> O	doct	III
[Mn(bicH <sub>2</sub> )(H <sub>2</sub> O)] <sub>2n</sub> (Br) <sub>2n</sub> · 2n H <sub>2</sub> O	pbp	IV
[Gd(O <sub>2</sub> CMe)(bicH <sub>2</sub> )(phen)(H <sub>2</sub> O)](ClO <sub>4</sub> ) · phen · 3H <sub>2</sub> O	tp	I

\* Los modos de coordinación de la bicina se presentan en la figura 43.

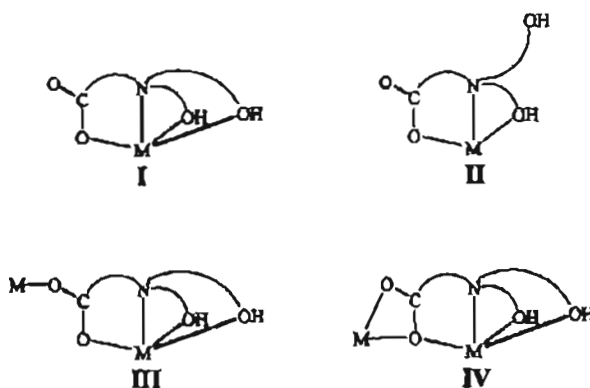


Figura 43. Modos de coordinación a los que se refiere la tabla 7.

Además de los informados por Good, existen otros complejos de tricina (tric). Por ejemplo, con estudios de potenciometría se informaron los complejos 1:1 y 1:2 de tricina con Th<sup>4+</sup>, UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Ce<sup>3+</sup> y La<sup>3+</sup>.<sup>129</sup> Los valores de estas constantes disminuyen en el orden en el que están listados los cationes. Para lantano los valores son log K<sub>ML</sub> = 5.02 y log K<sub>ML2</sub> = 4.21. Se menciona además, que estos complejos son proclives a la

desprotonación; con lantano se propone la presencia de los complejos  $\text{La}(\text{tric})\text{H}_1$  y  $\text{La}(\text{tric})_2\text{H}_2$ . Se presume que la desprotonación se lleve a cabo en un alcohol coordinado.

En un trabajo más reciente los datos anteriores se reproducen y se incluye información para los complejos de tricina con  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ .<sup>130</sup> Nuevamente se menciona la hidrólisis de los complejos formados y no se presentan las constantes para estos equilibrios.

El TES, otro de los buffers de Good, es muy similar a la tricina. En vez del grupo carboxilato, tiene un  $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ . Lo anterior lo hace menos coordinante, como puede observarse en la tabla que presenta Good. De hecho, en la literatura las referencias de complejos metálicos de TES y otros sulfonatos son escasas. Incluso se ha propuesto una serie de compuestos de este tipo como "*buffers no coordinantes*" para sustituir a los "*buffers de Good*".<sup>131</sup>

## **4. HIPÓTESIS**

- Algunos aminoalcoholes son capaces de estabilizar disoluciones ligeramente básicas de lantánidos. Si se introduce un grupo aniónico, deberán producirse disoluciones más estables, lo que nos permitirá ir a valores de pH mayores.
- En medios básicos, los complejos formados se desprotonarán, produciéndose un nucleófilo potencial.
- Los complejos desprotonados interactuarán con el BNPP de dos maneras: el lantánido(III) atraerá al BNPP y el nucleófilo generado en el complejo atacará al fósforo, provocando la hidrólisis del BNPP:

## 5. OBJETIVOS

Como ya se ha descrito en los antecedentes, la hidrólisis de ésteres de fosfatos es un área de investigación creciente y muy importante desde un punto de vista práctico. Además, también lo es desde el punto de vista de generación de conocimiento, ya que el entendimiento de estos sistemas puede ayudarnos a comprender el funcionamiento de las nucleasas y de las fosfatasas en general.

Debido a la actividad que los iones de lantánidos presentan hacia la hidrólisis de ésteres de fosfato, se decide utilizarlos ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  y  $\text{Eu}^{3+}$ ) para diseñar sistemas eficientes en este aspecto. El problema de la baja solubilidad de las especies hidroxó en agua se pretende salvar mediante la utilización de ligantes adecuados (BICINA; TRICINA; TES), los cuales deberán producir especies lo suficientemente estables como para obtener concentraciones apreciables en disolución acuosa a valores elevados de pH y que al mismo tiempo sean activas desde el punto de vista hidrolítico.

Debido a que el bis *p*-nitrofenilfosfato tiene una reactividad mayor que el ADN, pero menor que la del ARN, se utilizará como sustrato modelo. Este reactivo es comúnmente utilizado como modelo por las razones antes mencionadas, además de que su hidrólisis da como producto a un grupo cromóforo, lo que hace que el seguimiento de la aparición del producto sea muy sencillo por medio de espectrofotometría UV-Visible.

Con lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

- Por medio de estudios potenciométricos identificar las especies presentes entre los iones de lantánidos ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  y  $\text{Eu}^{3+}$ ) y los ligantes BICINA, TRICINA y TES en disolución acuosa; y caracterizarlas espectroscópicamente.

- Probar la eficiencia de los sistemas  $\text{Ln}^{3+}$ /ligante en diferentes condiciones de concentraciones, pH, temperatura y fuerza iónica como promotores de la hidrólisis de ésteres de fosfatos.
- Por medio de estudios cinéticos determinar la(s) especie(s) responsable(s) de la actividad hidrolítica.
- Proponer mecanismos de reacción para la hidrólisis de los sustratos.

## **6. PARTE EXPERIMENTAL**

### **6.1 SUSTANCIAS**

**Agua:** destilada y desionizada con resistividad mayor o igual a  $18.2 \pm 0.1 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ , obtenida mediante el sistema Barnstead Nanopure.

**Perclorato de lantano, praseodimio, neodimio, europio e itrio:** (Aldrich) Disoluciones acuosas al 40% m/m.

**N,N-Bis-(2-hidroxietil)-glicina (bicina):** (Fluka) grado reactivo, 99.5%.

**N-[Tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetan-sulfonato de sodio (TES):** (Fluka) grado reactivo, 99%.

**N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina (tricina):** (Fluka) grado reactivo, 99.5%.

**Tris[hidroximetil]aminometano (tris):** (Sigma) grado reactivo, 99%.

**Perclorato de sodio:** (Aldrich) grado reactivo, 99%.

**Ácido perclórico:** (J.T.Baker) grado reactivo, 69-72% v/v.

**Hidróxido de sodio:** (Sigma) perlas anhidras grado reactivo, 98%.

**Bis 4-nitrofenil fosfato de sodio (BNPP):** (Aldrich) grado reactivo, 99%.

**4-nitrofenil fosfato de tris[hidroximetil]amonometano monohidratado (MNPP):** (Sigma) grado reactivo, 99%.

**4-nitrofenol:** (Sigma) grado reactivo 99%.

**D<sub>2</sub>O:** (Aldrich) 99.9% D.

**NaOD:** (Aldrich) 40% m/v en D<sub>2</sub>O 99% D.

**DCI:** (Aldrich) 35% m/v en D<sub>2</sub>O 99% D.

**Biftalato de potasio:** (Aldrich) Estándar acidimétrico de la A.C.S. 99.95-100.05%

**Fenolftaleína:** (Aldrich) grado reactivo.

**Sal de sodio de anaranjado de xilenol:** (Aldrich) grado reactivo.

## 6.2 METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES Y EQUIPO UTILIZADO

### 6.2.1 Preparación de disoluciones

Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de disoluciones *stock* independientes de metal y de ligante. El orden de adición fue: disolución de ligante, amortiguador, sosa (hasta un valor de pH ligeramente superior al deseado), agua desionizada y finalmente la disolución de la sal metálica. Las disoluciones de ligante se prepararon pesando la cantidad calculada en una balanza OHAUS y después disolviendo en agua desionizada y aforando en un matraz volumétrico de 5, 10 ó 25 mL. Las disoluciones de amortiguador se prepararon de la misma manera. Las disoluciones de la sal metálica se prepararon midiendo la cantidad calculada de disolución 40% en peso con micropipetas Eppendorf calibradas y aforando con agua desionizada en matraces volumétricos de 5, 10 ó 25 mL. Las disoluciones de sustrato se prepararon igual que las de ligante.

### 6.2.2 Estandarización de disoluciones

Metales: Las disoluciones utilizadas de percloratos de lantano(III), praseodimio(III), neodimio(III), europio(III) e itrio(III) fueron preparadas a partir de las disoluciones comerciales de Aldrich 40% m/v. La concentración exacta de éstas fue determinada por medio de titulación complejométrica utilizando anaranjado de xilenol como indicador.<sup>132</sup> Estos experimentos se hicieron por triplicado.

Sosa: Para los experimentos de cinética y las titulaciones espectrofotométricas se utilizaron disoluciones frescas de hidróxido de sodio libre de carbonatos para ajustar los valores de pH. Como en estos casos el objetivo era fijar el valor de pH, las disoluciones utilizadas no fueron valoradas. Lo mismo ocurrió con la disolución de deuteróxido de sodio utilizada para fijar valores de pD en los experimentos de  $^1\text{H}$  RMN. En las titulaciones potenciométricas la concentración de la disolución titulante fue determinada valorando con biftalato de potasio y utilizando fenolftaleína como indicador. Para cada disolución se hicieron al menos tres determinaciones, los resultados de éstas variaron en menos de un 2%.

Ácido perclórico: En las titulaciones potenciométricas se utilizó ácido perclórico para comenzar la titulación desde la zona ácida. La concentración de la disolución *stock* de ácido



fue determinada titulando con sosa valorada. Los resultados de estas titulaciones se ajustaron a la ecuación 3.<sup>133</sup>

$$V = \frac{V_{eq} C_B + V_0 K_w 10^{pH} - V_0 f 10^{-pH}}{C_B + f 10^{-pH} - K_w 10^{pH}}$$

Ecuación 3

Donde:

$V$  = volumen de titulante

$V_0$  = volumen inicial

$pH$  = valor tomado directamente del potenciómetro

$f$  = factor de corrección por los coeficientes de actividad y el potencial de membrana del electrodo

$C_B$  = concentración del titulante

$K_w$  = constante de autodisociación del agua

$V_{eq}$  = volumen en el punto de equivalencia

En la figura 44 se muestra un ejemplo de ajuste.

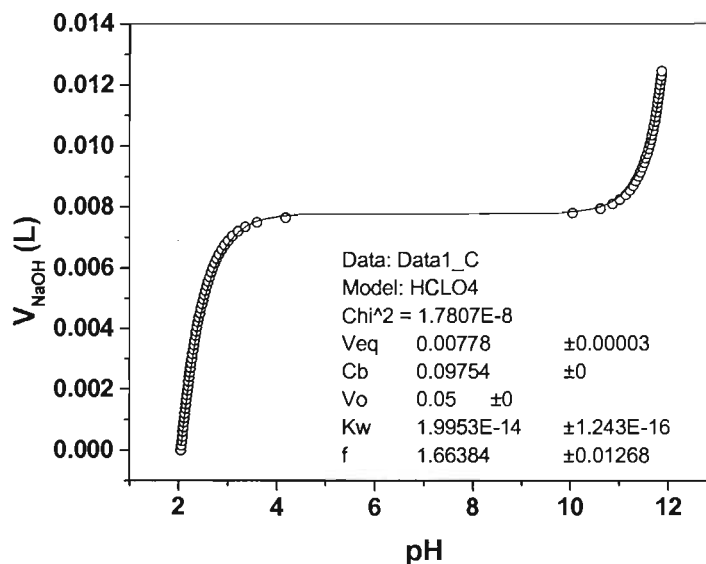


Fig. 44. Valoración y ajuste de una disolución de HClO<sub>4</sub>.

Los valores de  $K_w$ ,  $f$  y  $V_{eq}$  se utilizan como parámetros de ajuste. Con los valores de  $C_B$ ,  $V_{eq}$  y el volumen inicial de ácido se calcula la concentración inicial del ácido, como se muestra en la ecuación 4. Para el caso mostrado arriba, el volumen de HClO<sub>4</sub> concentrado fue de 70 μL, diluidos a 50 mL de volumen total de disolución. La fuerza iónica se ajustó a 0.1 M con perclorato de sodio. (ver sección 10.7)

$$C_{HClO_4} = \frac{C_{NaOH} V_{eq}}{V_{HClO_4}} = \frac{0.09754 \frac{\text{mol NaOH}}{\text{L NaOH}} \cdot 0.00778 \text{ L}_{NaOH}}{0.7 \times 10^{-4} \text{ L}_{HClO_4}} = 10.84 M_{HClO_4} \quad \text{Ecuación 4}$$

El propósito de este experimento es comprobar que la calibración del electrodo sea correcta (el desplazamiento de la escala del pH se manifiesta en un valor de  $f$  (ver ecuación 3) significativamente diferente a 1 y/o en un valor de  $pK_W$  diferente al reportado  $pK_W=13.8$  para fuerza iónica 0.1 y  $25^\circ\text{C}^{134}$ ) y comprobar la ausencia de carbonato en la disolución de base (en presencia de carbonato de sodio la curva experimental es asimétrica con una desviación de la curva teórica a valores de pH superiores a 7).

### 6.2.3 Titulaciones potenciométricas

Las titulaciones potenciométricas<sup>85</sup> se hicieron en una celda de vidrio de 75 mL, termostatada a  $25^\circ\text{C}$  y con burbujeo constante de nitrógeno. Se prepararon disoluciones de concentraciones conocidas de sal metálica, ligante y ácido fuerte en agua desionizada. La fuerza iónica se mantuvo a 0.1 M con perclorato de sodio. Se tituló adicionando pequeñas cantidades de disolución valorada (*vide supra*) de hidróxido de sodio.

Las adiciones se hicieron mediante un adicionador *TITRONIC 96*, de SCHOTT. La precisión del adicionador fue verificada pesando adiciones de distintos volúmenes de agua destilada. El adicionador permite adiciones de 0.01 mL de disolución titulante.

Después de cada adición se esperó a obtener un valor constante de pH y entonces se registró ese valor junto con el volumen adicionado. Las titulaciones se realizaron desde valores de pH cercanos a 2 y hasta antes de la precipitación, la cual se producía a valores variables, dependiendo del metal, del ligante y de las concentraciones de éstos.

El potenciómetro utilizado fue el *710A* de ORION con precisión de  $\pm 0.005$  unidades de pH y el electrodo fue un electrodo combinado de vidrio Aldrich.

El electrodo se calibró con disoluciones Aldrich amortiguadoras estándar de 4.00, 7.00 y  $10.00 \pm 0.01$  unidades de pH. Los valores de pH leídos fueron ajustados por el factor  $f$  (*vide supra*), el cual corrige por cambios en la actividad de los protones, según las condiciones de trabajo.

Para obtener las constantes de equilibrio, los datos se trataron con el software *Hyperquad 2000*, versión NT.<sup>133c</sup> El valor de  $K_W$  se obtuvo de la titulación de ácido fuerte. Se probaron diferentes modelos hasta obtener el ajuste óptimo.

Los diagramas de distribución de especies y las concentraciones de las distintas especies se calcularon con el programa *Species Ver. 0.8 Academic Software 1999* y con *Hyperquad Simulation and Speciation (HySS2)*, de Protonic Software, 2000©.

#### 6.2.4 Titulaciones espectrofotométricas

Se prepararon 10 mL de disoluciones de neodimio-bicina en relaciones 5 mM:5 mM y 5 mM:2.5 mM en agua desionizada. Debido a que el coeficiente de extinción molar de las bandas de interés del neodimio (560 a 600 nm) es pequeño ( $\sim 6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) se utilizó un paso óptico de 4 cm). Después de registrar cada espectro se juntaba la disolución y se agregaba una pequeña alícuota de hidróxido de sodio concentrado, para evitar el efecto de dilución. A la disolución con el nuevo valor de pH, superior al anterior, se le registraba nuevamente el espectro correspondiente.

Para estos casos el equipo utilizado fue un UNICAM *UV 50C*, con software *Vision 32*. El intervalo fue de 190 a 895 nm, con un ancho de banda de 1 nm. Se eligió la velocidad denominada como *Intelliscan*, el intervalo de los datos fue marcado como *High resolution* y el cambio de lámpara se fijó en 325 nm.

#### 6.2.5 Titulaciones por RMN de $^1\text{H}$

Los experimentos de  $^1\text{H}$  de resonancia magnética nuclear se realizaron en un espectrómetro Varian Gemini de 300 MHz. Las disoluciones se prepararon disolviendo la cantidad necesaria de ligante en  $\text{D}_2\text{O}$  y agregando la cantidad requerida de disolución de perclorato de lantano comercial de Aldrich.

Para ajustar los valores de pH, se utilizaron disoluciones de NaOD y DCl en  $\text{D}_2\text{O}$ . Los tubos de resonancia fueron Aldrich de 5 mm. Como estándar se tomó la señal de  $\text{H}_2\text{O}$  en 4.68 ppm. Para obtener los valores de pD, a los valores de pH se le sumó 0.4 ppm.<sup>135</sup> Para realizar estas mediciones se utilizó un potenciómetro CONDUCTRONIC *pH 120*. El

electrodo fue un microelectrodo combinado de vidrio de Aldrich, con el cual se midió el valor de pD de cada disolución antes de correr el experimento de resonancia magnética nuclear.

Los espectros fueron tratados con el programa *NutsPro* para Windows 95/NT2D, versión profesional.

### 6.2.6 Cinéticas

La reacción monitoreada fue la ruptura del BNPP para producir dos equivalentes de nitrofenol en dos etapas consecutivas. Se midió la aparición del nitrofenolato a 400 nm. El nitrofenolato tiene un equilibrio de protonación con  $pK_a$  de 7 (Fig. 45). Este equilibrio fue tomado en cuenta en los cálculos de constante de velocidad observada.

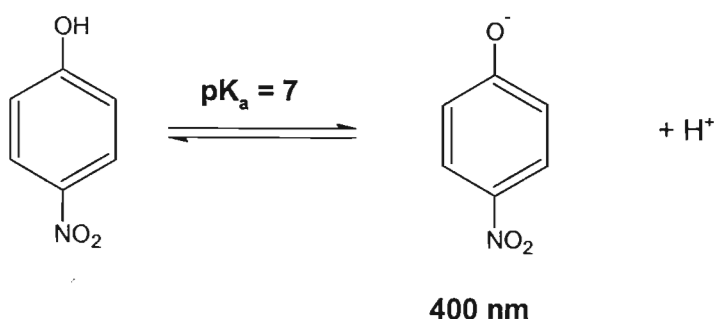


Fig. 45. Equilibrio de desprotonación del nitrofenolato.

Las disoluciones de BNPP se preparaban, se utilizaban y se desechaban después de dos o tres semanas (antes, si espectrofotométricamente se observaba algún indicio de degradación). El intervalo de concentraciones fue entre  $2 \times 10^{-5}$  y  $4 \times 10^{-5}$  M.

Los experimentos cinéticos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden por un exceso de metal/ligante (5 mM/2.5-5 mM) sobre el sustrato. La fuerza iónica se controló con perclorato de sodio 0.1 M. El pH de las disoluciones se midió con un potenciómetro ORION 420A y un semimicroelectrodo combinado de vidrio ORION ROSS. En algunas corridas se utilizó TRIS 10 mM para amortiguar el pH de las disoluciones.

Las constantes de velocidad observadas (de pseudo-primer orden) se calcularon por medio del método de velocidades iniciales para las reacciones lentas y por el método integral para primer orden en reacciones rápidas.

Se utilizó el espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos y sistema de control de temperatura externo ISOTEMP 1006S de Fischer Scientific, con precisión de  $\pm 0.1$  °C.

Las lecturas se iniciaron inmediatamente después de la adición del sustrato. Se tomaron espectros en la región de 200 a 900 nm cada 30 ó 60 segundos durante 14000 segundos. En algunos casos, si ya no se observaban cambios, la cinética se detuvo antes del final. El pH final se midió para garantizar las mismas condiciones durante toda la corrida y se eliminaron aquellos experimentos en los cuales el pH final variaba del inicial en 0.1 unidades de pH o más.

### **6.2.7 Modelos y cálculos matemáticos**

Para los casos en los que se utilizó un software especial para obtener algún valor o diagrama, se especificará cual y se discutirá sobre su validez.

En los casos en que no se utilizó un software especial, la ecuación matemática correspondiente se desarrolló (ver secciones 10.1-10.3) o se tomó de la literatura y se introdujo en *Microcal Origin* versión 5.0 como ajuste no lineal. Posteriormente se iteró hasta obtener el mejor ajuste (menor  $\chi^2$ ). Cuando la expresión manejó parámetros conocidos, éstos se introdujeron como tales en la ecuación o bien, se pusieron como parámetros y se fijaron al hacer el ajuste.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Estudios Potenciométricos

En numerosos trabajos sobre la hidrólisis de fosfodiésteres se informa la actividad catalítica del sistema en las condiciones de trabajo. En esos trabajos no queda claro qué especie es la responsable de dicha actividad, ni cuál es el mecanismo y por lo tanto no se presenta una constante de velocidad real. Por medio de titulaciones potenciométricas se pueden obtener las constantes de formación de las especies y con ellas calcular la concentración en las condiciones de la cinética. Con lo anterior es posible dilucidar el mecanismo de reacción y calcular la constante de velocidad real, la cual es un parámetro con el que se puede evaluar la capacidad hidrolítica de una especie y así discutir sobre las condiciones óptimas de trabajo y por lo tanto de las limitaciones del sistema. Además, podemos comparar directamente la capacidad hidrolítica de las especies y especular sobre lo exitoso o no del diseño.

Por lo anterior es indispensable llevar a cabo titulaciones potenciométricas, como las que se describen a continuación.

#### 7.1.1 Bicina

A pesar de que la bicina es una sustancia muy utilizada por los bioquímicos como *buffer*, hay evidencia de que interactúa de manera importante con los iones metálicos y en particular con los lantánidos, como se describió en los antecedentes.

Se llevó a cabo la titulación de bicina 0.01 M en presencia de  $\text{NaClO}_4$  0.1 M y 0.78 equivalentes de  $\text{HClO}_4$  a 25 °C. (Fig. 46)

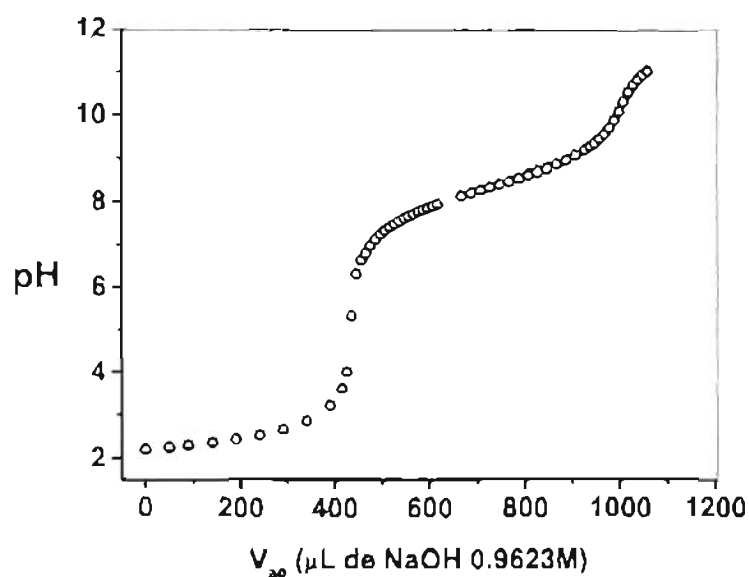


Fig. 46. Curva de titulación de bicina 0.01 M ( $V_0 = 50$  mL).

El análisis de la titulación se hizo por medio de *Hyperquad 2000*. A los valores de pH medidos se les restó 0.221 unidades de pH, que es el valor de  $\log f$  (ver ecuación 3), el valor de  $K_w$  se tomó del ajuste de la titulación de ácido fuerte. Este mismo procedimiento se aplicará a todas las titulaciones realizadas en este trabajo.

Los valores de  $pK_a$  calculados por el programa son 1.4736 y 8.2334. Estos valores y los presentados en la literatura se resumen en la tabla 8:

Tabla 8. Comparación de los valores de  $pK_a$  obtenidos y reportados de la bicina.

	Este trabajo ( $T=25$ °C, $I=0.1$ M)	Catálogo Aldrich ( $T=20$ °C)	Catálogo Fluka ( $T=20$ °C)	Martell <sup>10b</sup> ( $T=25$ °C, $I=0$ M) ( $T=20$ °C, $I=0.1$ M)
$pK_{a1}$	1.47	-	-	-
$pK_{a2}$	8.23	8.35	8.3	8.334 8.19

Los resultados son bastante similares a los encontrados en la literatura. Aunque las condiciones no son las mismas, los cambios en temperatura y fuerza iónica son congruentes con la ligera variación en el valor de  $pK_{a2}$ . La comparación de los resultados obtenidos con los previamente informados valida la metodología aquí empleada.

## 7.1.2 Lantano-Bicina

Se realizaron titulaciones potenciométricas de mezclas metal-ligante de varias proporciones. Primero se analizará el caso de  $[La^{3+}] = [bic]$ . (figura 47)

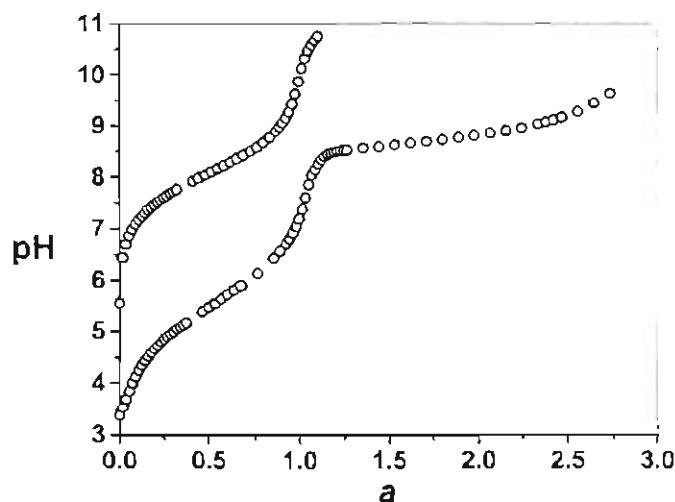
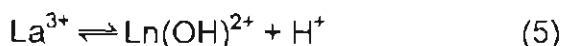
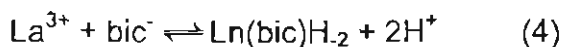
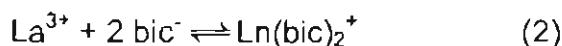


Fig. 47. Curvas de titulación: bicina 0.01 M (o) y bicina (11.1 mM) en presencia de lantano (10.8 mM) (o). (a = moles de sosa agregada por cada mol de bicina)

Como primera aproximación para el ajuste con *Hyperquad 2000*, se utilizó un modelo que incluía a los complejos 1:1 y 1:2 (previamente reportados). Para explicar la desprotonación posterior, se incluyó al complejo 1:1 desprotonado 1 y 2 veces. (esquema 2)



Esquema 2. Equilibrios propuestos para el sistema lantano-bicina.

El valor de la constante del equilibrio (5) se tomó de la literatura y se incluyó como constante. En los casos sucesivos este equilibrio será obviado. El ajuste fue mejor si se eliminaba al complejo  $La(bic)H_{.1}$ . En la tabla 9 se resumen los valores de  $\log \beta$  de los complejos propuestos:

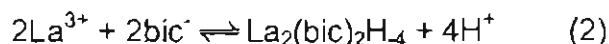
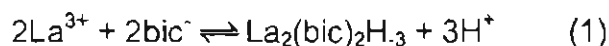


Tabla 9. Constantes de complejación lantano-bicina para el esquema 3.

especie	$\log \beta$
$\text{La}(\text{bic})^{2+}$	4.80
$\text{La}(\text{bic})_2^+$	8.25
$\text{La}(\text{bic})\text{H}_2$	-13.00
$\text{La}(\text{OH})^{2+}$	-9.2
$\chi^2$	38.73

La primera constante de complejación se calcula con un error pequeño y su valor, así como el de la segunda ( $10^{4.80}$  y  $10^{8.25}$ ), son cercanos a los previamente informados ( $10^{4.99}$  y  $10^{8.40}$ )<sup>117-119</sup>. La desprotonación a valores altos de pH se asigna a la formación del complejo  $\text{La}(\text{bic})\text{H}_2$ , sin embargo el ajuste no es del todo satisfactorio, como se observa por un valor de  $\chi^2$  grande en ese experimento.

Para realizar un mejor ajuste se incluyó la desprotonación para formar complejos dinucleares (esquema 3).



Esquema 3. Equilibrios propuestos para el sistema lantano-bicina con complejos dinucleares en la región básica.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos.

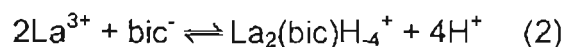
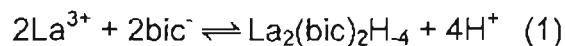
Tabla 10. Constantes de complejación lantano-bicina para el esquema 4.

especie	$\log \beta$
$\text{La}(\text{bic})^{2+}$	4.80
$\text{La}(\text{bic})_2^+$	8.31
$\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_3^+$	-14.78
$\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$	-24.11
$\chi^2$	46.25

La inclusión de los complejos dinucleares empeora el ajuste. Se intentó ajustar con los complejos  $\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_n$  ( $n=1, 2, 3, 4$ ). Los complejos con  $n=3$  y 4 conducen a un ajuste

peor que en el caso anterior. El valor de  $\chi^2$  queda lejos de ser aceptable, por lo que se deben proponer otras especies.

De los resultados cinéticos (*vide infra*) sabemos que la actividad fosfoesterolítica es máxima en las condiciones 2:1 (Ln:bic), por lo que se propone un complejo con esa estequiometría (ver esquema 4).



**Esquema 4. Equilibrios definitivos para la región básica del sistema lantano-bicina.**

Las constantes calculadas se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11. Constantes de complejación definitivas para el sistema lantano-bicina.**

especie	$\log \beta$
$\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$	4.78
$\text{La}(\text{bic})_2^+$	8.36
$\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_{-4}$	-24.14
$\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_{-4}^+$	-27.48
$\chi^2$	14.30

Los ajustes mejoran si se incluye a los complejos  $\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_{-4}$  y  $\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_{-4}^+$ . Como la presencia del complejo  $\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_{-4}^+$  está indicada únicamente por un factor estadístico y en las condiciones de esas titulaciones su participación es mínima, se realizaron titulaciones con exceso de metal, un ejemplo se muestra en la figura 48.

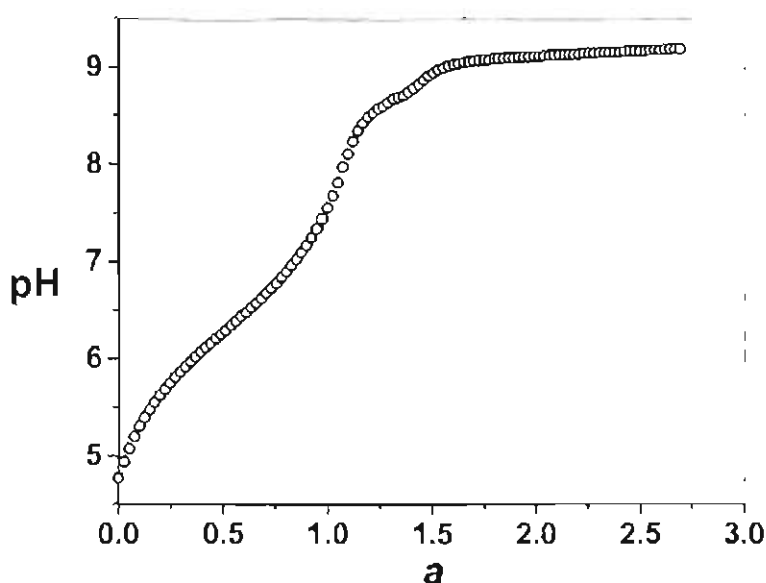


Fig. 48. Curva de titulación de bicina 1.78 mM en presencia de lantano 2.46 mM. ( $a$  = moles de sosa agregada por cada mol de bicina)

En la tabla 12 se resumen los resultados obtenidos para [todas las titulaciones de mezclas lantano-bicina en distintas proporciones.

Tabla 12. Resumen de valores de  $\log \beta$  obtenidos de las titulaciones potenciométricas de lantano-bicina.

La:bic (mM)	5:6.46 (1:1.3)	10.8:11.1 (1:1)	5:27.4 (1:5.5)	5:2.5 (2:1)	2.46:1.78 (1:1.4)	promedio
$\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$	4.78	4.78	4.92	5.04	5.05	$4.91 \pm 0.06$
$\text{La}(\text{bic})_2^+$	8.12	8.36	8.44	-	-	$8.30 \pm 0.10$
$\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$	-	-24.14	-24.49	-23.84	-23.75	$-24.05 \pm 0.17$
$\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$	-27.73	-27.48	-27.25	-28.50	-28.29	$-27.85 \pm 0.24$
$\chi^2$	-*	14.30	2.61	29.66	38.00	-

\*El número de puntos no fue suficiente para calcular  $\chi^2$ .

Además de los resultados de  $\log \beta$  obtenidos, el hecho de no haber encontrado precipitación en estas condiciones nos habla de la plausibilidad de la inclusión de este complejo.

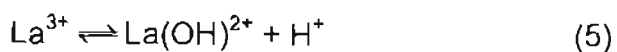
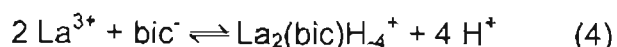
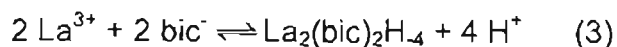
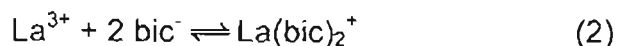
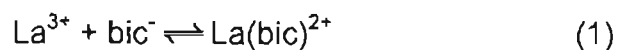
Los valores de  $\log \beta$  de los complejos obtenidos,  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  y  $\text{La}(\text{bic})_2^+$  son consistentes con los previamente presentados.<sup>117-119</sup> Anteriormente, se había informado que

a valores altos de pH se producían polímeros hidroxilados en forma de geles. Durante las titulaciones, además de que la desprotonación se explica por complejos dinucleares desprotonados, no se observaron dichos geles, ni la formación de precipitado.

Con la información obtenida por potenciometría no es posible especular sobre qué grupo se desprotona en los complejos dinucleares, sin embargo sólo hay dos posibilidades: los grupos alcohol de la bicina o agua coordinados al lantano. Es claro que para el complejo  $\text{Ln}_2(\text{bic})\text{H}_4$  al menos dos moléculas de agua se están desprotonando, ya que se pierden 4 protones y la bicina sólo tiene dos grupos alcohol.

El fragmento  $\text{La}_2(\text{OH})_2$  se encuentra recurrentemente en la literatura<sup>136</sup>, por lo que se le considera como candidato para formar el puente en los complejos dinucleares que aquí se presentan. El criterio para incluir al complejo  $\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$  es estadístico, y sin él los ajustes serían menos buenos, pero aún aceptables, por lo que son necesarias otras pruebas que apoyen su existencia. (Ver las siguientes secciones)

El esquema final (5) de equilibrios presentes en presencia de lantano y bicina queda como sigue:



**Esquema 5. Equilibrios definitivos para el sistema lantano-bicina.**

Estos datos se pueden introducir en el programa *Species* y obtener los diagramas de distribución de especies en las condiciones de los experimentos cinéticos. (Fig. 49)

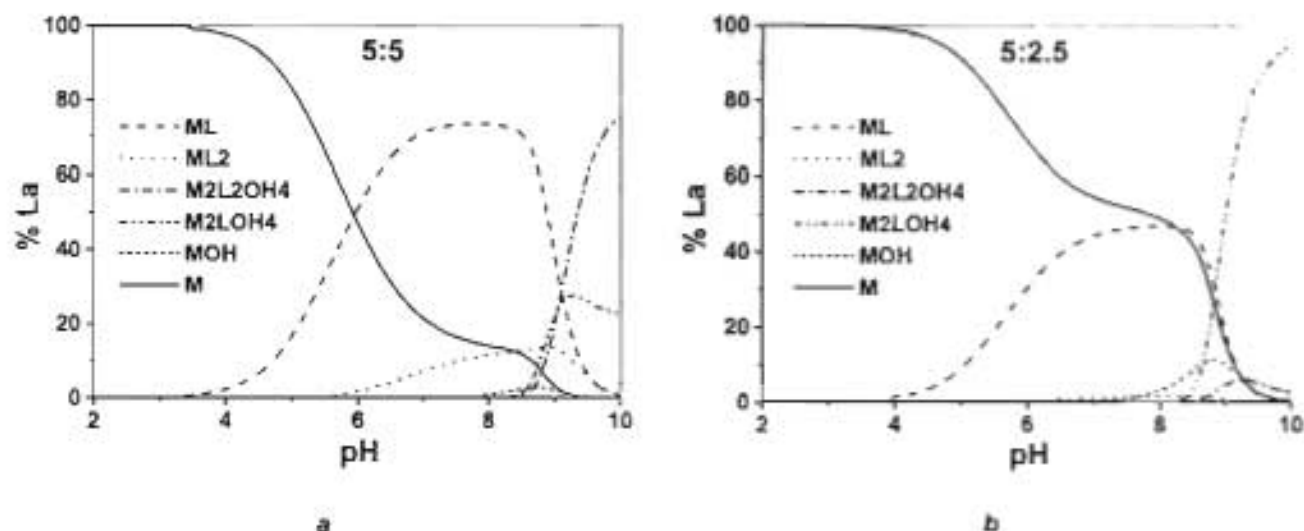


Fig. 49. Diagramas de distribución de especies del sistema lantano-bicina:  $\text{La}^{3+}$  5 mM, bic 5 mM (a) y  $\text{La}^{3+}$  5 mM, bic 2.5 mM (b).

Como se puede observar, el predominio de las especies depende marcadamente de la proporción de metal y ligante presentes. Para el caso 5:5, en valores de pH entre 6 y 9, predomina el complejo  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$ . Por arriba de ese valor de pH la desprotonación da lugar al complejo  $\text{La}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$ , aunque el complejo  $\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$  se forma en un 30%.

Con exceso de metal, el complejo  $\text{La}(\text{bic})_2^+$  prácticamente no se forma y  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$  se forma cuantitativamente a  $\text{pH}=7$ . Alrededor de  $\text{pH}$  9, el complejo  $\text{La}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$  se forma rápidamente.

Vale la pena mencionar tres aspectos interesantes sobre estos diagramas. El primero es que variando la proporción metal/ligante y el pH, se puede modular qué especie predomina. El segundo es que el complejo  $\text{La}(\text{OH})^{2+}$  no se forma cuantitativamente en ninguno de los casos. Esto es importante ya que la actividad catalítica podría adjudicarse a esta especie. En este caso dicha actividad deberá ser asignada a otra(s) especie(s). El tercer punto es que los complejos dinucleares aparecen drásticamente con la variación del pH, a diferencia de los mononucleares, que lo hacen gradualmente. Esto es importante porque si estos complejos son activos (y pueden serlo, ya que el  $\text{HO}^-$  o el  $\text{RO}^-$  pueden funcionar como nucleófilos coordinados), esta actividad deberá depender importantemente del pH.

## 7.1.3 Bicina con otros lantánidos

También se realizaron titulaciones potenciométricas para praseodimio, neodimio y europio. Se encontró que los complejos presentes son los mismos, pero el valor de las constantes de formación cambia. Estos resultados se muestran en las tablas 13-15, y el resumen en la 16.

Tabla 13. Especies para el sistema praseodimio-bicina.

Pr:bic (mM)	10.8:9.52 (1.1:1)	9:27.24 (1:3)	4.04:4.88 (1.2:1)	promedio
$\text{Pr}(\text{bic})^{2+}$	5.42	5.56	5.49	5.49±0.04
$\text{Pr}(\text{bic})_2^+$	9.40	9.60	9.40	9.46±0.07
$\text{Pr}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$	-18.77	-18.62	-18.87	-18.75±0.07
$\text{Pr}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$	-	-	-24.23	-24.23±0.22
$\text{Pr}(\text{OH})^{2+}$	-8.5			

Tabla 14. Especies para el sistema neodimio-bicina.

Nd:bic (mM)	4.5:7.28 (1:1.6)	4.8:17.6 (1:3.7)	4.8:5.04 (1:1.1)	promedio
$\text{Nd}(\text{bic})^{2+}$	5.64	5.76	5.65	5.68±0.04
$\text{Nd}(\text{bic})_2^+$	10.10	10.04	9.62	9.92±0.15
$\text{Nd}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$	-19.40	-18.27	-20.42	-19.36±0.62
$\text{Nd}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$	-	-25.26	-	-25.26±0.03
$\text{Nd}(\text{OH})^{2+}$	-8.4			

Tabla 15. Especies para el sistema europeo-bicina.

Eu:bic (mM)	5:4.7 (1.1:1)	10.06:10.88 (1:1.1)	8.5:25.94 (1:3.1)	8.27:2.8 (3:1)	promedio
Eu(bic) <sup>2+</sup>	5.69	5.67	5.83	5.55	5.68±0.06
Eu(bic) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	10.31	9.96	10.59	-	10.29±0.18
Eu <sub>2</sub> (bic) <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-19.16	-	-19.13	-	-19.14±0.01
Eu <sub>2</sub> (bic)H <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-22.78	-22.90	-	-22.94	-22.87±0.05
Eu(OH) <sup>2+</sup>	-8.3				

En la siguiente tabla se muestra un resumen de las constantes encontradas:

**Tabla 16. Resumen de constantes de formación para los complejos de los lantánidos estudiados con bicina.**

	La(III)	Pr(III)	Nd(III)	Eu(III)
Ln(bic) <sup>2+</sup>	4.91±0.06	5.49±0.04	5.68±0.04	5.68±0.06
Ln(bic) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	8.30±0.10	9.46±0.07	9.92±0.15	10.29±0.18
Ln <sub>2</sub> (bic) <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-24.05±0.17	-18.75±0.07	-19.36±0.07	-19.14±0.01
Ln <sub>2</sub> (bic)H <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-27.85±0.24	-24.23±0.22	-25.26±0.03	-22.87±0.05

Como se puede observar, las constantes se hacen mayores al avanzar en el periodo. Este comportamiento es común entre los lantánidos y generalmente se atribuye a la creciente dureza de los lantánidos(III) por la contracción lantánida. En la siguiente gráfica (figura 50) se observa que la tendencia es más o menos regular.

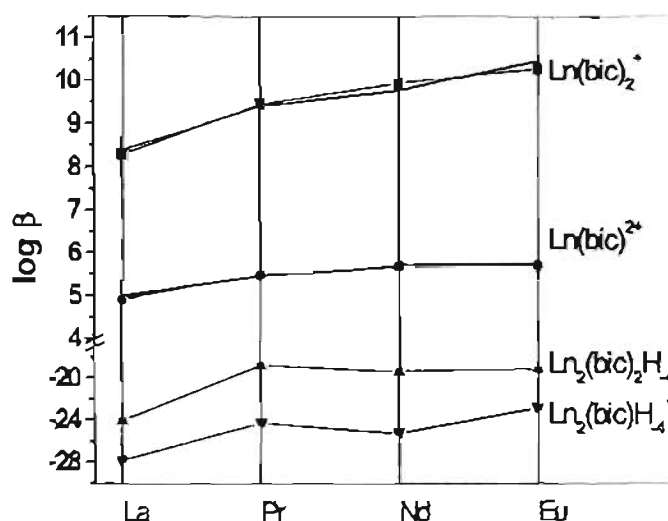


Fig. 50. Constantes de formación para los complejos de lantánidos con bicina. (las líneas grises corresponden al valor promedio de las constantes previamente reportadas)

Llama la atención la aparente desviación de la tendencia que presenta el praseodimio. Sin embargo, este tipo de comportamiento es usual y se atribuye a diversas causas, tales como a un posible cambio en el número de coordinación del ion. (Además de los errores inherentes de la técnica)

#### 7.1.4 Tricina con los lantánidos

Se realizó la titulación de la tricina, obteniéndose los siguientes valores de  $\text{pK}_3$ : 1.98 y 7.97.

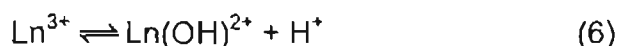
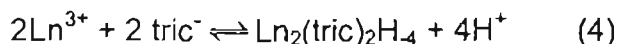
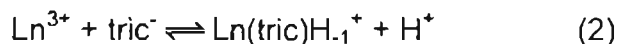
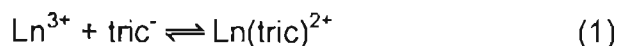
Con esos resultados se hicieron titulaciones con lantano, praseodimio y neodimio (tabla 17), el procedimiento es el mismo que se empleó para la bicina.

Tabla 17. Resumen de constantes de formación para los complejos de los lantánidos estudiados con tricina.

	La(III)	Pr(III)	Nd(III)	Eu(III)
$\text{Ln}(\text{tric})_2^{2+}$	$4.86 \pm 0.14$	$5.50 \pm 0.06$	$6.09 \pm 0.10$	$6.21 \pm 0.33$
$\text{Ln}(\text{tric})_2^+$	$8.68 \pm 0.01$	$8.87 \pm 0.02$	$9.38 \pm 0.07$	$10.07 \pm 0.20$
$\text{Ln}(\text{tric})\text{H}_{-1}$	$-3.67 \pm 0.37$	$-2.44 \pm 0.02$	$-1.89 \pm 0.27$	$-1.25 \pm 0.34$
$\text{Ln}_2(\text{tric})_2\text{H}_4$	$-23.42 \pm 0.25$	$-20.00 \pm 0.02$	$-19.85 \pm 0.44$	$-17.94 \pm 0.69$
$\text{Ln}_2(\text{tric})\text{H}_4^+$	$-27.09 \pm 1.16$	$-24.07 \pm 0.08$	$-25.98 \pm 0.42$	$-22.69 \pm 0.58$



En el esquema 6 se presentan los equilibrios presentes en presencia de los lantánidos y tricina:



Esquema 6. Equilibrios para el sistema lantano-tricina.

Dada la similitud estructural de bicina y tricina (figura 64), no es raro que los equilibrios involucrados y el valor de las constantes sean parecidos para ambos ligantes. Estructuralmente, la diferencia es que bicina tiene dos grupos alcohol y tricina tres. Por lo anterior pudiera pensarse que tricina sería un mejor ligante que bicina, pero no es el caso. La razón es que la bicina tiene dos 2-hidroxietilos sobre el átomo de nitrógeno como posibles donadores (además del nitrógeno y el carboxilato) y la tricina tiene tres, pero en forma de un trihidroxiterbutilo. (Ver la figura 51)

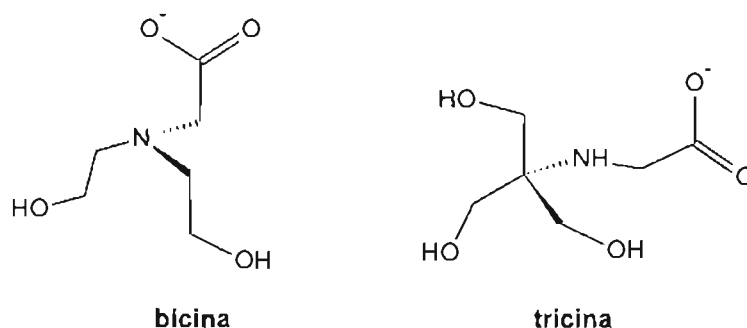


Figura 51. Estructuras de la bicina y la tricina.

La principal diferencia entre ambos sistemas es que para tricina hay un equilibrio adicional, el marcado como (2) en el esquema 6.

De esta forma, si de la tricina, el átomo de nitrógeno se coordina, sólo dos alcoholes quedan en posición de poderse coordinar. Si los tres alcoholes se coordinaran, no sólo el nitrógeno quedaría sin coordinarse, sino que el carboxilato quedaría a 7 átomos de distancia y para coordinarse tendría que formar un ciclo de 8 miembros, poco probable. De este

modo, probablemente tanto bicina como tricina estén funcionando como ligantes pentadentados.

Nuevamente, la tendencia general, es que las constantes se hacen mayores al avanzar en el periodo, como se observa en la figura 52.

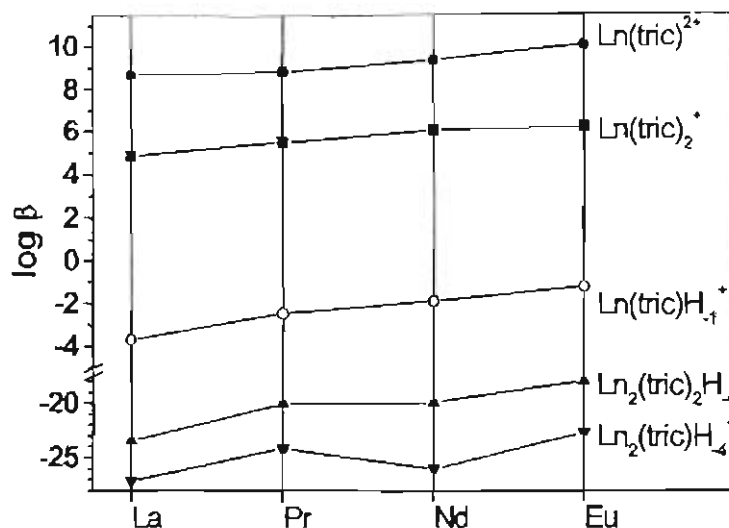


Fig. 52. Constantes de formación para los complejos de lantánidos con tricina.

## 7.2 Estudios Cinéticos

### 7.2.1 Lantano-bicina

#### 7.2.1.1 Hidrólisis de BNPP.

Se realizaron cinéticas de hidrólisis de BNPP a 37 °C con exceso de bicina sobre lantano. Se utilizó exceso de bicina ya que se pretendía que además de servir como ligante, sirviera como amortiguador de pH. En la figura 53 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada (calculada por el método de velocidades iniciales) con el pH.

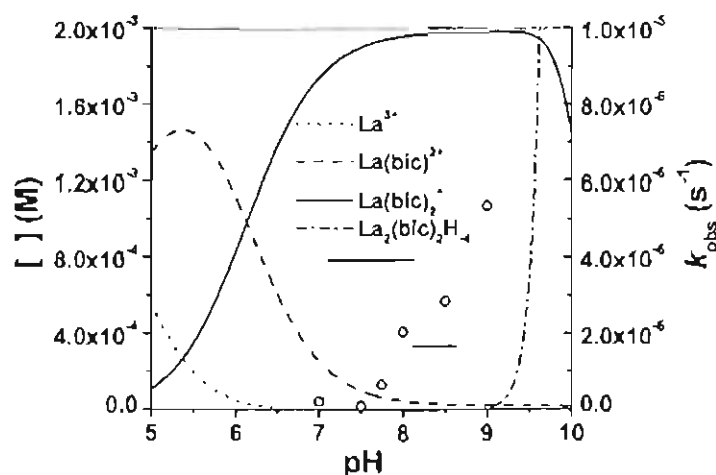


Fig. 53. Perfil de  $\log k_{obs}$  y diagrama de distribución de especies dependientes del pH de lantano 2 mM, bicina 50 mM y BNPP 0.04 mM.  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $I = 0$ .

El valor de la constante de velocidad observada aumenta casi linealmente a partir de pH 7.5. La actividad, sin embargo es muy pequeña y seguramente el error asociado en la medición es alto. La constante de velocidad observada y el diagrama de distribución de especies en función del pH, no correlacionan directamente. De hecho el aumento en  $k_{obs}$  se da justo en la zona donde prácticamente no hay variación en la concentración de las especies ( $7.5 < \text{pH} < 9$ ).

Para explicar lo anterior se puede recurrir a dos ideas: una es que la actividad se deba a una especie de concentración despreciable, la cual sin embargo, tiene una actividad muy grande. La otra es que la actividad sea producida por alguna especie en combinación con el ion  $\text{OH}^-$ .

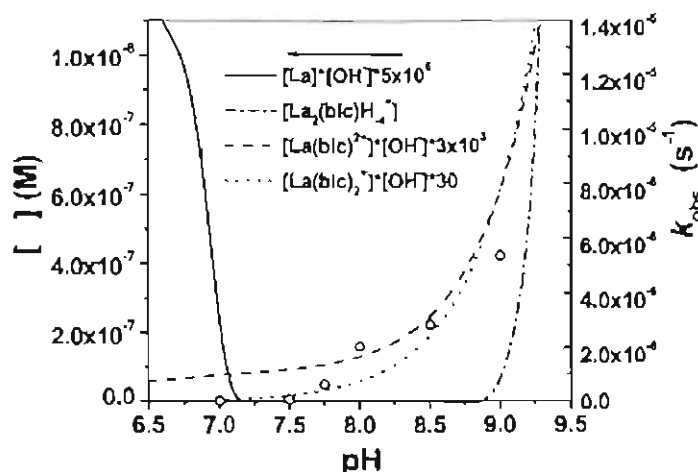


Fig. 54. Constantes de velocidad observadas (o) y posibles combinaciones de especies responsables de la actividad cinética en función del pH para las condiciones de la figura 53.

En la figura 54 se analizan estas posibilidades. El comportamiento con respecto al pH indica que la actividad puede deberse a los complejos  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  o  $\text{La}(\text{bic})_2^+$ . En ambos casos el nucleófilo tendría que ser el ión hidróxido, lo cual no resulta descabellado. Al graficar la constante de velocidad observada en función del producto de la concentración del complejo por la concentración de  $\text{OH}^-$ , la pendiente debe ser la constante de velocidad de tercer orden. (Fig. 55)

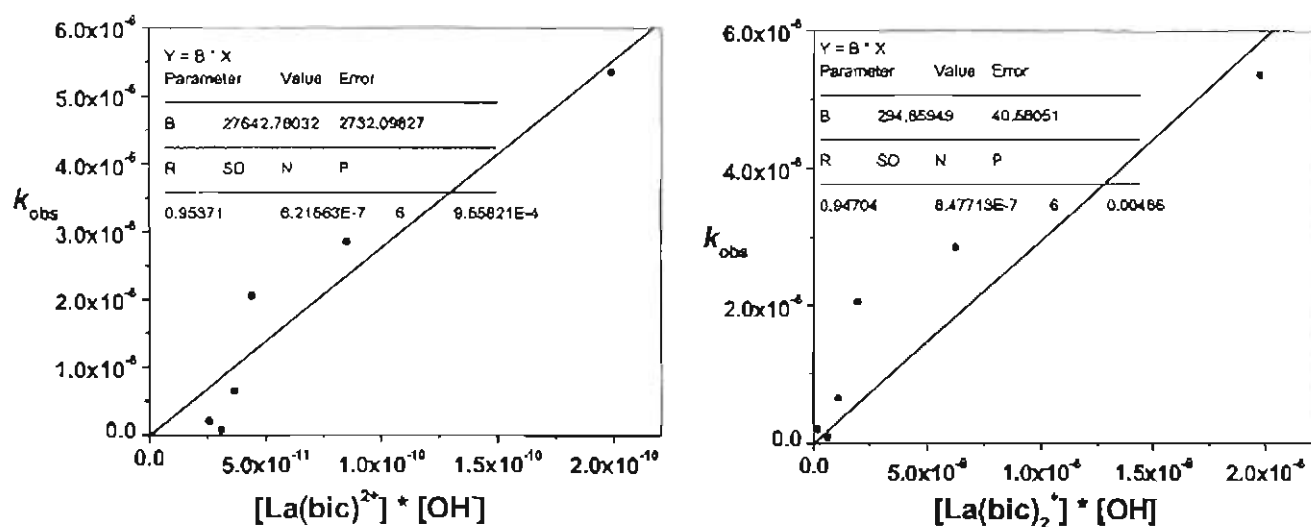


Fig. 55. Correlación entre  $k_{\text{obs}}$  y el producto complejo-hidróxido para lantano 2 mM y bicina 50 mM a  $T = 37^\circ\text{C}$  y  $I = 0$ .

Las constantes de velocidad de tercer orden serían los que se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Constantes de velocidad de tercer orden para la hidrólisis de BNPP en las condiciones de la figura 66.

especie	$k$ ( $\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
$\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$	$2.76 \times 10^4$
$\text{La}(\text{bic})_2^+$	$2.95 \times 10^2$

Estadísticamente se tiene un mejor ajuste para el complejo  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$ , sin embargo en ambos casos la dispersión es considerable. Si comparamos el valor de estas constantes con la de  $\text{La}(\text{III})$  a  $50^\circ\text{C}$  y pH 7 ( $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ , calculada de  $k = k_{\text{cat}} / (K_{\text{M}} \times [\text{OH}^-])$ ),<sup>77</sup> vemos que el valor de la constante del complejo  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  es prácticamente de la mitad que la del acuacación. Llama la atención que sea del mismo orden, considerando que la carga ha sido

reducida de +3 a +2. Por otro lado la constante del complejo  $\text{La}(\text{bic})_2^+$  es dos órdenes de magnitud menor, lo que es consistente con la reducción de la carga a +1. Con estos datos no es posible descartar de manera definitiva ninguna de estas dos posibilidades, sin embargo lo pequeño de las constantes, de cualquier manera, no motiva a realizar un estudio exhaustivo del sistema. Una explicación tentativa para la actividad de estos complejos sería que los grupos hidroxietilo y/o carboxilato de la bicina tengan alguna participación en el mecanismo de hidrólisis.

Para continuar el estudio cinético, se realizó el estudio de dependencia de la concentración de bicina a varios valores de pH con una concentración de  $\text{La}(\text{III})$  fija de 0.002 M a 25 °C. Los resultados se muestran en la figura 56.

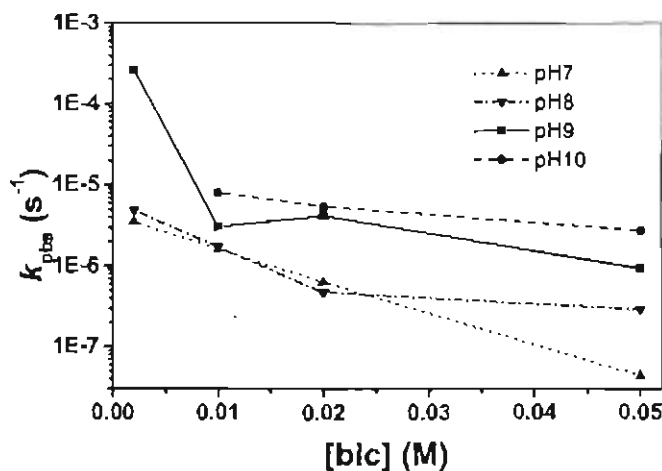


Fig. 56. Perfil de  $k_{obs}$  contra la concentración de bicina, ver condiciones en el texto.

Para los valores de pH 7 y 8 la actividad es similar y pequeña. Ésta aumenta al disminuir la concentración de ligante. Los puntos de mayor actividad observados en la gráfica corresponden a una relación 1:1 M/L (0.002 M), lo que nos lleva a pensar que la especie activa de la que se habló anteriormente sea  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  y no  $\text{La}(\text{bic})_2^+$ . A valores mayores de pH (9 y 10) nuevamente hay un aparente efecto inhibitor del ligante y la actividad aumenta de manera considerable.

Para analizar la dependencia de la velocidad de hidrólisis con la concentración de metal, se realizaron mediciones cinéticas a pH 9 y 25 °C con exceso de bicina (50 mM) y concentración de  $\text{La}(\text{III})$  variable. Los resultados se muestran en la figura 57.

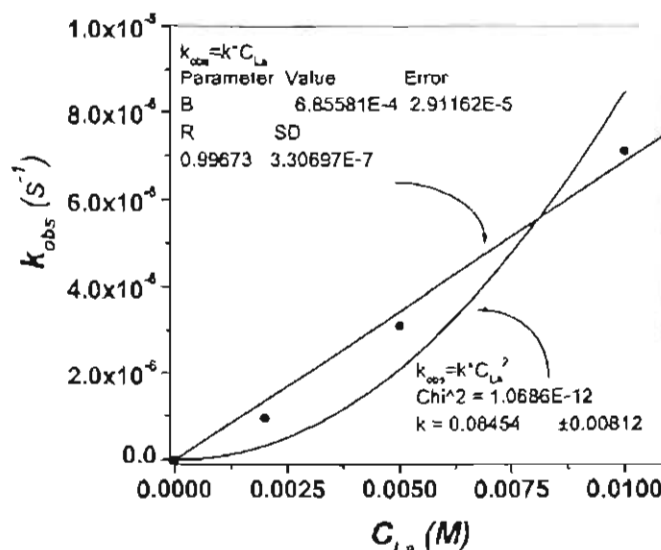


Fig. 57. Perfil de  $k_{obs}$  contra la concentración de lantano, ver condiciones en el texto.

Se observa una dependencia lineal con la concentración de La(III), lo cual habla en favor de una especie mononuclear. Ahora bien, si la especie activa es  $La(bic)^{2+}$ , con exceso de ligante ésta se encuentra en una proporción muy pequeña, por lo que se decide hacer estudios en condiciones equimolares de lantano y bicina para obtener velocidades de hidrólisis más grandes. Si se mantiene una relación M/L constante de 1:1 se observa que a pH 9 y 25 C hay un aparente efecto de saturación (Fig. 58), además las constantes de velocidad observadas son muy superiores a las encontradas anteriormente.

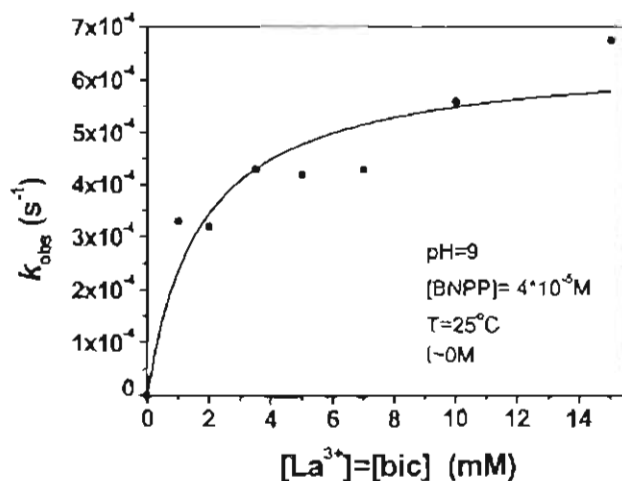


Fig. 58. Perfil de  $k_{obs}$  contra concentraciones equimolares de lantano y bicina.

La saturación es indicativa de un mecanismo tipo Michaelis-Menten. Para establecer el mecanismo es necesario identificar a la especie activa. Por la magnitud de las constantes de velocidad observadas, es evidente que el complejo  $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$  no es el responsable de dicha actividad. Superponiendo el perfil de  $k_{\text{obs}}$  vs. pH con el diagrama de distribución de especies (figura 59) podemos observar la dependencia de  $k_{\text{obs}}$  con las especies presentes en esas condiciones ( $[\text{Ln}^{3+}] = [\text{bic}] = 5 \text{ mM}$ ,  $[\text{BNPP}] = 0.04 \text{ mM}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Se realizaron experimentos similares con  $\text{La}(\text{III})$ ,  $\text{Pr}(\text{III})$ ,  $\text{Nd}(\text{III})$  y  $\text{Eu}(\text{III})$ .

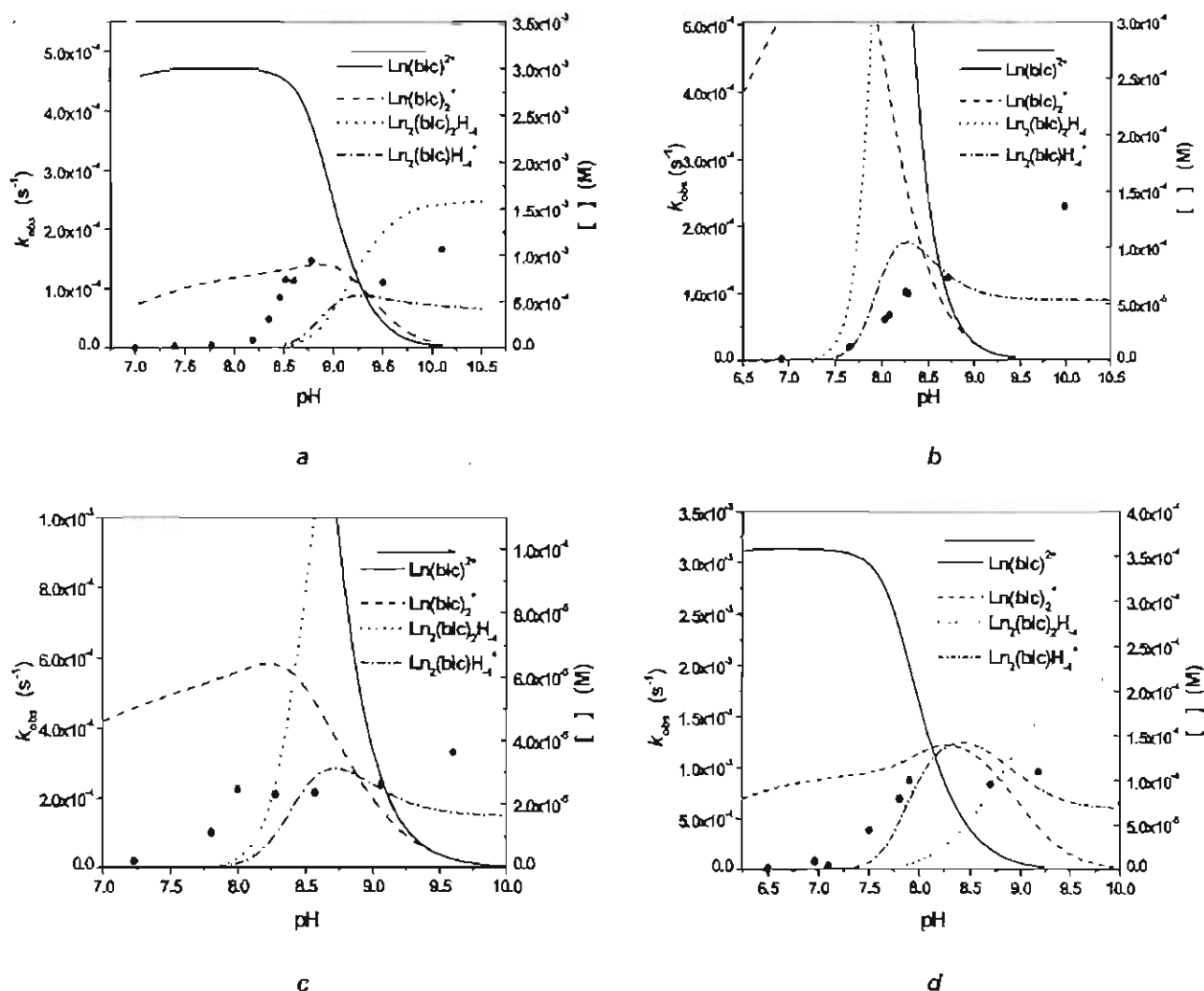


Fig. 59. Perfiles de  $k_{\text{obs}}$  (•) y distribución de especies dependientes del pH para la hidrólisis de BNPP con  $[\text{Ln}^{3+}] = [\text{bic}] = 5 \text{ mM}$ . Ln = La, Pr, Nd y Eu (a-d, respectivamente)

En estas condiciones se obtienen velocidades mucho mayores. La actividad aumenta de manera importante a partir de pH 8 para lantano y pH 7 para europio. Los complejos  $\text{Ln}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$  y  $\text{Ln}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$  se forman a valores de pH ligeramente superiores. A pesar de este

desplazamiento de media unidad de pH, podemos pensar que la actividad se debe a cualquiera de estos dos complejos.

Para encontrar la proporción óptima de metal y ligante se realizaron estudios cinéticos tipo Job (figura 60). Lo anterior, además nos permite discernir cuál de los complejos es el responsable de la actividad, si el máximo se da en una región donde predomina una especie sobre las demás.

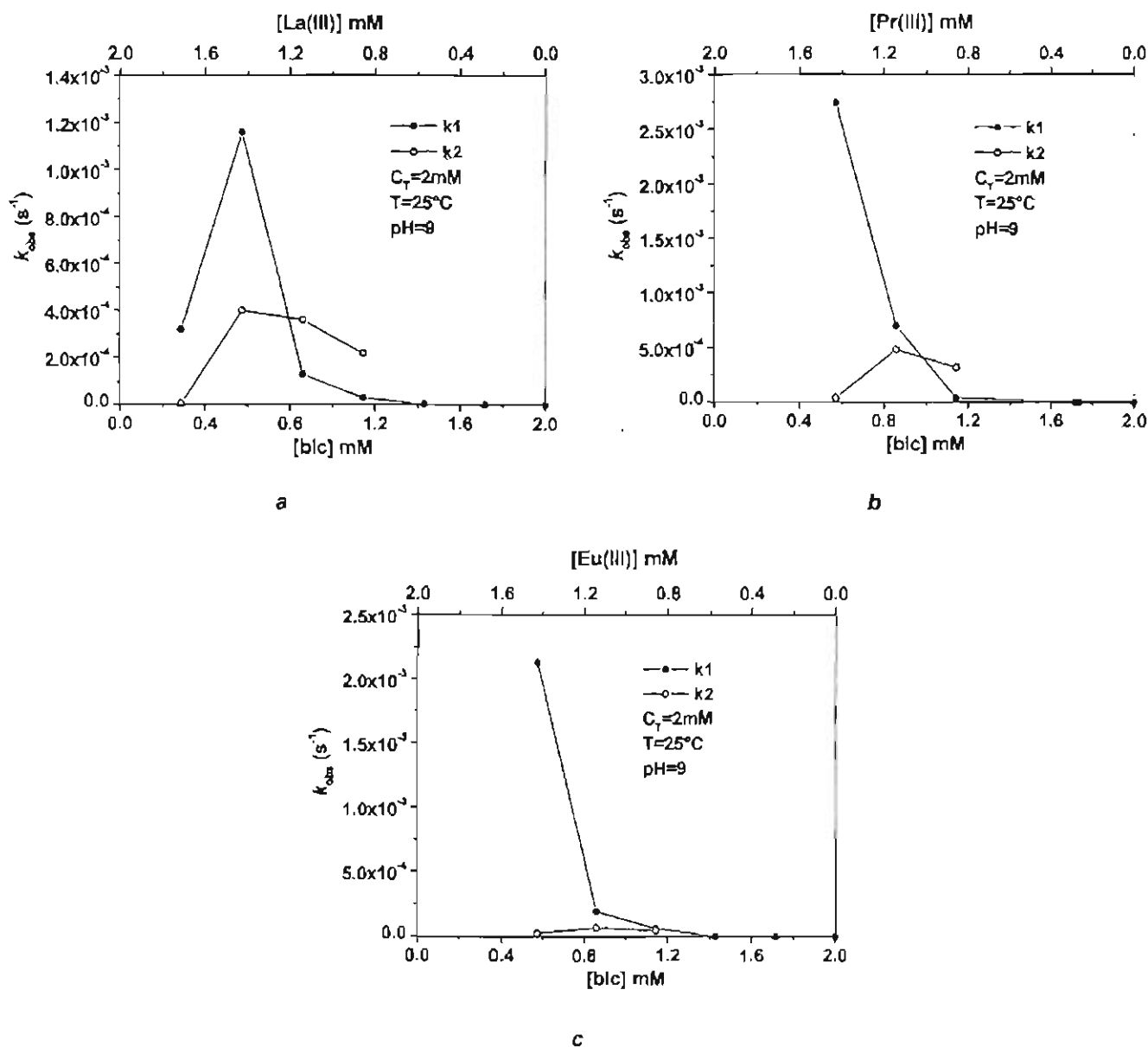


Fig 60. Curvas tipo Job para la actividad hidrolítica de  $Ln^{3+}$  / blc, con  $Ln = La, Pr$  y  $Eu$ . (a-c, respectivamente).

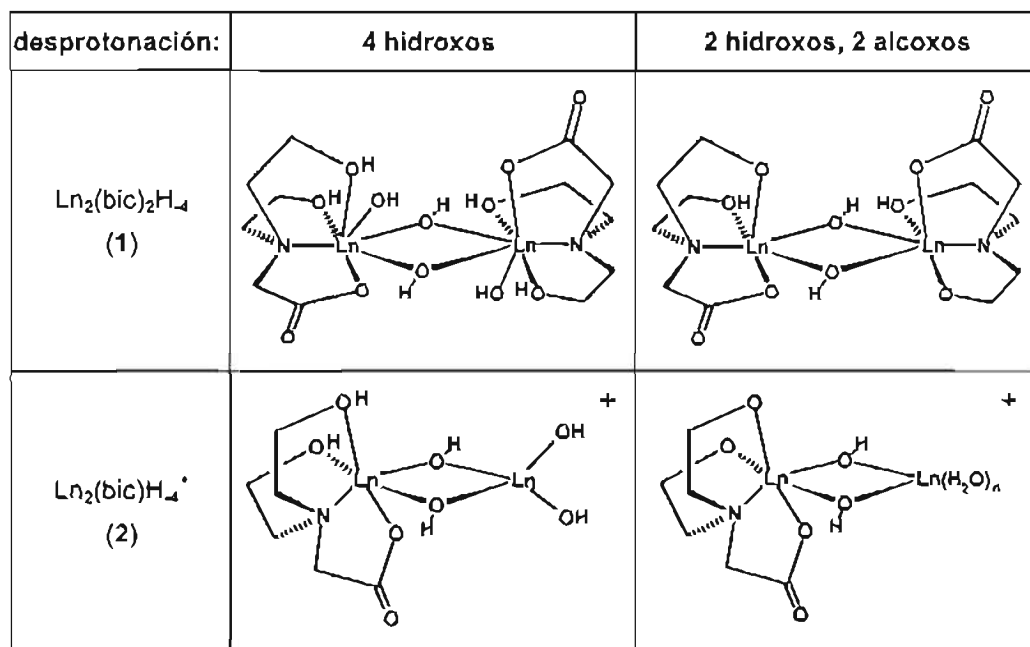
Los experimentos se hicieron con  $pH=9$  para que hubiera una fracción importante de los complejos desprotonados. La actividad máxima para las dos etapas de hidrólisis se da



cuando  $[Ln] = 2[bic]$ , por lo que el complejo activo es  $Ln_2(bic)H_4^+$  y no  $Ln_2(bic)_2H_4$ . Este comportamiento lo presentan todos los lantánidos estudiados.

El hecho de que la especie más activa sea dinuclear, se debe a que se pueden llevar a cabo activaciones del tipo de las que se mencionaron en los antecedentes (por ácido de Lewis, ácida o básica general, nucleofílica o del grupo salient), y que son comunes para las hidrolasas en general.

Sobre el por qué los complejos  $Ln_2(bic)H_4^+$  tienen actividad y los  $Ln_2(bic)_2H_4$  no la tienen, veamos cuales son las posibles estructuras de estos complejos. Si pensamos que, como se ha informado en la literatura,<sup>135</sup> se necesitan dos hidroxilos para servir de puente entre los centros metálicos, los otros dos protones pueden provenir de la desprotonación de moléculas de agua o de grupos alcohol de la bicina para formar hidroxos o alcoxos, respectivamente. (ver esquema 7)



Esquema 7. Posibles estructuras para los complejos desprotonados.

En cualquiera de estos casos, el sustrato se coordinaría al complejo y un grupo desprotonado (hidroxo o alcoxo) actuaría como nucleófilo. Ahora bien, en (1) cada ion metálico está coordinando a 6 ó 7 átomos donadores y seguramente moléculas de agua completan la esfera de coordinación.

Probablemente esto haga más difícil que el sustrato se aproxime que en el caso de (2), donde un lantánido está unido a 6 grupos y el otro sólo a cuatro. Otro factor es la carga,

mientras que (1) es neutro, (2) es catiónico, lo que favorece la aproximación del sustrato aniónico.

Se hicieron corridas cinéticas de Ln 5 mM con bicina 2.5 mM a varios valores de pH a 25 °C. Por la poca cantidad de ligante presente, en estos casos se presentaron problemas de dispersión en los valores de  $k_{obs}$  y en muchos casos de precipitación.

Las constantes de velocidad, sin embargo, fueron buenas y se presentan, junto con las de 5:5 en las siguientes gráficas (Fig. 61).

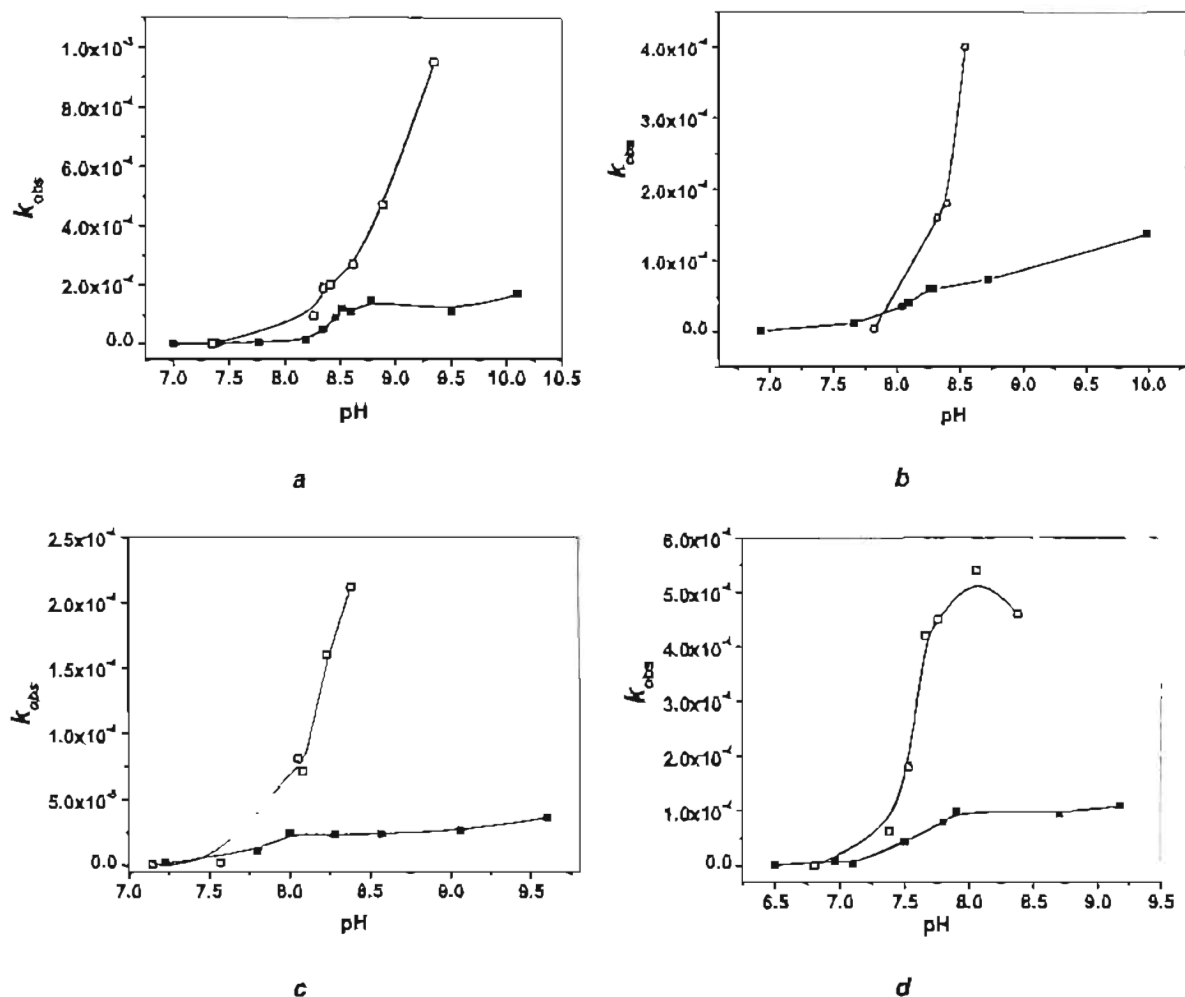


Fig. 61. Perfiles de actividad hidrolítica de Ln / bic con proporciones 5:5 mM (cuadros cerrados) y 5:2.5 mM (cuadros abiertos). Ln = La, Pr, Nd y Eu (a-d, respectivamente).

Para resolver los problemas de dispersión, se decidió utilizar un amortiguador. Por su poca capacidad coordinante y porque su valor de  $pK_a$  es cercano al intervalo en que se presenta la actividad catalítica, se eligió TRIS en una concentración 10 mM. Las disoluciones fueron más estables y se obtuvieron datos más reproducibles.

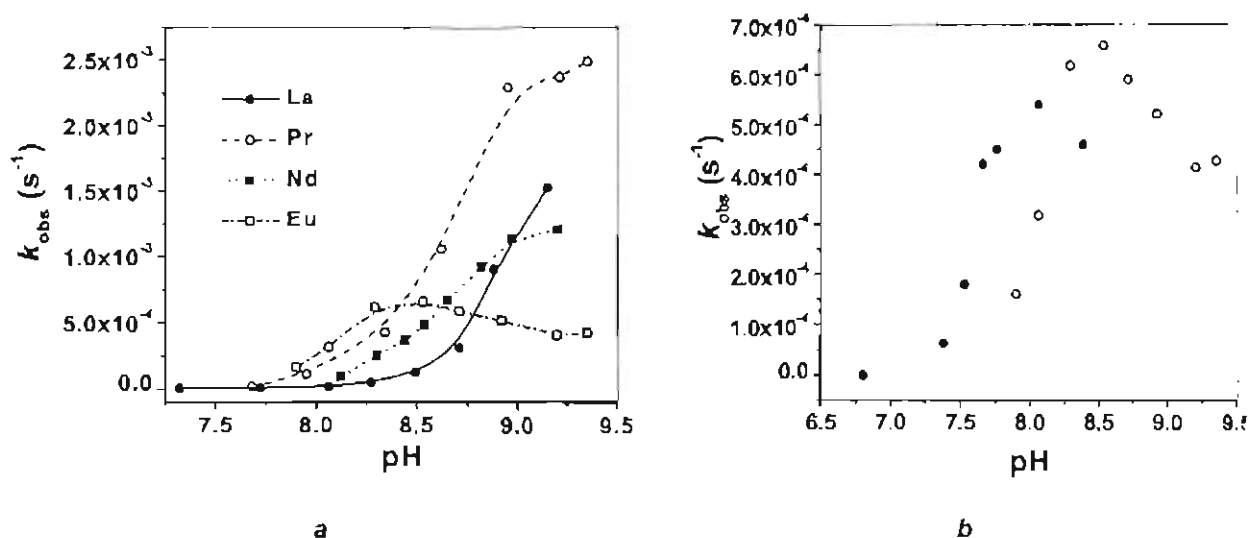


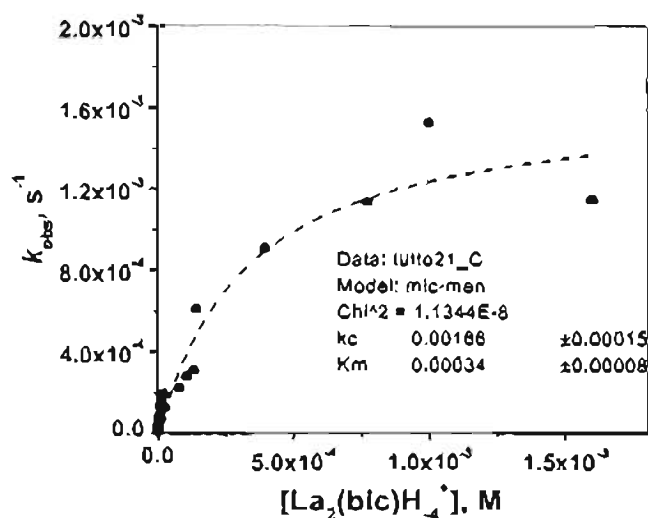
Fig. 62. a) Perfiles de  $k_{obs}$  contra pH con exceso de metal en presencia de Tris 10 mM. b) Perfiles de  $k_{obs}$  contra pH con exceso de europio con Tris 10 mM (círculos abiertos) y sin él (círculos cerrados).

En la figura 62a se muestran los perfiles de  $k_{obs}$  con el pH para los cuatro lantánidos estudiados.

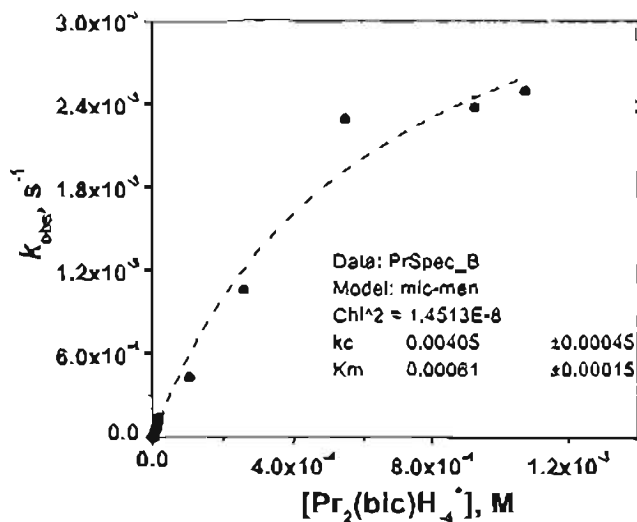
En figura 62b observamos los perfiles para europio con y sin Tris. Se puede observar que el comportamiento es similar, con la diferencia de que los experimentos sin Tris muestran una mayor dispersión. Lo anterior se debe a que en ausencia de *buffer* el pH es menos estable. Con esto queda ampliamente justificado el hecho de adicionar Tris para estas condiciones.

Se observa que la reactividad pasa por un máximo y después disminuye. En los experimentos realizados con Tris el máximo se encuentra en  $pH \sim 8.5$ . Esto puede deberse a dos motivos. El primero es que el amortiguador interfiera, coordinándose al europio, lo cual no es muy probable, ya que la constante de complejación Eu-Tris es muy pequeña ( $\log K_{EuTris} = 2.44$ )<sup>137</sup> y el  $pK_a$  del Tris es relativamente alto en esas condiciones (8.07)<sup>138</sup>. Otra posibilidad es que el europio, al ser el más ácido de los cationes utilizados en este trabajo, haya precipitado parcialmente, disminuyendo la concentración del complejo activo hidrolíticamente.

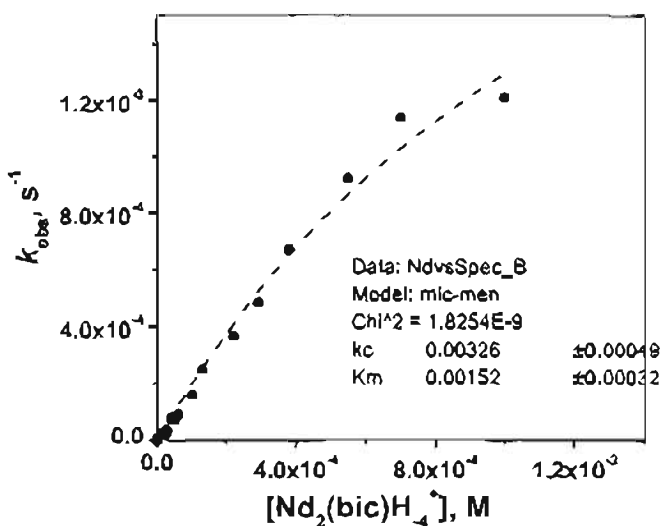
Para determinar la dependencia de  $k_{obs}$  con la concentración de  $Ln_2(bic)H_4^+$ , calculamos su concentración para ambas condiciones (5:5 y 5:2.5 M) en cada punto y se grafica la constante de velocidad observada en función de ella, se obtienen las gráficas que se muestran en la figura 63.



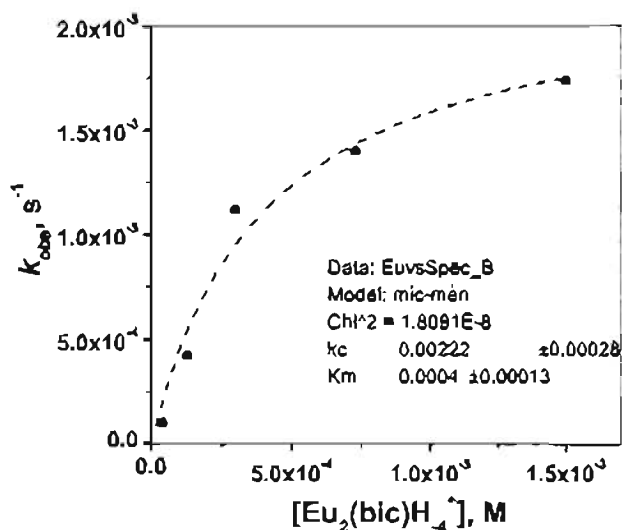
a



b



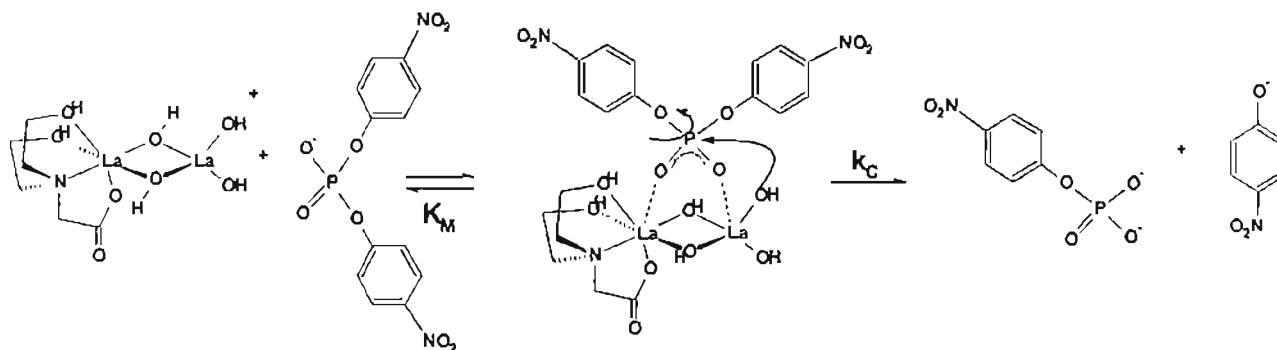
c



d

Fig. 63. Dependencia de  $k_{obs}$  con  $[Ln_2(bic)H_4]$  (puntos) y ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (líneas punteadas).

Como puede observarse, al principio hay una dependencia lineal, y a mayores concentraciones de complejo hay una saturación. Dicha saturación comúnmente es interpretada como indicativa de un mecanismo tipo Michaelis-Menten. En el siguiente esquema (8) se presenta el mecanismo propuesto, basándose en esta observación



Esquema 8. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de BNPP por el complejo  $\text{La}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ .

En los gráficos de la figura 75 se pueden observar los ajustes al modelo utilizando la ecuación 6:

$$k_{obs} = \frac{k_C [Ln_2ByH_{-4}]}{K_M + [Ln_2ByH_{-4}]} \quad \text{Ecuación 6}$$

En la tabla 18 (a) se muestran los valores de  $K_M$  y  $k_{cat}$ . Si comparamos estos valores con los informados para los acuacaciones a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>77</sup> (b), podemos ver que  $k_C$  es entre 100 y 10 veces mayor para  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  que para  $\text{Ln}^{3+}$ , a pesar de la diferencia en la temperatura de los experimentos ( $50\text{ }^\circ\text{C}$  para b y  $25\text{ }^\circ\text{C}$  para a). Esto es bastante razonable tomando en cuenta que en el complejo dinuclear se pueden dar activaciones simultáneas, cuyos efectos se potencian.

Tabla 18. Constantes catalítica y de Michaelis para la hidrólisis de BNPP por  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  (a) y  $\text{La}(\text{H}_2\text{O})_n^{3+}$  (b).

		La	Pr	Nd	Eu
a	$k_C$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$1.7 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-3}$
	$K_M$ (M)	$3.4 \times 10^{-4}$	$6.0 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-4}$
	$K_{est}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$2.94 \times 10^3$	$1.67 \times 10^3$	$6.67 \times 10^2$	$2.50 \times 10^3$
b	$k_C$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$1.3 \times 10^{-5}$	$6.3 \times 10^{-5}$	-	$2.5 \times 10^{-4}$
	$K_M$ (M)	$2.6 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-3}$	-	$2.8 \times 10^{-3}$

Llama la atención el hecho de que, a diferencia de como sucede para los acuacaciones, en este caso los valores de  $k_C$  no presentan una tendencia clara. La razón por la cual la actividad casi no depende del ion metálico es la siguiente:

*“Los cationes más ácidos (más pequeños) proveen una mayor asistencia electrofílica, pero al mismo tiempo atraen más carga de los hidroxos coordinados, desactivándolos”.*

Anteriormente el aumento en la reactividad al avanzar en el periodo se explicaba por el aumento en la acidez de los cationes, el cual producía una mayor activación electrofílica. Con los resultados obtenidos en este trabajo, resulta lógico pensar que el aumento en la actividad obedezca más bien al hecho de que al avanzar en el periodo hay una fracción cada vez mayor de hidroxocomplejo formado.

Los valores de  $K_M$  son menores que los de los acuatones, la mayor estabilidad de estos complejos metal-sustrato ( $K_M$  es una constante de disociación) puede deberse a una coordinación tipo puente, como se ilustra en el esquema 8. (Este tipo de comportamiento ha sido informado para complejos dinucleares de cobalto(III)<sup>139</sup> y comúnmente se considera como una posibilidad para complejos de lantánidos.)

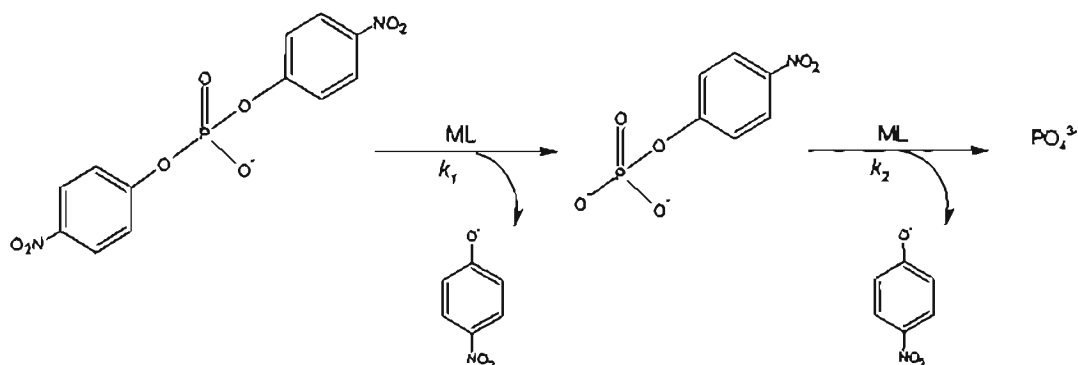
En trabajos anteriores se presentó a los complejos  $La_2L_2(OH)_4$  como especies con actividad en fosfodiesterolítica<sup>85,140</sup>. La especie estructuralmente más relacionada ( $L=N,N$ -Me<sub>2</sub>Gly) tiene, a 25 °C una constante de segundo orden de  $12.8 M^{-1}s^{-1}$ , la constante correspondiente para  $La_2(bic)_2(OH)_4$  no es detectable, pero en cambio para  $La_2(bic)(OH)_4^+$  sería  $k_C/K_M = 5.0 M^{-1}s^{-1}$ .

Lo anterior se interpreta como sigue:

*Los grupos hidroxietilo, responsables de la estabilidad adicional de los complejos impiden la aproximación del sustrato a  $La_2(bic)_2(OH)_4$ , en el complejo  $La_2(bic)(OH)_4^+$  la interacción complejo-sustrato si es posible, lo que resulta en que este complejo presenta una actividad similar a la de  $La_2(N,N$ -Me<sub>2</sub>Gly)<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub> ( $k = 12.0 M^{-1}s^{-1}$ ).<sup>140</sup>*

### 7.2.1.2 Hidrólisis del monoéster.

La reacción de hidrólisis del diéster de fosfato da como producto un nitrofenolato y un monoéster de fosfato. El monoéster de fosfato también se hidroliza, para dar otro equivalente de nitrofenolato y al anión fosfato (esquema 9). Cuando la reacción se monitorea hasta etapas muy avanzadas, es posible calcular también la constante de hidrólisis del monoéster ( $k_2$ ).



Esquema 9. Hidrólisis sucesiva del BNPP.

Esto ocurre en reacciones muy rápidas y/o siguiendo las cinéticas por tiempos muy prolongados, de cualquier manera el error asociado es grande, ya que los errores en  $k_1$ ,  $[S]$ ,  $\varepsilon$  y pH se suman. A continuación se muestran los perfiles de constante de velocidad de  $k_2$  contra pH para La, Pr, Nd y Eu 5 mM y By 2.5 mM. (Fig. 64)

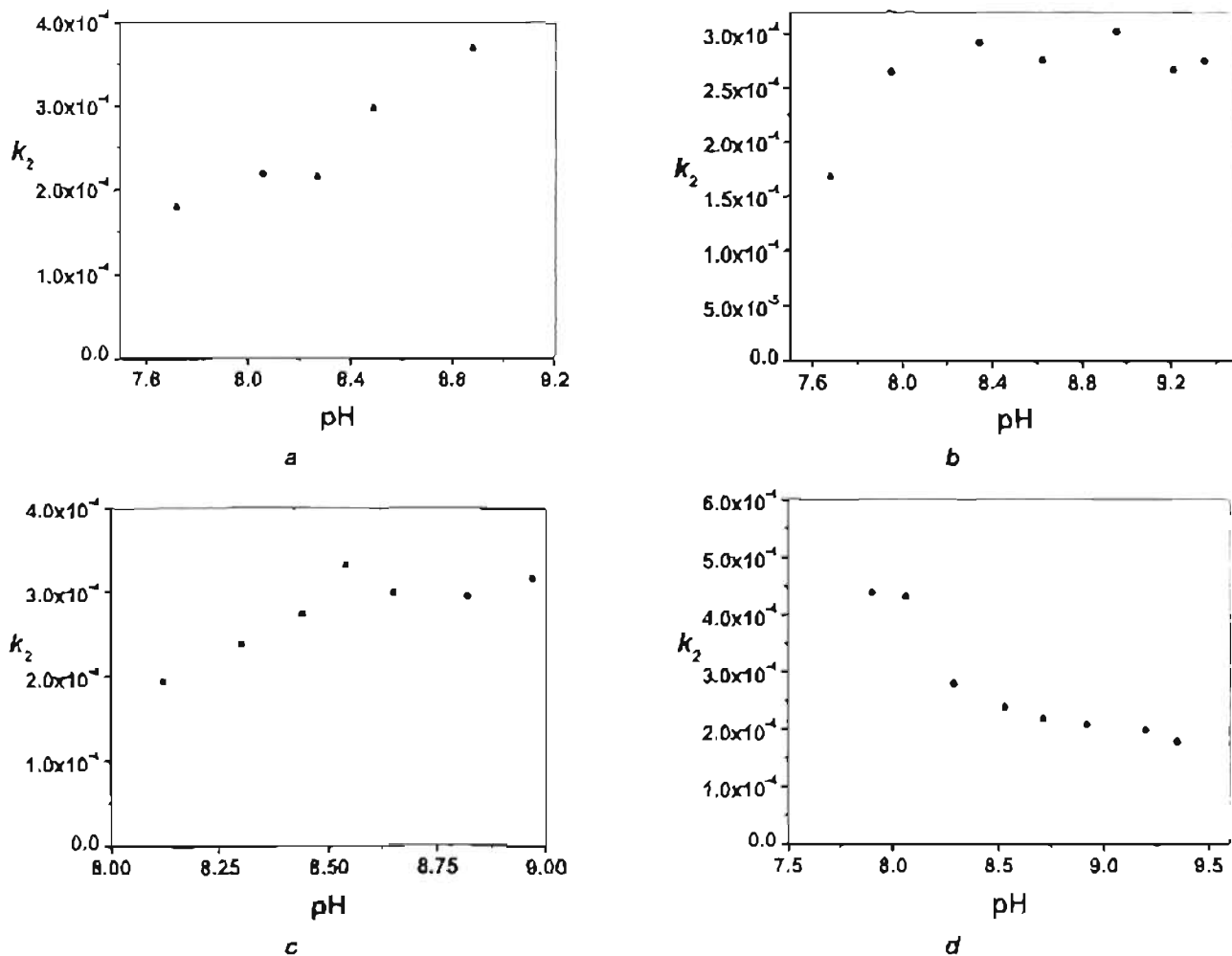


Fig. 64. Perfiles de  $k_2$  (hidrólisis de MNPP) contra pH de los lantánidos estudiados: La, Pr, Nd y Eu. (a-d, respectivamente) con  $\text{Ln}^{3+}$  5 mM y bicina 2.5 mM.

Se observa que el valor de  $k_2$  (del esquema 9) no varía mucho con el pH ni con el lantánido utilizado. En todos los casos en que pudo ser determinado su valor, éste fue del orden de  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Esto está de acuerdo con la observación de que, al ser un dianión, la constante de asociación complejo-sustrato es muy grande y la saturación impide observar velocidades mayores. Lo anterior es un ejemplo de que no siempre la unión catalizador-sustrato es benéfica, ya que si el complejo es demasiado estable, su posterior transformación a productos se dificulta.

A continuación se muestra la dependencia de  $k_2$  con la concentración del complejo activo y los ajustes al modelo tipo Michaelis-Menten. (figura 65)

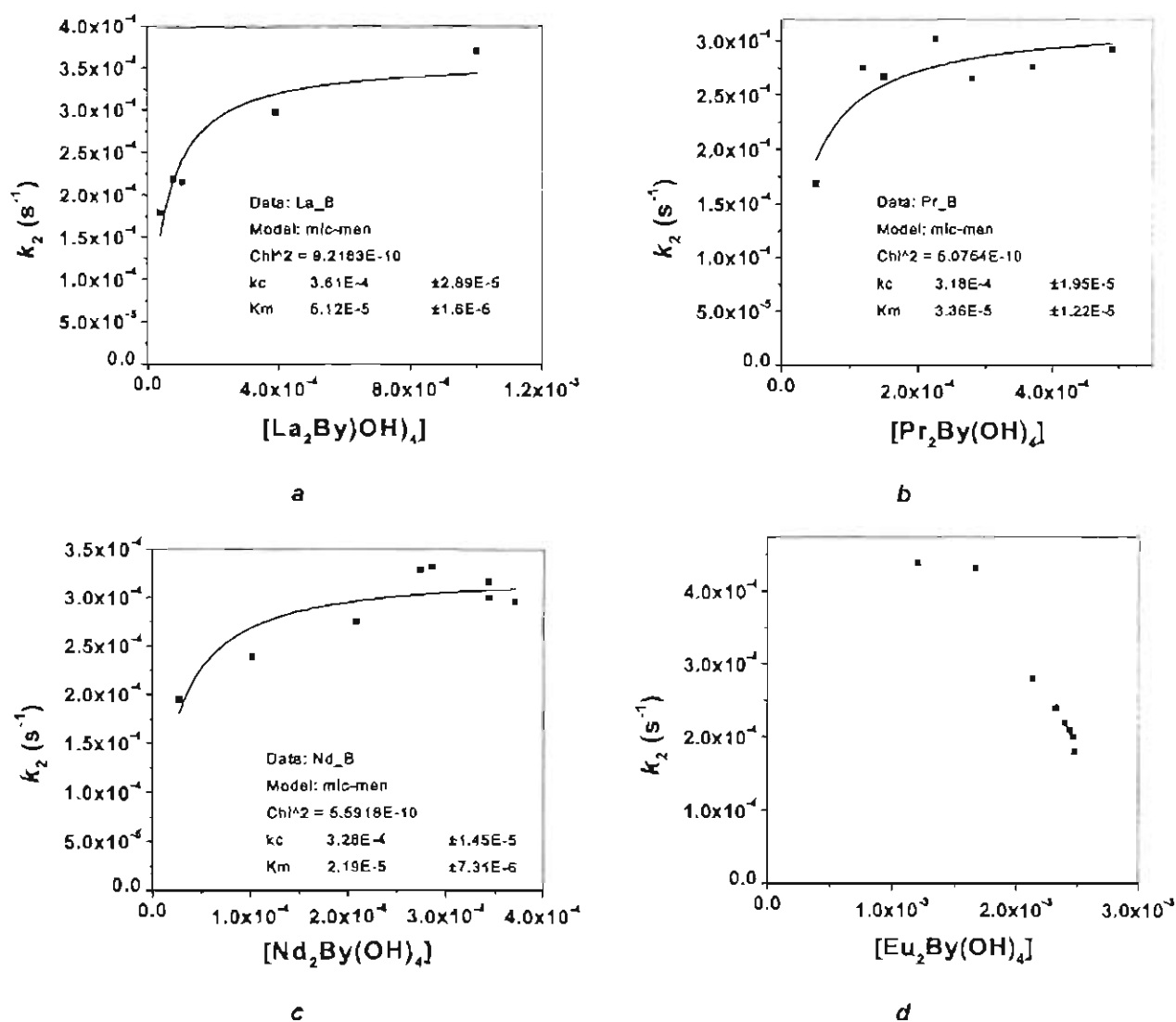


Fig. 65. Dependencia de  $k_2$  con la concentración de  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ . Ln = La, Pr, Nd y Eu (a-d, respectivamente) para las condiciones de la figura 64.



La información obtenida se resume en la tabla 19.

Tabla 19. Constantes catalítica ( $k_C$ ), de Michaelis ( $K_M$ ) y de estabilidad metal-sustrato  $K_{est}$  de los complejos  $Ln_2(bic)(OH)_4^+$ .

	$k_C$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (M)	$K_{est}^{**}$ (M <sup>-1</sup> )
La	$3.61 \times 10^{-4}$	$5.12 \times 10^{-5}$	$1.95 \times 10^4$
Pr	$3.18 \times 10^{-4}$	$3.36 \times 10^{-5}$	$2.98 \times 10^4$
Nd	$3.28 \times 10^{-4}$	$2.19 \times 10^{-5}$	$3.05 \times 10^4$
Eu	$4.40 \times 10^{-4*}$	-	-

\* Máximo valor observado.

\*\*  $1/K_M$ .

Las constantes de estabilidad lantánido-monoéster son alrededor de 10 veces mayores que las del diéster y las constantes catalíticas son menores que las del diéster. Nuevamente el europio presenta un comportamiento extraño, en este caso no es posible pensar en un mecanismo tipo Michaelis-Menten, las razones para lo anterior son las mismas que se mencionaron para la hidrólisis del diéster. Con los dos primeros puntos de la gráfica se puede calcular  $k_C$ , pero no hay forma de determinar  $K_M$ .

### 7.2.2 Ln(III) – Tricina.

La tricina es la N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina (figura 66). Su estructura, muy similar a la de la bicina, nos invita a realizar estudios cinéticos de hidrólisis del BNPP.

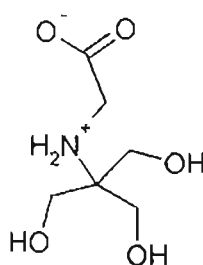


Fig. 66. Tricina

Se hicieron experimentos con lantano, praseodimio, neodimio y europio con concentración 5 mM y tricina 5 mM. La temperatura fue de 25 °C y no se impuso un valor de fuerza iónica. La concentración del BNPP fue  $4 \times 10^{-5}$  M. A continuación (Fig. 67) se presentan los perfiles de la constante de velocidad observada y los diagramas de distribución de especies con el pH.

Las actividades obtenidas son menores a las de bicina, pero aún importantes. Aparentemente la actividad cinética sigue el patrón del complejo  $MLH_{-1}$ , sin embargo, si se grafica  $k_{obs}$  contra su concentración, se observa una importante desviación de la linealidad en tres de los casos. (Fig. 68)

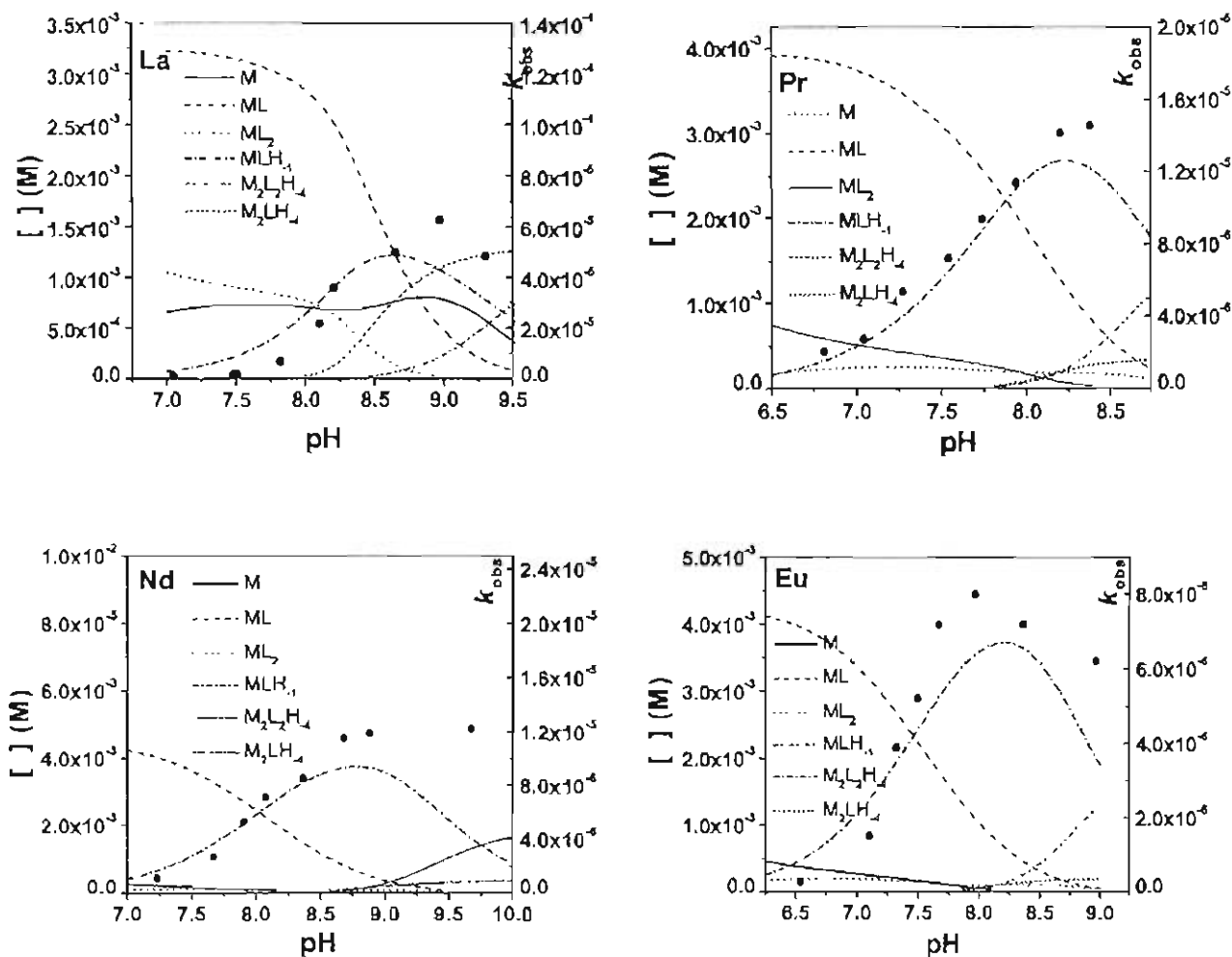


Fig. 67. Perfiles de la constante de velocidad observada y los diagramas de distribución de especies con el pH para La, Pr, Nd y Eu.

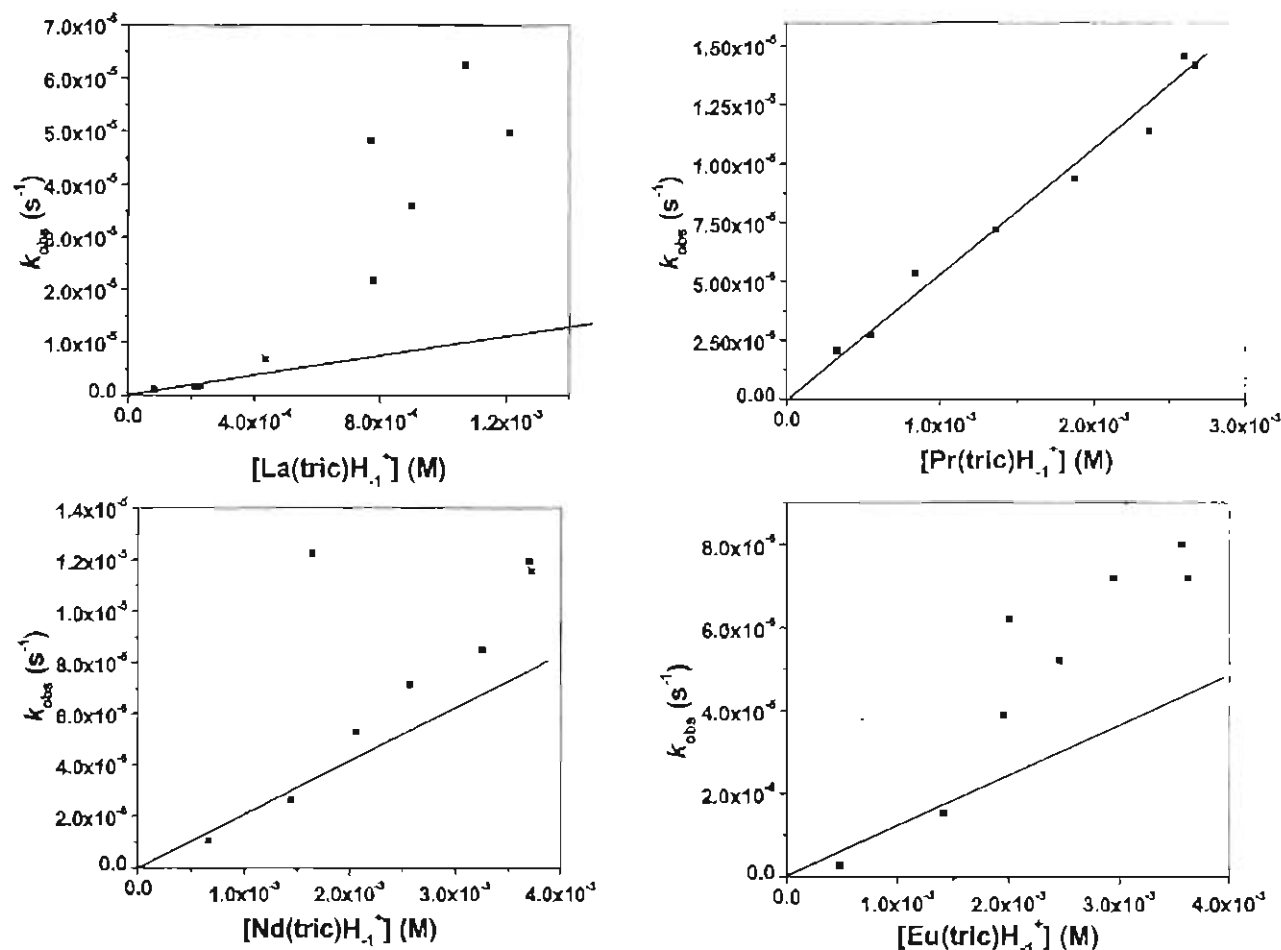


Fig. 88. Correlación entre la actividad hidrolítica y la concentración del complejo  $\text{Ln}(\text{tric})\text{H}_{-1}^{+}$  para  $\text{Ln} = \text{La}, \text{Pr}, \text{Nd}$  y  $\text{Eu}$ .

Esta desviación se puede deber a que las otras especies desprotonadas también sean activas, como se muestra en el siguiente modelo:

$$k_{\text{obs}} = k_1 [\text{Ln}(\text{tric})\text{H}_{-1}] + k_2 [\text{Ln}_2(\text{tric})_2\text{H}_{-4}] + k_3 [\text{Ln}_2(\text{tric})\text{H}_{-4}] \quad \text{Ecuación 5}$$

Para obtener los valores de  $k_{1,2,3}$ , se realiza una regresión multiparamétrica del valor de  $k_{\text{obs}}$  en función de las concentraciones de los complejos involucrados. Las constantes de segundo orden así obtenidas se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Constantes de velocidad de segundo orden de los complejos lantánido-tricina activos.

$k$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	La	Pr	Nd	Eu
$\text{Ln}(\text{tric})\text{H}_{-1}$	$3.5 \times 10^{-2}$	$5.02 \times 10^{-3}$	$3.02 \times 10^{-3}$	$2.44 \times 10^{-3}$
$\text{Ln}_2(\text{tric})_2\text{H}_{-4}$	-	$5.25 \times 10^{-3}$	$4.64 \times 10^{-3}$	$1.62 \times 10^{-3}$
$\text{Ln}_2(\text{tric})\text{H}_{-4}$	$2.1 \times 10^{-2}$	-	$6.99 \times 10^{-3}$	-

Las gráficas de la figura 69 muestran el ajuste de los perfiles de pH de  $k_{obs}$  con el modelo y las constantes antes mencionadas.

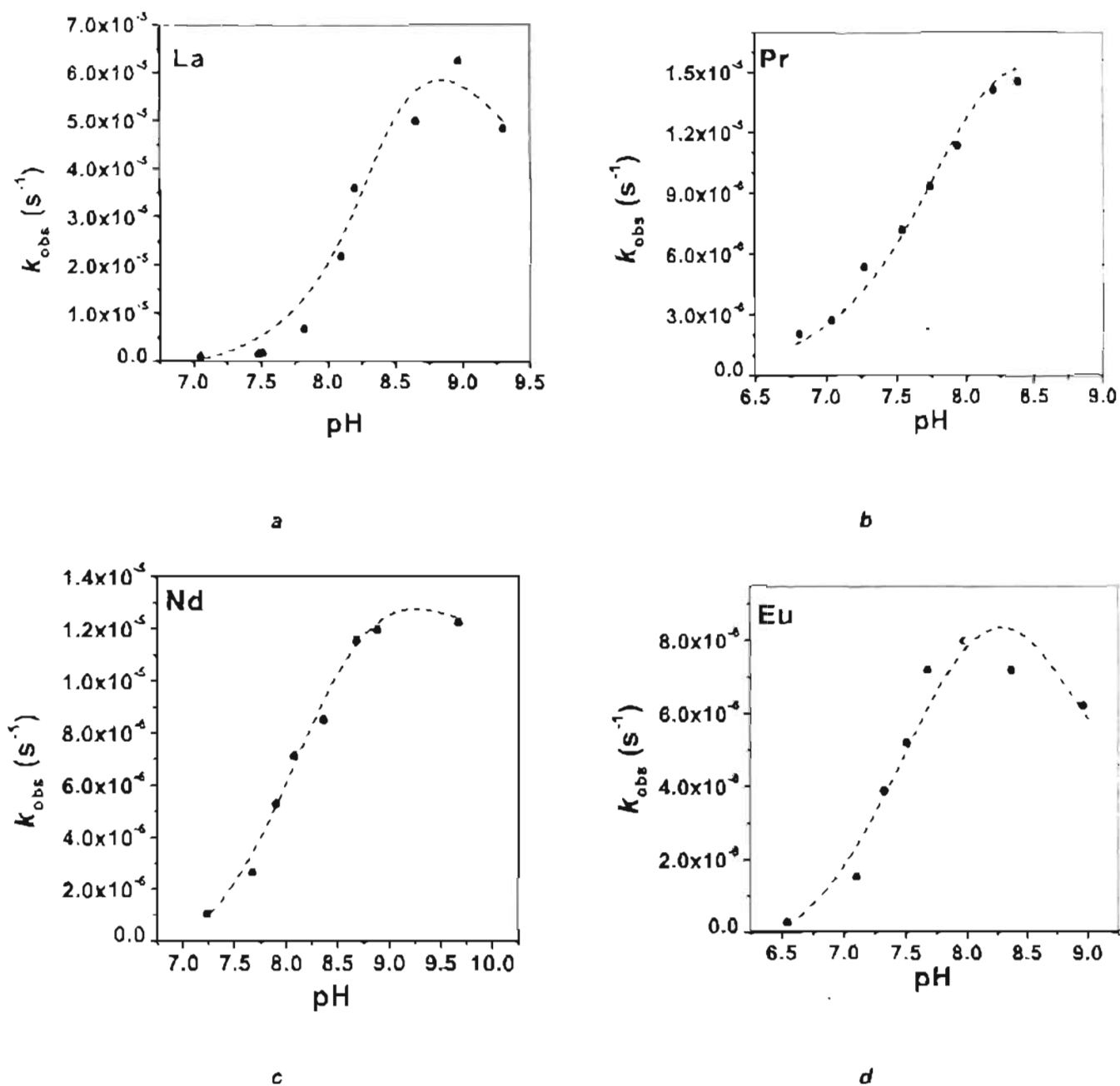


Fig. 69. Ajuste de la actividad cinética con la ecuación 7 y las constantes de la tabla 23.

A diferencia de lo que pasa con bicina, con tricina se identificaron tres especies reactivas. La mayor parte de la actividad se debe a  $Ln(tric)H_{-1}$  porque esa especie es la que predomina en las condiciones de trabajo, sin embargo, el valor de la constante de segundo orden es muy cercano para los tres complejos.

Las velocidades obtenidas con este sistema son menores que las de bicina, además se observa que al pasar de lantano a los otros lantánidos, las velocidades son ca. 10 veces menores.

Esto va en contra de la idea de que con cationes más ácidos se obtiene una mayor actividad. Como se demostró para los complejos de bicina, los cationes más ácidos desactivan al nucleófilo coordinado (hidróxido), perdiendo así la ventaja de ser más ácidos.

### 7.2.3 Ln(III) – TES.

El *buffer* biológico conocido como TES (figura 70) es el ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetansulfónico. Su estructura es muy similar a la de la tricina, salvo que en vez del grupo carboxilato, se encuentra presente un metilensulfonato.

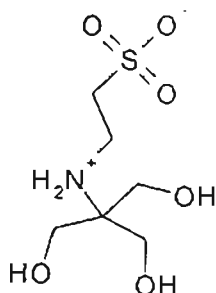


Fig. 70. TES

Las pruebas cinéticas equimolares con lantano y europio revelan que el TES no estabiliza eficientemente a estos lantánidos, ya que hay precipitación en valores de pH no muy altos. Además, la actividad cinética en esas condiciones no es apreciable. Al aumentar la concentración de TES a 50 mM (Fig. 71a), la actividad cinética es apreciable, sin embargo hay precipitación antes de alcanzar los niveles de bicina o incluso los de tricina.

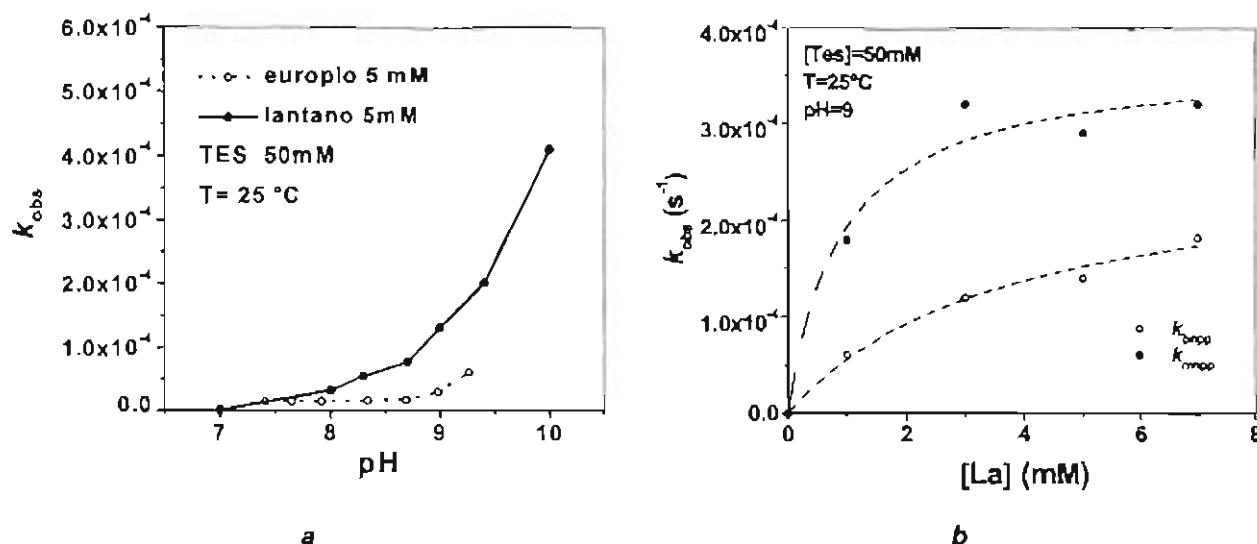


Fig. 71. a) Perfil de pH de la constante de velocidad observada con Ln(III) 5 mM y TES 50 mM para lantano y europio. b) dependencia de  $k_{BNPP}$  y  $k_{MONO}$  con la concentración total de lantano.

La gráfica de  $k_{obs}$  contra concentración total de lantano (figura 71b) muestra una rápida saturación tanto para  $k_1$  (hidrólisis de BNPP) como para  $k_2$  (hidrólisis del monoéster), por lo que no es posible lograr mayores niveles de actividad.

#### 7.2.4 Y(III) – Bicina.

Por su comportamiento químico, comúnmente el itrio es considerado un lantánido. Su mayor carácter ácido nos hace pensar que podemos obtener actividad cinética a valores menores de pH. Por lo anterior se probó la actividad cinética de mezclas equimolares itrio / bicina y con exceso de itrio a varios valores de pH. Los perfiles de pH encontrados se muestran en la siguiente gráfica. (figura 72)

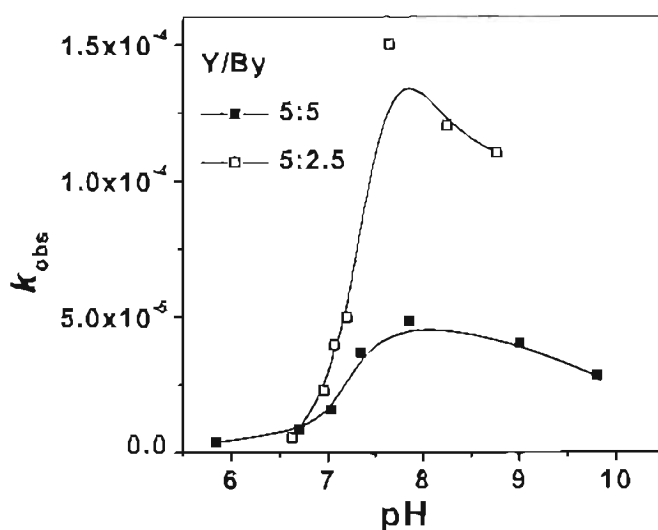


Fig. 72. Perfil de pH de la constante de velocidad observada de la hidrólisis de BNPP por itrio 5 mM y bicina 5 mM (cuadros cerrados y 2.5 mM (cuadros abiertos).

Se observa que al igual que con La, Pr, Nd y Eu, hay mayor actividad con exceso de metal. Además, como se esperaba, la actividad cinética se da en valores considerablemente menores de pH. Ésta, sin embargo no es muy alta y muy probablemente haya precipitación después de pH 8.

### 7.3 Estudios de Resonancia Magnética Nuclear

Con el fin de obtener la mayor información posible sobre la estructura y los equilibrios de las especies descritas en la parte de potenciometría y en la de cinética se llevaron a cabo experimentos de  $^1\text{H}$  RMN. El principal objetivo de estos experimentos es determinar la fuente de los protones que se liberan para dar lugar a los complejos dinucleares.

#### 7.3.1. Bicina

Se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de bicina en  $\text{D}_2\text{O}$  a distintos valores de pD, como se muestra en la figura 73.

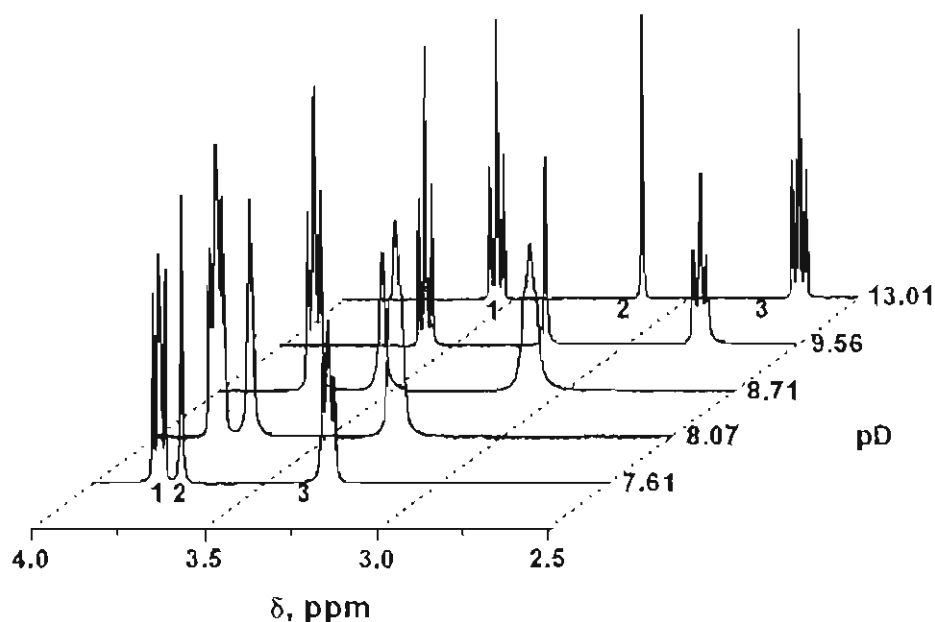


Fig. 73. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de bicina.

Como es de esperarse, se observan tres señales, dos tripletes que integran para 4 protones (**señales 1 y 3**) y un singlete que integra para dos (**señal 2**). Al aumentar el  $\text{pD}$  se nota un desplazamiento de los picos hacia campo más alto, resultado de la desprotonación de la bicina. La asignación de los picos se ilustra en el diagrama de la figura 74.

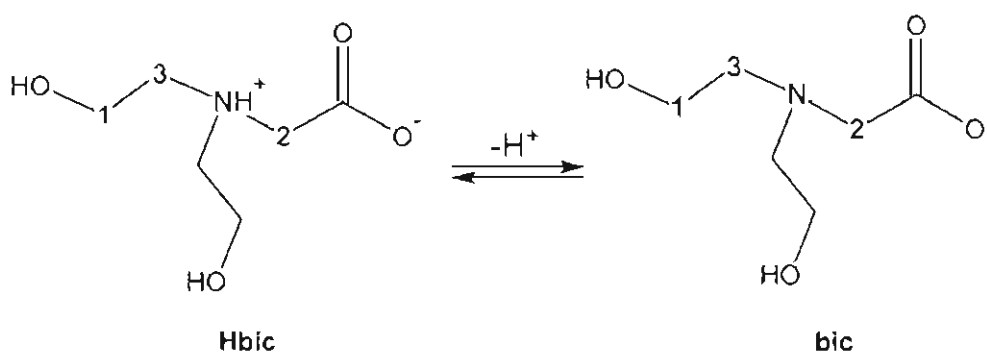


Fig. 74. Diagrama de desprotonación de la bicina y los diferentes tipos de protones.

La asignación del pico **2** es inmediata por su integración y multiplicidad, ya que integra para 2 protones y no se encuentra acoplado. Los protones **1** y **3** se encuentran acoplados



entre sí e integran para 4. En este caso la asignación se hace por medio del comportamiento con respecto al pD. (figura 75)

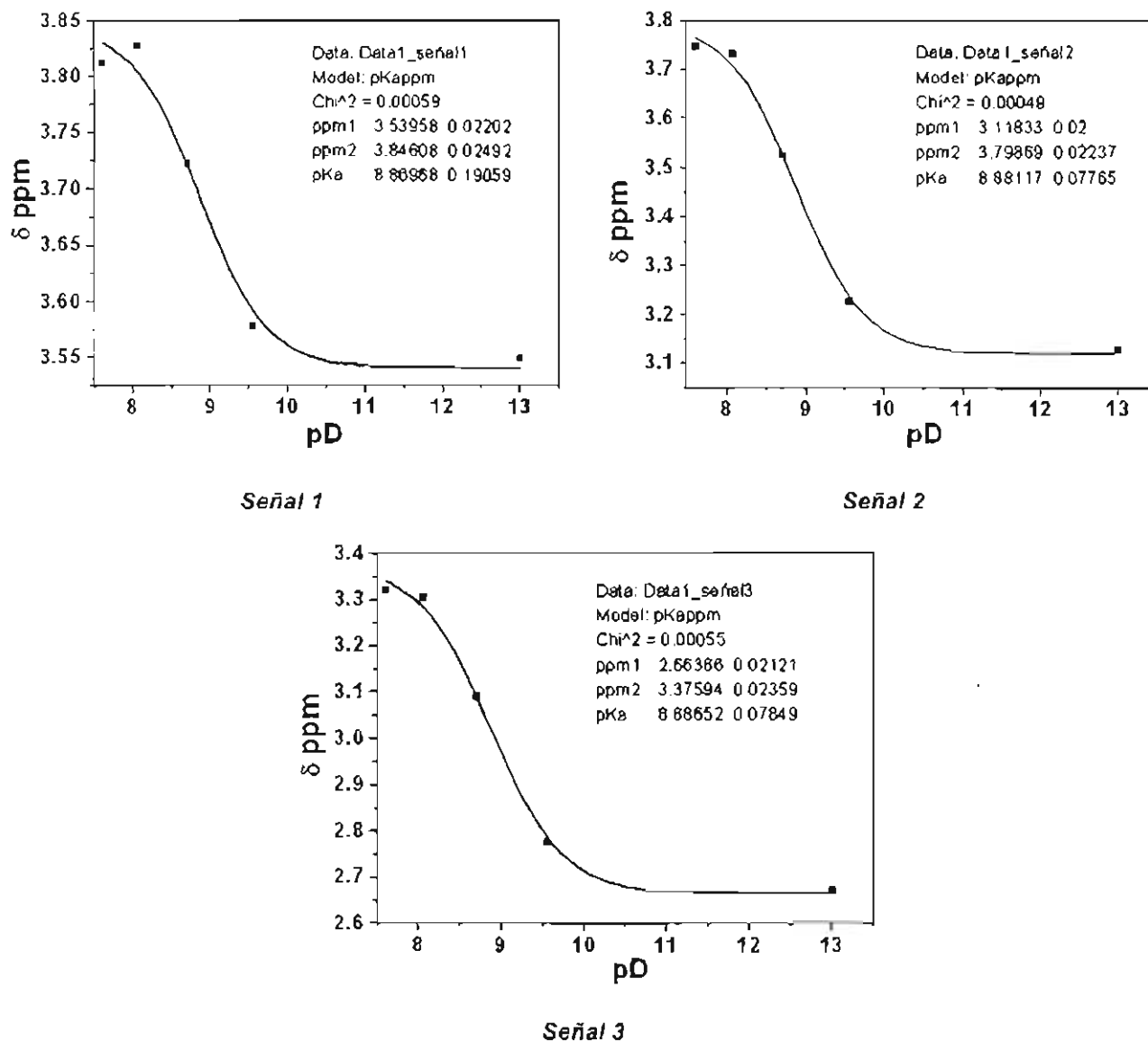


Fig. 75. Diagramas de desplazamiento químico contra pD de las señales en los espectros de la bicina.

Las líneas corresponden al ajuste para un modelo en el cual **ppm1** corresponde al desplazamiento químico de la especie desprotonada y **ppm2** al de la especie protonada. **pK<sub>a</sub>** es el valor del pK<sub>a</sub> calculado para el equilibrio entre estas dos especies (ver apéndices, sección 10.2). Los resultados se resumen en la tabla 21.

Tabla 21. Parámetros obtenidos del ajuste para las señales de los espectros de la bicina.

	$\delta_{\text{prot}}$	$\delta_{\text{desprot}}$	$\Delta\delta$	$\text{pK}_a$
señal1	3.85	3.54	0.31	8.87
señal2	3.80	3.12	0.68	8.88
señal3	3.38	2.66	0.72	8.89

La **señal 2** presenta un  $\Delta\delta$  de 0.68, como corresponde para un metileno adyacente al grupo que presenta el equilibrio de protonación. De manera análoga se concluye que la **señal 3** corresponde al metileno del hidroxietilo que se encuentra junto al grupo amino. La **señal 1** corresponde, entonces, al metileno junto al grupo OH. Al estar más lejos del nitrógeno, éste se ve menos afectado por la desprotonación y presenta un  $\Delta\delta$  de 0.31 ppm. Otro factor que favorece esta asignación es que la **señal 3** presenta un ensanchamiento apreciable en valores de pH cercanos al  $\text{pK}_a$  debido al intercambio protónico. La **señal 2** también presenta este ensanchamiento.

El valor de  $\text{pK}_a$  calculado con valores de pD corresponde a 8.88. Si se toma en cuenta el efecto isotópico para ácidos de estructura y fuerza similar<sup>141</sup>, éste corresponde a un valor de  $\text{pK}_a$  de 8.18, el cual coincide con el calculado por Hyperquad 2000.

### 7.3.2. Lantano – bicina (5 mM : 5 mM)

Se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de lantano 5 mM y bicina 5 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a distintos valores de pD. (Fig. 76)

En pD 4.28 el espectro es muy similar al de la bicina libre, porque al encontrarse aún protonada, la interacción con el lantano es débil. Las **señales 2 y 3**, sin embargo, ya se muestran ensanchadas. Lo anterior es indicativo de que el  $\text{pK}_a$  ha disminuido debido a la interacción con el lantano.

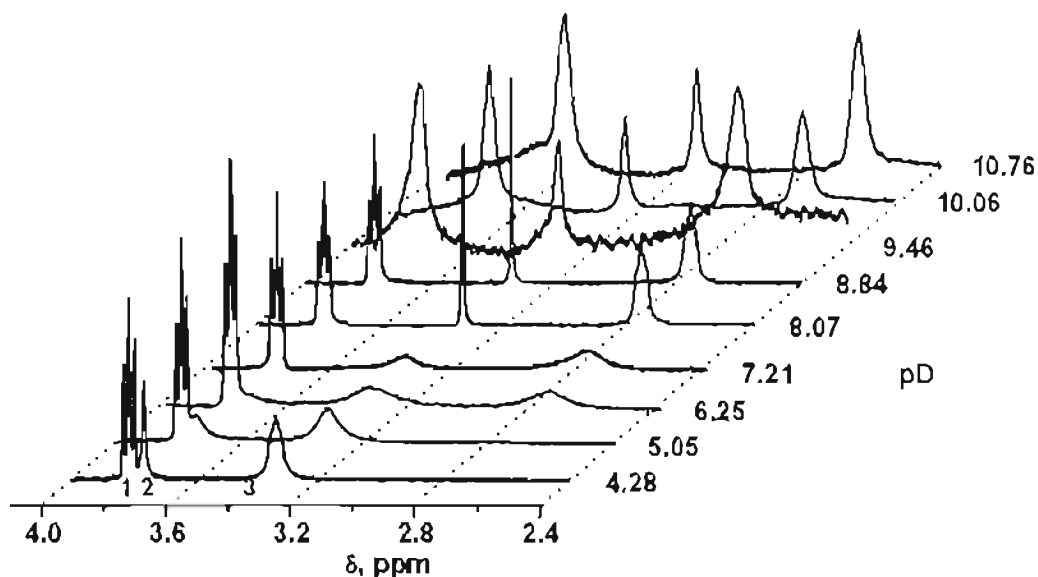


Fig. 76. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de bicina 5 mM y lantano 5 mM.

Al seguir aumentando el pD de 5 a 8, el triplete del metileno adyacente al grupo OH (señal 1) se mueve hacia campo alto sólo 0.02 ppm. El singulete del metileno entre el amino y el carboxilato (señal 2, 3.77 ppm) desaparece gradualmente y aparece una nueva señal en 2.75 ppm. Siempre hay una señal cerca de 3.34 ppm. En pD 4.28 ésta puede identificarse como la señal 3, correspondiente al metileno del hidroxietilo adyacente al nitrógeno. En pD 8 ésta corresponde a la señal 2 (metileno entre el amino y el carboxilato).

Los desplazamientos químicos encontrados se resumen en la tabla 22.

Tabla 22. Desplazamiento químico de las señales en los espectros de bicina 5 mM y lantano 5 mM.

pD	4.28	5.05	6.25	7.21	8.07	8.84	9.46	10.06	10.76
$\delta_1$	3.82	3.80	3.79	3.78	3.91	3.78	3.78	3.72	3.63
$\delta_2$	3.77	3.76	3.34	3.37	3.35	3.34	3.34	3.27	3.19
$\delta_3$	3.34	3.33	2.77	2.78	2.77	2.76	2.75	2.70	2.67

Resumiendo, la señal 1 se desplaza ligeramente, la señal 2 desaparece en 3.77 y aparece en 3.35 y la señal 3 desaparece en 3.34 y aparece en 2.75.

El hecho de que las señales 2 y 3 no se muevan, sino que aparezcan y desaparezcan significa que las señales de la bicina libre y coordinada aparecen separadas en vez de

promediarse. Lo anterior es indicativo de un intercambio de bicina lento, en la escala de tiempo de la resonancia magnética nuclear. A pesar de que generalmente los lantánidos son conocidos como metales lábiles, en este caso el lantano no se comporta así debido a que la bicina se coordina como un quelato. En la figura 77 se presentan las gráficas de  $\delta$  contra pD para las tres señales y en la 78 el diagrama de distribución de especies del sistema en esas condiciones.

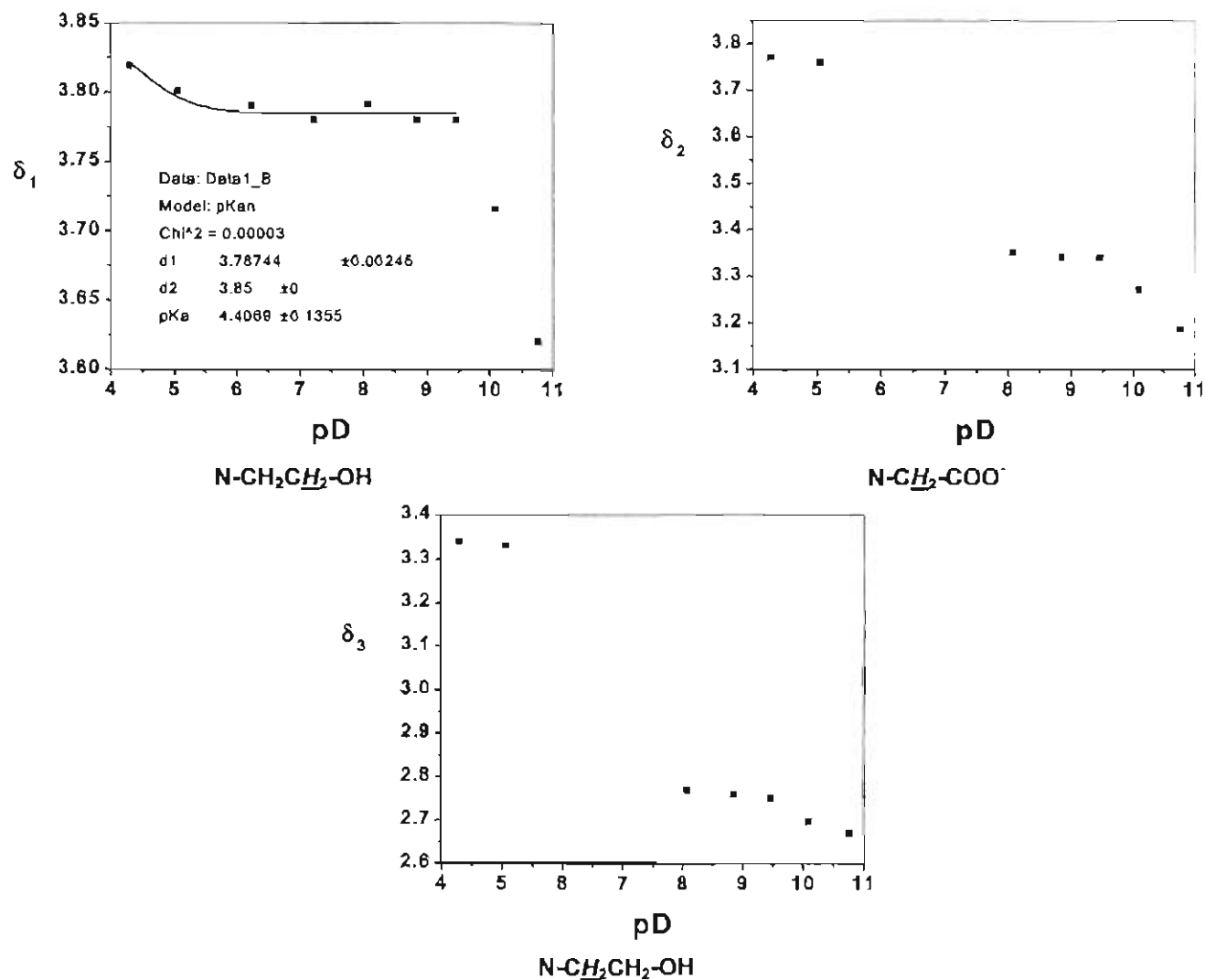


Fig. 77. Diagramas de desplazamiento químico contra pD de las señales en los espectros de bicina 5 mM y lantano 5 mM.

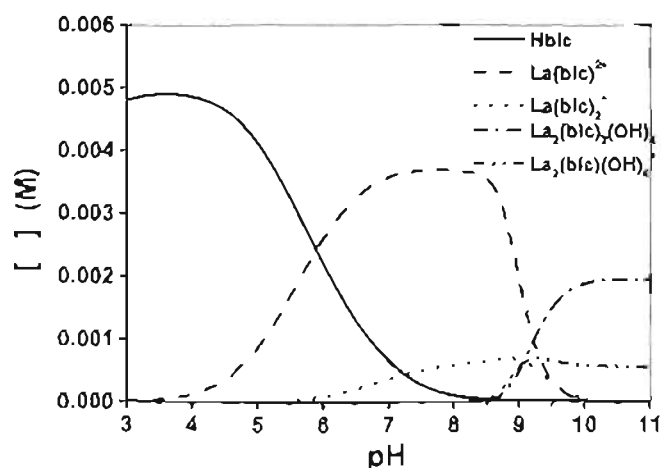


Fig. 78. Diagrama de distribución de especies  
La 5mM : bic 5mM.

En la tabla 23 se muestran los desplazamientos químicos de las diferentes especies.

Tabla 23. Desplazamientos químicos de las diferentes especies del sistema La 5mM : bic 5mM y algunos parámetros obtenidos a partir de ellos.

	bic (a)	Hbic	$\text{La}(\text{bic})_n^{3-n}$ (b)	$\Delta\delta_1$ (b-a)	$\text{pK}_a$	$\text{La}_2(\text{bic})_m(\text{OH})_x^{6-(m+4)}$ pD=10.76 (c)	$\Delta\delta_2$ (b-c)
N- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$	3.54	3.85	3.79	0.25	4.41	3.63	0.16
N- $\text{CH}_2\text{-COO}^-$	3.12	3.80	3.35	0.23	-	3.19	0.16
N- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$	2.66	3.37	2.77	0.11	-	2.67	0.10

Los valores de las primeras dos columnas se toman del análisis que se hizo para la bicina libre y se incluyen con fines de comparación. La línea de ajuste corresponde, nuevamente al modelo presentado en la sección 9.2. El valor de la señal 1 de Hbic se toma como 3.85 y se hace constante. Como resultado se obtiene el desplazamiento químico de los protones de la bicina coordinada y el valor del  $\text{pK}_a$ . Este último se redujo de 8.88 en la bicina libre a 4.41 en presencia de lantano, como consecuencia de la coordinación.

Para las señales 2 y 3 no es posible realizar este ajuste ya que estas señales no se desplazan, sino que, gradualmente, desaparecen en un lugar y aparecen en otro. El desplazamiento químico de la bicina coordinada para estas señales se toma del valor promedio que presentan en  $6.25 < \text{pD} < 9.46$ .

Por último, en la tabla se incluye el valor de los desplazamientos químicos en pD 10.76. En este valor de pD, toda la bicina se encuentra formando parte de alguno de los complejos hidroxó binucleares.

En el intervalo de pD entre 5 y 9 tenemos coexistencia de  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$  y  $\text{La}(\text{bic})_2^+$ , sin embargo observamos sólo una señal. Esto quiere decir que los valores de desplazamiento químico de estas dos especies se promedian por el intercambio de la bicina o que son muy cercanos. Lo más probable es que se trate de una combinación de estos dos factores.

El valor  $\Delta\delta_1$  nos indica qué tanto afecta a la bicina aniónica la coordinación. Podemos ver que los metilenos adyacentes al grupo alcohol y al carboxilato son los más afectados. De ahí se deduce que la coordinación por el nitrógeno es más débil que la de los otros grupos. Esto concuerda con la afirmación de que los lantánidos prefieren a los ligandos donadores por oxígeno sobre los donadores por nitrógeno, por ser el oxígeno más duro que el nitrógeno.

En valores de pD superiores a 9, las señales presentan ensanchamiento y un corrimiento gradual hacia campo alto. Esto se interpreta como resultado de la desprotonación de los complejos para formar las especies dinucleares. En pD 10.76 toda la bicina está incorporada a alguno de estos complejos. El valor  $\Delta\delta_2$  indica qué tanto afecta esta desprotonación al ambiente electrónico de los protones en la bicina coordinada. Se observa que la señal de los metilenos unidos a un donador por oxígeno se desplaza 0.16 ppm, mientras que el metileno unido únicamente a un grupo donador (amino) se desplaza 0.1 ppm. Nuevamente esto indica que la coordinación por nitrógeno es débil.

El hecho de que tanto el metileno unido al grupo alcohol, como el unido al carboxilato se desplacen de igual manera indica que la desprotonación tiene lugar en moléculas de agua coordinadas y no en los grupos alcohol, ya que de ser ese el caso, el metileno unido al -OH debería desplazarse más que el otro. Además el desplazamiento debería ser mayor. Por ejemplo, en 1999 Bazzicalupi *et. al.*<sup>142</sup> informaron que la desprotonación del alcohol de

un macrociclo coordinado a zinc resulta en la formación del complejo binuclear  $[M_2LH_1]^{3+}$ , con el desplazamiento de 0.3 ppm del metileno adyacente a este grupo.

También puede obtenerse información del comportamiento de los valores de integración. Debido a que en varios valores de pH las señales no están resueltas, el estudio de los valores de la integración se hace por regiones, es decir, no se tomará la integración de determinada señal, sino que se hará de la región, por lo que el cambio en el valor de la integración nos indicará qué señal(es) son las presentes en ese valor de pD.

Las regiones son las siguientes: **región 1**,  $3.9 > \text{pD} > 3.5$ ; **región 2**,  $3.4 > \text{pD} > 3.2$  y **región 3**,  $3.1 > \text{pD} > 2.5$ . En la tabla 24 se muestran los valores de la integración junto con el ancho de banda de la señal que aparece en la **región 3**.

**Tabla 24. Integración de las señales en todas las regiones (número de protones) y ancho de banda (Hz) de la señal en la región 3.**

pD	4.28	5.05	6.25	7.21	8.07	8.84	9.46	10.06	10.76
$I_1$	6.08	6.14	5.08	4.54	4.28	4.00	4.13	4.08	3.92
$I_2$	3.92	3.50	2.80	1.96	1.90	2.00	1.82	1.78	2.02
$I_3$	0	0.26	2.12	3.50	3.82	4.00	4.05	4.14	4.06
$w_3$	–	–	42	40	14	14	14	15	15

A continuación (figura 79) se presentan las gráficas de la integración de las tres señales contra pD.

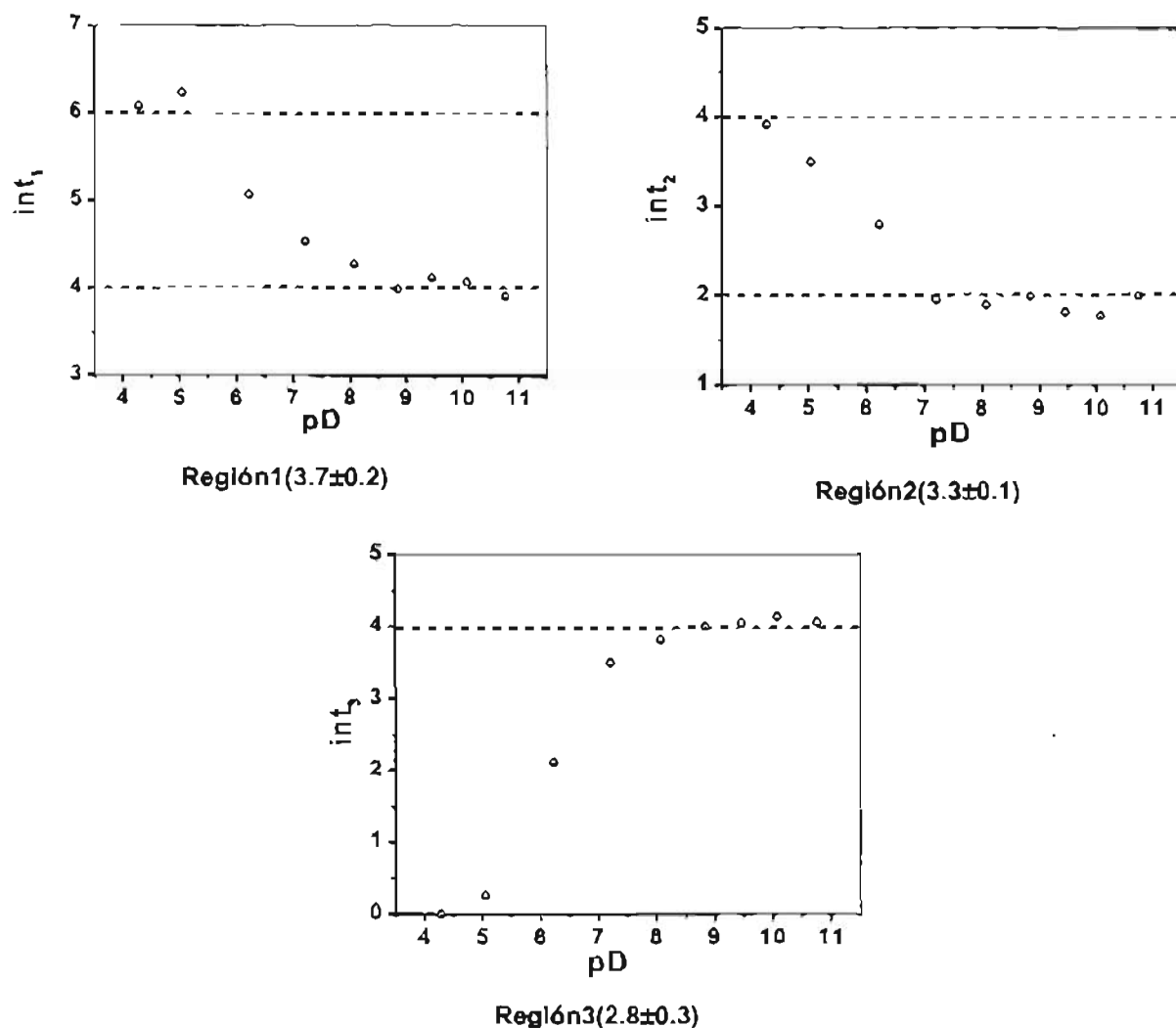


Fig. 79. Valor de la Integración contra pD del sistema biclna 5 mM y lantano 5 mM.

Se observa que la **región 1** pasa de un valor de integración de 6 a un valor de 4 protones. Esto significa que al principio ahí hay dos señales, la correspondiente a los dos  $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$  y la correspondiente a  $\text{N-CH}_2\text{COO}^-$ . Al aumentar pD, la señal de  $\text{N-CH}_2\text{COO}^-$  desaparece debido a la coordinación y finalmente sólo queda la señal de  $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ , con una integración para 4 protones.

La **región 2** presenta al inicio, la señal de los  $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ , por lo que integra para 4 protones. Gradualmente esta señal desaparece para dar lugar a la de  $\text{N-CH}_2\text{COO}^-$ . Por eso al final se tiene un valor de integración de 2 protones.

En la **región 3** al inicio no hay señal, al aumentar pD, paulatinamente aparece la señal de los  $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ , por lo que la integral pasa de 0 a 4 protones.



Se ha comentado el hecho de que las señales presentan pérdida de la multiplicidad y ensanchamiento. A continuación se hace un análisis del ancho de banda en Hz a la mitad de la altura del pico ( $W_{1/2}$ ) de la **señal 3** (Fig. 80) en los diferentes valores de pD en función de la especiación.

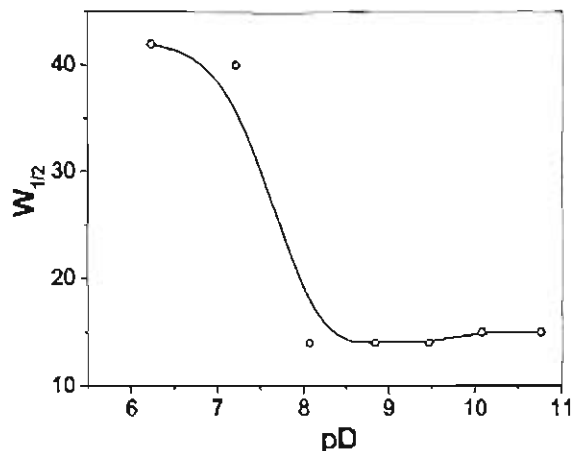


Fig. 80. Ancho de banda de la señal en la región 3.

En pD 4.28 no hay señal en la **región 3**, por lo que no puede medirse el ancho. Luego se observan valores grandes de ancho de banda con un máximo en pD ca. 6 y luego un rápido decremento. En  $8 < \text{pD} < 9.5$  el valor es mínimo y constante. Finalmente, en valores de pD  $> 9.5$  se tiene un nuevo incremento, aunque pequeño.

Los valores grandes de  $W_{1/2}$  pueden interpretarse de tres maneras.

- ❖ La señal de los complejos  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  y  $\text{La}(\text{bic})_2^+$  es ancha porque en esos valores de pD aún hay mucha bicina libre, la cual constantemente se está intercambiando con la coordinada.

- ❖ Los complejos  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  y  $\text{La}(\text{bic})_2^+$  tienen un desplazamiento químico ligeramente distinto.

- ❖ La formación del ciclo hace que los protones del metileno sean ligeramente distintos.

En la región de  $8 < \text{pD} < 9.5$  no hay bicina libre (ver figura 91), por lo que el ancho de banda disminuye, y lo hace de manera importante, lo que nos lleva a pensar que el intercambio con la bicina libre es el principal responsable del ensanchamiento de las bandas.

El ensanchamiento en  $pD > 9.5$  se debe a que se forman los complejos  $La_2(bic)_2(OH)_4$  y  $La_2(bic)(OH)_4^+$ , lo que provoca la liberación de bicina libre, además el desplazamiento químico de estas señales puede ser distinto, lo que también resultaría en el ensanchamiento de la señal.

### 7.3.3. Lantano – bicina (5 mM : 2.5 mM).

También se realizaron experimentos de RMN con lantano 5 mM y bicina 2.5 mM. En la figura 81 se presentan los espectros obtenidos como función del  $pD$ .

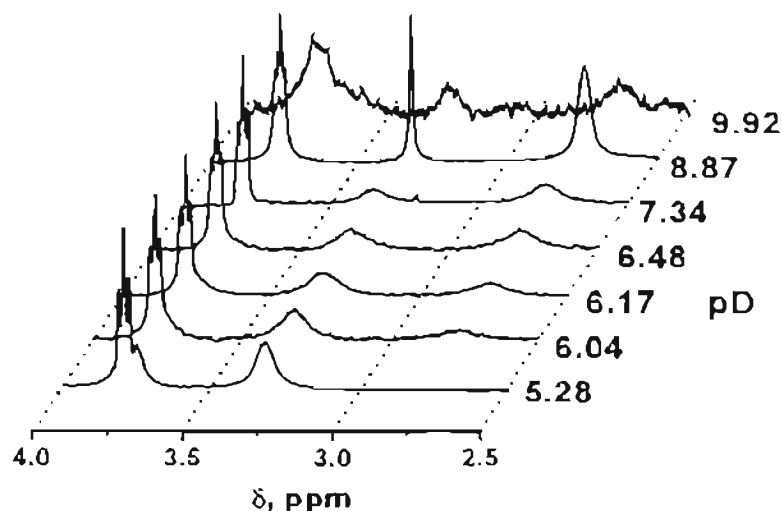


Fig. 81. Espectros de  $^1H$  RMN de bicina 2.5 mM y lantano 5 mM.

Los parámetros calculados se presentan en la tabla 25.

Tabla 25. Parámetros obtenidos de los espectros del sistema bic 2.5 mM y lantano 5 mM.

pD	5.28	6.04	6.17	6.48	7.34	8.87	9.92
$\delta_1$	3.794	3.792	3.792	3.790	3.790	3.774	3.642
$\delta_2$	3.75	3.33	3.33	3.34	3.37	3.33	3.21
$\delta_3$	3.32	2.77	2.76	2.76	2.78	2.75	2.63
$f_1$	6.32	6.08	5.64	5.64	5.12	4.14	4.04
$f_2$	3.68	3.10	2.80	2.26	2.22	2.26	1.90
$f_3$	0	0.82	1.56	2.10	2.66	3.60	4.06
$w_3$	–	37.2	39.8	41.7	36.8	16.1	32.1

Nuevamente, hasta pD 9, la **señal 1** se desplaza mientras que las señales **2** y **3** desaparecen en un lugar y aparecen en otro. Durante este proceso las señales son anchas y en pD 8.87 nuevamente se afinan. Después, en pD 9.92 las señales otra vez se ensanchan y se desplazan hacia campo más alto.

Si observamos las gráficas de desplazamiento químico contra pD, vemos que son muy similares a las de la relación equimolar. Sin embargo si hacemos el ajuste para la **señal 1**, encontramos que el  $pK_a$  disminuye hasta 4.09, cuando el valor para la relación 5 mM : 5mM era de 4.41. Al igual que en el caso anterior el comportamiento puede verse como de dos etapas: primero el paso de bicina protonada a bicina coordinada y luego el paso de bicina coordinada a la formación de los complejos hidrox.

La diferencia entre los dos sistemas es la proporción de los complejos que se forman,  $La(bic)^{2+} / La(bic)_2^+$  por un lado y  $La_2(bic)_2(OH)_4 / La_2(bic)(OH)_4^+$  por el otro). Esta diferencia no repercute tanto en los desplazamientos químicos como en el valor de pD en el cual se dan estas transiciones. Este efecto también se observa en la segunda etapa, por ejemplo, la **señal 1** presenta, en la relación 5:5 un valor de 3.72 en pD 10.06 y la relación 5:2.5 lo presenta de 3.64 en pD 9.92.

Si comparamos ambos diagramas de distribución de especies (figuras 78 y 82) podemos notar tanto el cambio en la proporción de las especies como que con exceso de metal las especies aparecen en valores de pD menores. La **señal 2** en este caso se puede considerar como pura a partir de pD 6.5, cuando en el caso anterior el valor de pD era 8.5. Lo mismo ocurre con la aparición de la **señal 3**. (ver figura 83)

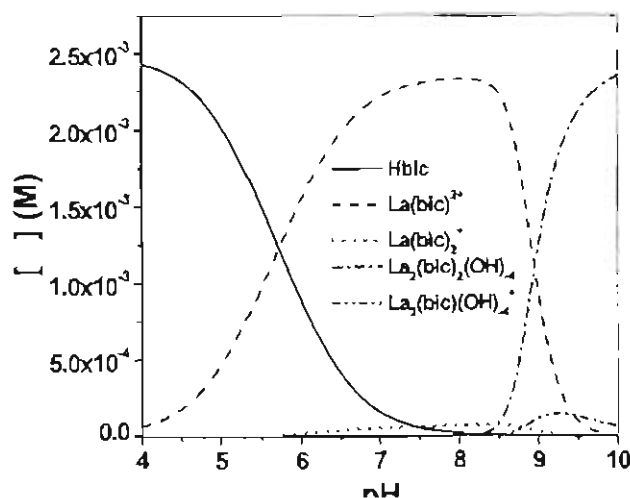


Fig. 82. Diagrama de distribución de especies para el sistema bicina 2.5mM y lantano 5 mM.

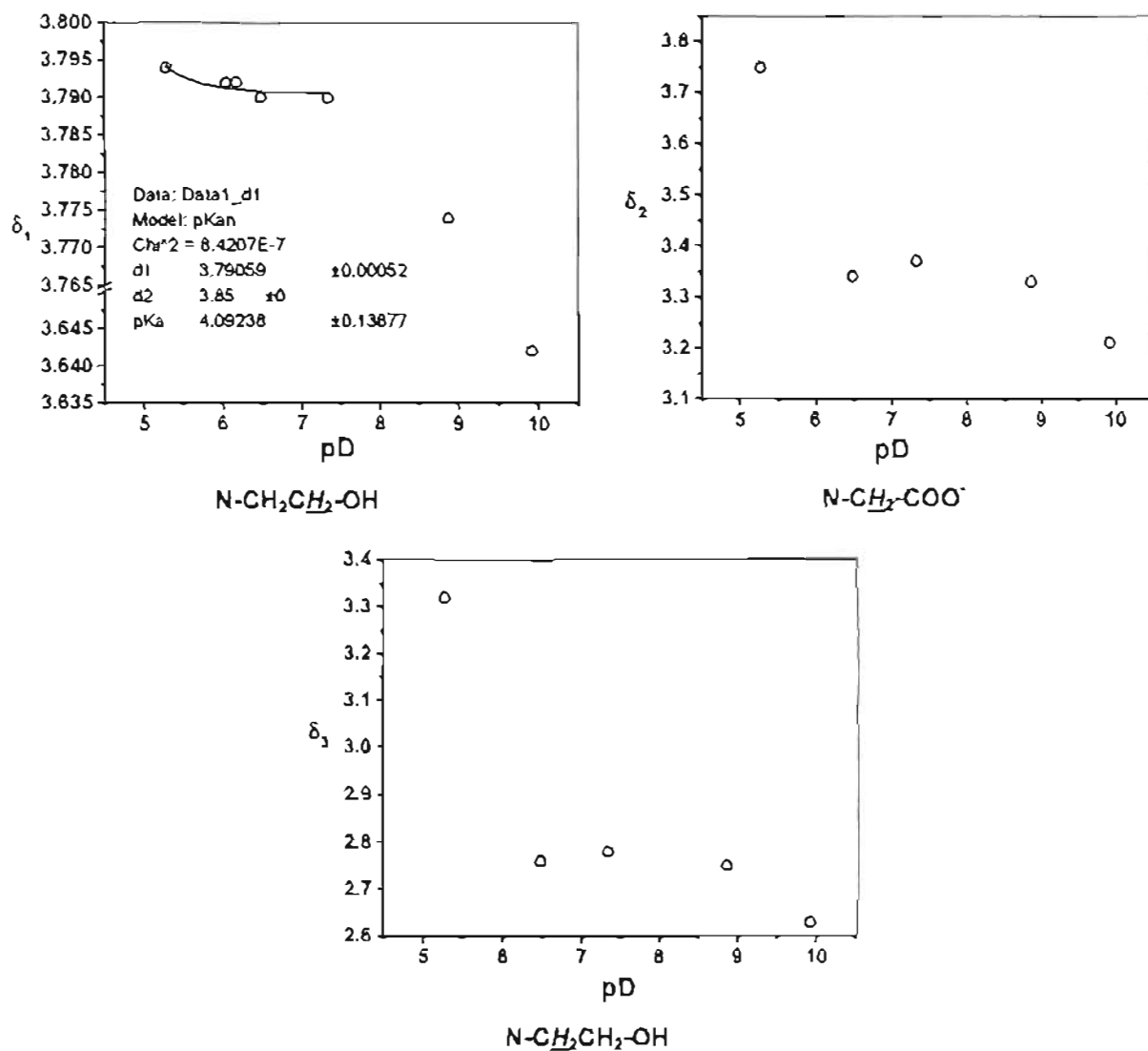


Fig. 83. Diagramas de desplazamiento químico contra pD de las señales en los espectros de bicina 2.5 mM y lantano 5 mM.

El comportamiento de las integrales también es muy similar al anterior y no proporciona nueva información. (Fig. 84)

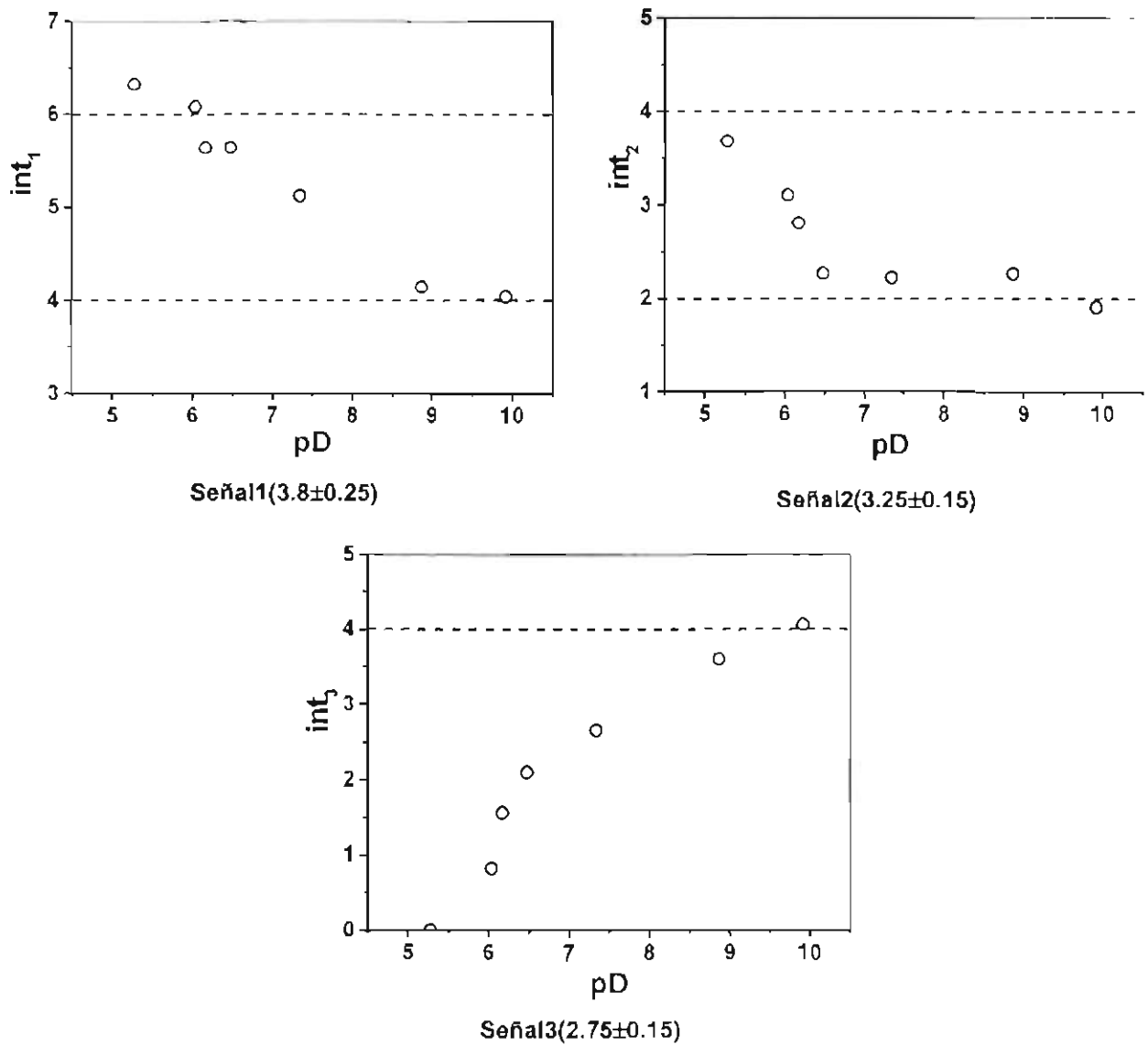


Fig. 84. Valor de la integral contra pD del sistema bicina 2.5 mM y lantano 5 mM.

El comportamiento del ancho de banda de la señal 3 es muy similar al de 5:5. (figura 85)

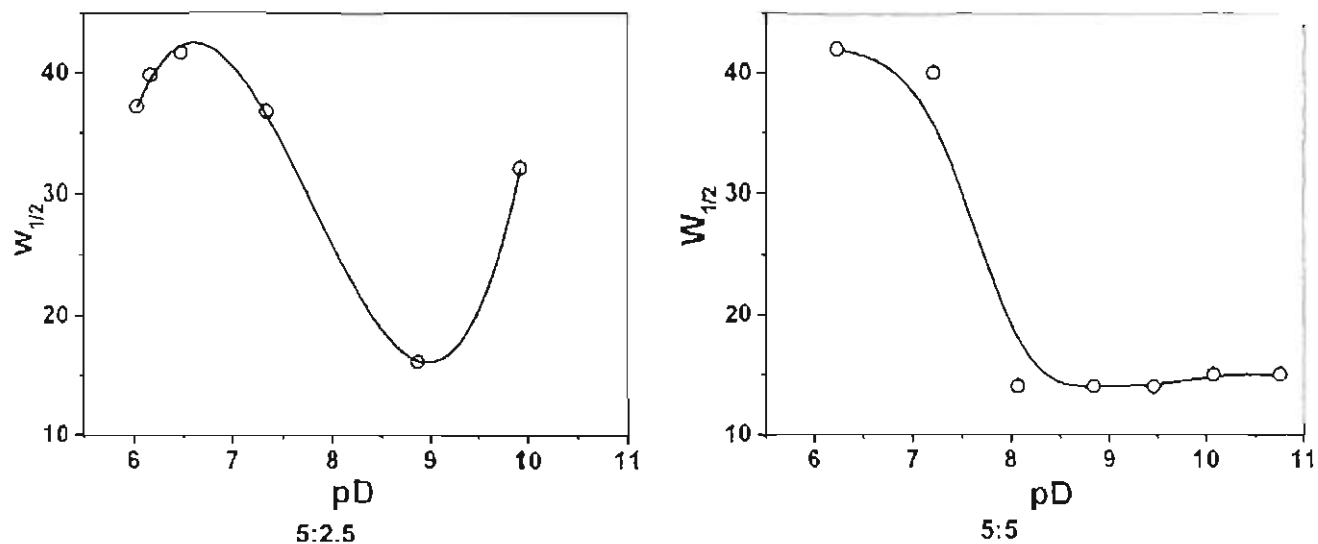


Fig. 85. Ancho de banda de la señal 3 para las proporciones La:bic indicadas en los gráficos.

La principal diferencia es que con exceso de metal, a pD 10.06 la señal se muestra más ancha. Esto, sin embargo es muy probable que se deba a que ese experimento presentó una ligera precipitación, la cual afecta todas las señales y provoca la presencia de ruido.

#### 7.3.4. Neodimio – bicina.

Se hicieron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  en presencia de neodimio 5 mM y bicina 5 mM a diferentes valores de pD, los cuales se muestran en la figura 86.

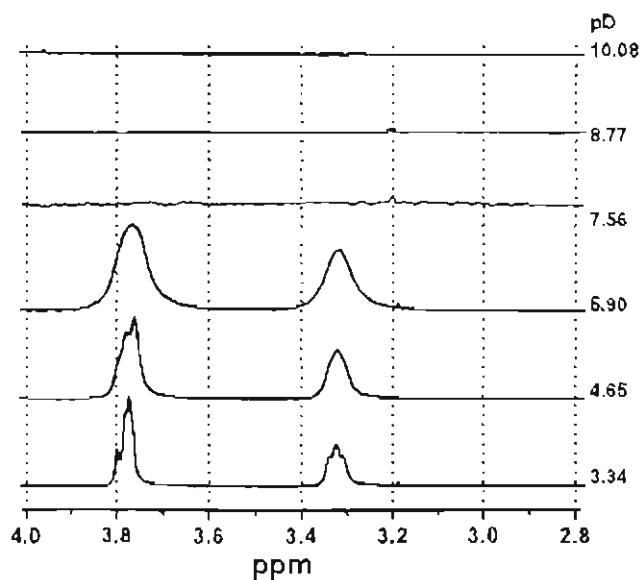


Fig. 86. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de bicina 5 mM y neodimio 5 mM.

Podemos ver que en pD 3.34 las señales son esencialmente las de la bicina protonada, sin embargo éstas se encuentran considerablemente ensanchadas. Al aumentar pD el ensanchamiento aumenta y en pD 5.90 ya no se observa ninguna estructura y las señales de  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$  y  $\text{N-CH}_2\text{-COO}^-$  ya se mezclaron por completo. El valor de la integración por regiones nos indica que las tres señales están presentes en la misma proporción. (ver tabla 26)

Tabla 26. Integración por regiones de las señales observadas en los espectros de Nd 5mM y bic 5 mM.

pD	región1	región2
3.34	6.00	4.00
4.65	6.04	3.96
5.90	5.95	4.05

En pD 7.56, y valores superiores, ya no se observa señal alguna en el intervalo acostumbrado para bicina y los sistemas lantano-bicina, por lo que se exploran otras regiones. Es sabido que la proximidad de un ión paramagnético provoca en las señales de RMN de  $^1\text{H}$  dos efectos<sup>143</sup>: ensanchamiento y desplazamiento de las señales hacia campos bajo o alto, dependiendo de la orientación con respecto al eje molecular. Si se abre la ventana espectral se observa la aparición de nuevas señales. En la figura 87 se muestran las regiones de los espectros donde estas están presentes.

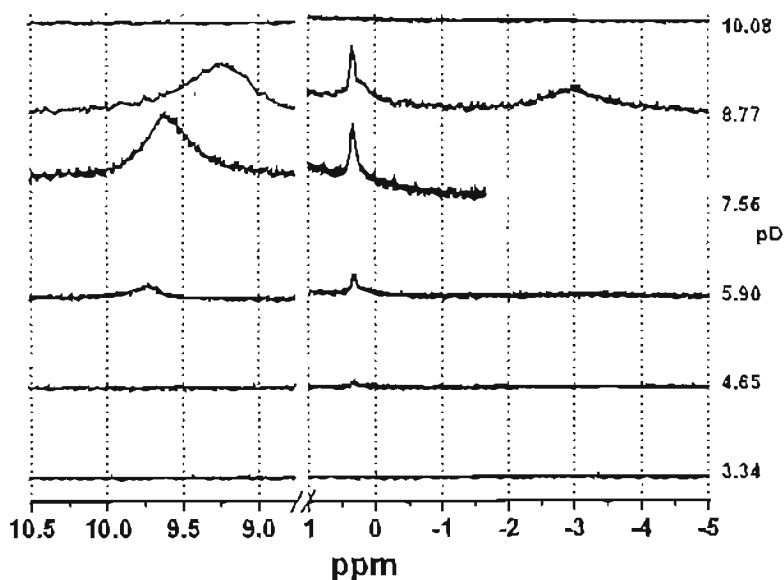


Fig. 87. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN con la ventana espectral abierta para observar las señales de bicina 5 mM en presencia de Nd 5 mM.

Las señales en estos valores de desplazamiento químico se deben a los complejos neodimio-bicina. Estas señales son anchas y no aparecen de forma simultánea. La señal ca. 0.3 ppm se alcanza a observar ya en pD 4.65, aunque muy débilmente. En pD 5.90 se observa una señal ca. 9.75 ppm, la cual al aumentar pD se recorre a valores de menor desplazamiento químico. La tercera señal aparece en pD 8.77 (en el experimento de pD 7.56 la ventana espectral no se abrió lo suficiente como para abarcar esa región). Finalmente en pD 10.08 ya no hay señales. Esto último se interpreta como que al formarse completamente los complejos dinucleares, la influencia de dos centros paramagnéticos ensancha las señales en tal magnitud que ya no son observables.

El ensanchamiento de las señales de bicina protonada a valores pequeños de desplazamiento químico se debe a que hay intercambio con la bicina coordinada. En un principio las señales de bicina coordinada no son apreciables debido a que son muy anchas. En pD 8.77 se observan las tres señales de la bicina coordinada en valores de 9.24, 0.30 y -3.00 ppm. Para asignar estas señales se podría recurrir a los valores de integración, sin embargo, por lo ancho de las señales éstos no son confiables.

Los valores del desplazamiento químico tampoco nos dicen mucho. El desplazamiento químico observado tiene dos contribuciones: la de contacto y la pseudocontacto.<sup>143</sup>

$$\delta_{obs} = \delta_c + \delta_{pc} \quad \text{Ecuación 6}$$

El desplazamiento químico de contacto ( $\delta_c$ ) es el que se transmite por el enlace, y puede ser tomado como el de lantano. El desplazamiento químico de pseudocontacto ( $\delta_{pc}$ ) es el que se transmite por el espacio, y depende de posición del protón con respecto al núcleo paramagnético.

$$\delta_{pc} = \frac{\Delta\chi_{ax}(3\cos^2\theta-1) + \left(\frac{3}{2}\right)\Delta\chi_{rh}\sin^2\theta\cos 2\Omega}{12\pi r^3} \quad \text{Ecuación 7}$$

$\Delta\chi_{ax}$  y  $\Delta\chi_{rh}$  son funciones espaciales de la susceptibilidad magnética y  $r$ ,  $\theta$  y  $\Omega$  son los parámetros espaciales en coordenadas polares.

No contamos con esos datos y además, otro inconveniente es que las señales observadas son el promedio de las especies presentes y el desplazamiento químico es muy



sensible a los factores espaciales, por lo que un pequeño cambio en la distancia puede producir un valor de  $\delta_{pc}$  muy diferente.

Resumiendo, no es posible hacer un análisis cuantitativo y obtener datos de la estructura de los complejos debido al gran número de variables en el sistema.

Con fines de comparación, se realizaron experimentos con exceso de neodimio con respecto a bicina (5:2.5 mM) a varios valores de pD, los cuales se presentan a continuación. (Figura 88)

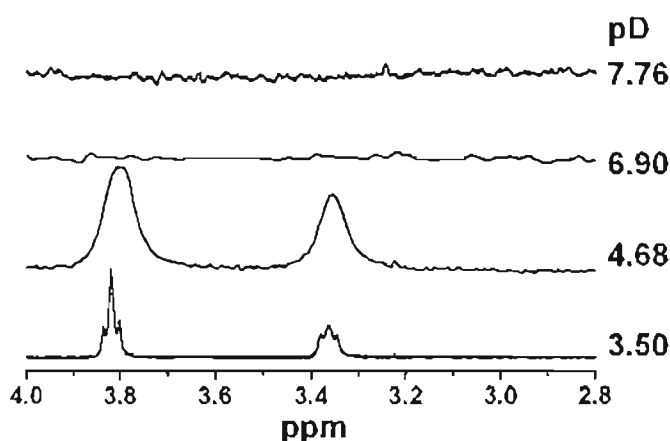


Fig. 88. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de bicina 2.5 mM y lantano 5 mM.

El comportamiento es similar al de 5:5, pero se observa que los cambios suceden a valores más pequeños de pD. En el espectro de pD 4.68 ya no se pueden distinguir las dos señales que lo componen, mientras que en las condiciones equimolares en pD 4.65 éstas aún eran distinguibles. Nuevamente, analizando las integraciones por regiones se tiene que las tres señales están presentes en la misma proporción.

Tabla 27. Integración por regiones para el sistema Nd 5 mM y bicina 2.5 mM.

pD	región1	región2
3.50	6.09	3.91
4.68	5.92	4.08

En pD 6.90 las señales ya no se observan, por lo que se abre la ventana espectral. (Figura 89)

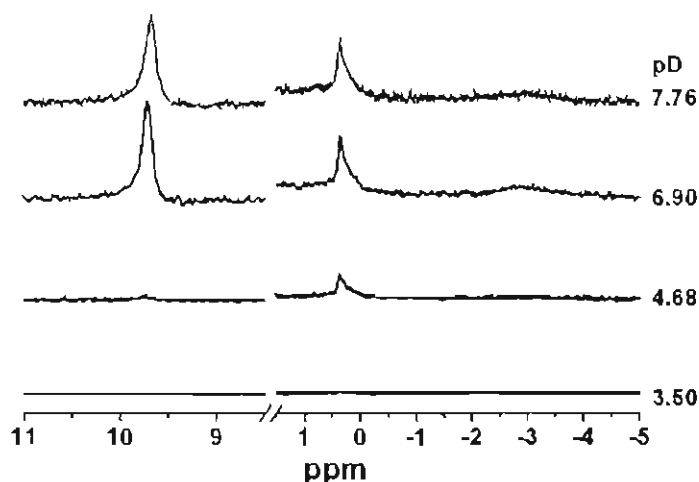


Fig. 89. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN con la ventana espectral abierta para observar las señales de bicina 2.5 mM en presencia de Nd 5 mM.

Vemos que en pD 4.68 ya se tienen dos señales, cuando para 5:5 en pD 4.65 sólo se distinguía una. En pD 6.90 las tres señales ya están presentes y prácticamente no hay cambio al ir a pD 7.76. Los desplazamientos químicos de estas señales no dependen de pD y son: 9.24, 0.31 y  $-3.03$ . En el diagrama de distribución de especies observamos que en esa región ( $6 < \text{pD} < 8$ ) prácticamente toda la bicina está en  $\text{Nd}(\text{bic})_2^{2+}$ .

El hecho de que la señal corresponda a prácticamente un sólo complejo explica el porqué esta señal es menos ancha que en las condiciones equimolares.

En la figura 90 se presentan los diagramas de distribución de especies para los sistemas neodimio-bicina en las dos proporciones metal-ligante estudiadas.

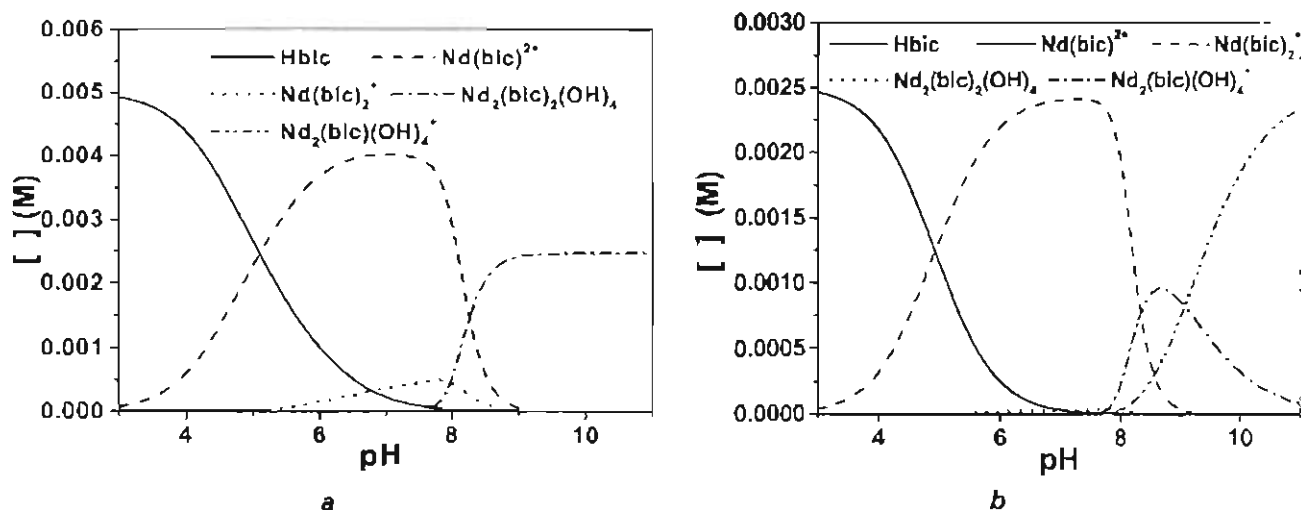


Fig. 90. Diagramas de distribución de especies para los sistemas  $\text{Nd}^{3+}$  5 mM con bicina 5 mM (a) y 2.5 mM (b).

Con este análisis se comprueba la formación de complejos neodimio-bicina y que la proporción de los complejos formados varía con pD y con la proporción de metal y ligante que se utilice. También vemos que a valores de pD elevados ya no es posible apreciar señales, probablemente debido a la formación de complejos dinucleares.

#### 7.4. Estudios de Espectrofotometría

El espectro de absorción de los lantánidos se debe a transiciones  $4f-4f'$ . Estas transiciones son prohibidas por la regla de selección de Laporte, por lo que las bandas son finas y de poca intensidad. Las transiciones  $d-d'$  en los metales de transición también son prohibidas, pero debido a los efectos del campo del ligante, éstas ganan intensidad y se ensanchan. En los lantánidos, los orbitales  $5s^2$  y  $5p^6$  protegen a los orbitales  $4f$  de dichos efectos, por lo que las bandas permanecen de baja intensidad y prácticamente insensibles al medio que las rodea. Lo anterior se ve reflejado en que los espectros de fase gas, cristales y disoluciones son casi iguales.

De todos los lantánidos, el neodimio ha sido el más utilizado para evaluar las interacciones con diferentes ligantes por medio de espectroscopia electrónica. Lo anterior se debe a que la banda asociada a las transiciones casi degeneradas  $^4I_{9/2} \rightarrow ^4G_{5/2}$  y  $^2G_{7/2}$  muestra una "hipersensibilidad" al ambiente que rodea al ion Nd(III).<sup>144</sup>

Se ha propuesto que esta "hipersensibilidad" se debe a que las componentes eléctricas dipolares del campo de radiación inducen dipolos eléctricos transitorios en el ambiente del ligante, los cuales se acoplan a las distribuciones  $4f$  vía interacciones cuadrupolo electrostático (lantánido)-dipolo (ligante).<sup>145</sup>

Para ejemplificar lo anterior, en la figura 91 se presentan los espectros de perclorato de neodimio 5 mM y una mezcla equimolar de neodimio y bicina 5 mM a pH 9.5 con un paso óptico de 1 cm.

En efecto, se observa que la banda más afectada es la que aparece ca. 575 nm. Aunque la banda ca. 740 nm también se modifica, lo hace en menor grado.

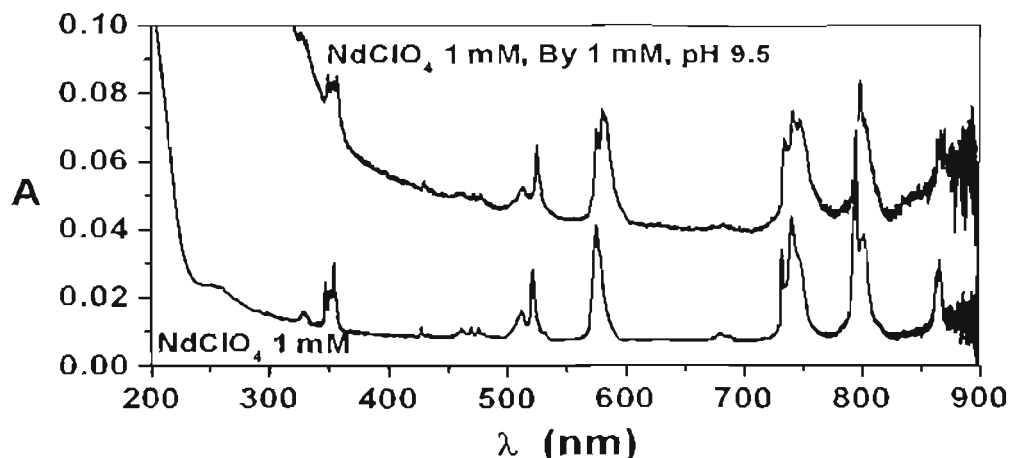


Fig. 91. Espectros de UV-visible de neodimio y neodimio-bicina.

Por lo anterior, se realizan titulaciones espectrofotométricas de mezclas neodimio-bicina esperando que al analizar la región *hipersensible* (570-595 nm) de las transiciones  $4f-4f$  sea posible obtener evidencia adicional para la formación de un nuevo complejo en medios básicos y con exceso de metal.

A continuación (Fig. 92) se muestran los espectros, en la región *hipersensible*, de mezclas de neodimio 5 mM con bicina 5 y 2.5 mM a varios valores de pH. En estos casos la longitud del paso óptico fue de 4 cm para tener señales más intensas y reducir el ruido.

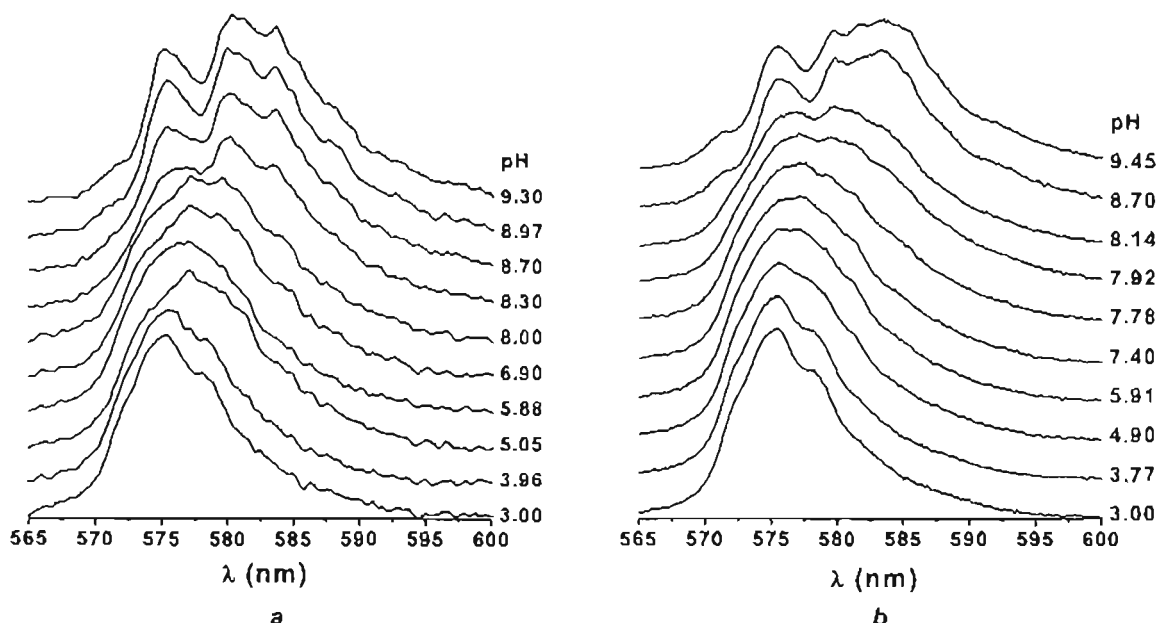


Fig. 92. Espectros de neodimio:bicina a diferentes valores de pH. a) 5:5 mM y b) 5:2.5 mM.

En ambos casos se observa que a pH 3 el espectro es fundamentalmente el de neodimio en ausencia de ligante, esto se debe a que el ligante está protonado y la fracción de neodimio que ha formado complejo es despreciable. Al aumentar el pH el espectro se

modifica gradualmente: la banda parece ensancharse y disminuye su intensidad, probablemente debido a la formación de los complejos  $\text{Nd}(\text{bic})^{2+}$  y  $\text{Nd}(\text{bic})_2^+$ . A partir de  $\text{pH} \sim 8$  se observa la aparición de bandas en  $577 \text{ nm} < \lambda < 587 \text{ nm}$ , estas bandas corresponden a los complejos desprotonados y aunque los espectros finales son similares para las dos condiciones, no son iguales. Lo anterior sugiere que las especies predominantes son distintas en ambos casos.

Una manera de evaluar los cambios en los espectros es restar al espectro de la mezcla metal-ligante el espectro del metal solo, como se hace a continuación (figura 93) para algunos valores selectos de pH.

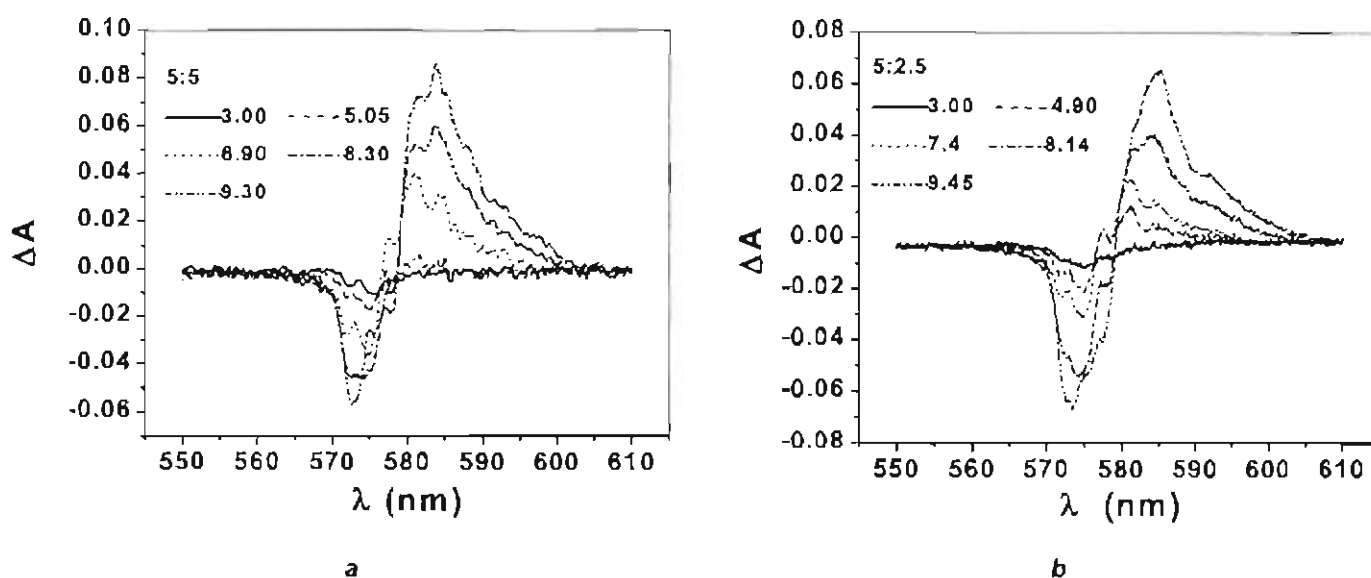


Fig. 93. Espectros de diferencia ( $\text{Nd}^{3+}$  - mezcla). a) 5:5 mM y b) 5:2.5 mM.

Se observa que lo primero en suceder es que la banda de neodimio libre desaparece y aparecen bandas en valores más grandes de longitud de onda. Este desplazamiento y desdoblamiento es característico del campo inducido por ligantes básicos.<sup>144</sup>

En la mezcla equimolar a  $\text{pH} 9.3$ , 98.2% del neodimio está formando parte del complejo  $\text{Nd}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$ , por lo que se observa un multiplete con al menos dos picos bien definidos. En la mezcla 5:2.5 a  $\text{pH} 9.45$ , 52.5% del neodimio está formando parte de  $\text{Nd}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ , 24% está en  $\text{Nd}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  y 24% en  $\text{NdOH}^{2+}$ . Como resultado de lo anterior no hay bandas claramente definidas, sino que éstas se encuentran traslapadas formando un multiplete.

En pH 3 el espectro del sistema con exceso de metal está menos perturbado que el de la mezcla equimolar, ya que en este caso la coordinación es menor. Lo mismo se observa cerca de la neutralidad, el espectro de 5:5 a pH 6.9 se ve más perturbado que el de 5:2.5 a pH 7.4. En todos estos casos lo que pasa es que para la mezcla 5:2.5 siempre hay una mayor fracción de neodimio libre que para la mezcla 5:5.

Si seguimos alguna longitud de onda en particular podemos observar el diferente comportamiento de ambos sistemas. Por ejemplo el hombro (577 nm) de la banda de neodimio libre (575.5 nm) muestra un comportamiento diferente en ambos casos. (Figura 94)

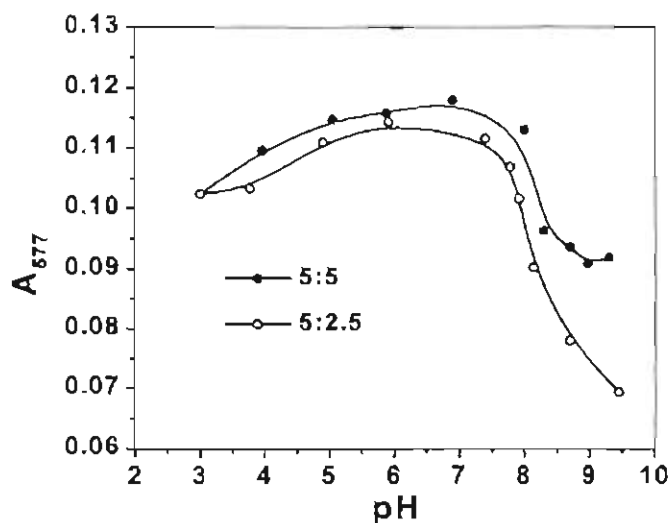


Fig. 94. Absorbancia a 577 nm de las mezclas Nd-bic 5:5 mM (círculos cerrados) y 5:2.5 mM (círculos abiertos).

Al parecer esta banda aumenta ligeramente al formarse los complejos  $\text{Nd}(\text{bic})^{2+}$  y  $\text{Nd}(\text{bic})_2^+$ , al formarse los complejos hidroxilo dinucleares, la banda disminuye, pero lo hace de manera mucho más marcada para la mezcla de complejos  $\text{Nd}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ ,  $\text{Nd}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  y  $\text{NdOH}^{2+}$  que para el complejo  $\text{Nd}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$ .

Otra manera de analizar las diferencias entre los espectros es la relación de intensidades entre dos bandas. En la figura 95 se analiza la relación entre la banda del neodimio (575.5 nm) y la absorbancia en 582.3 nm.

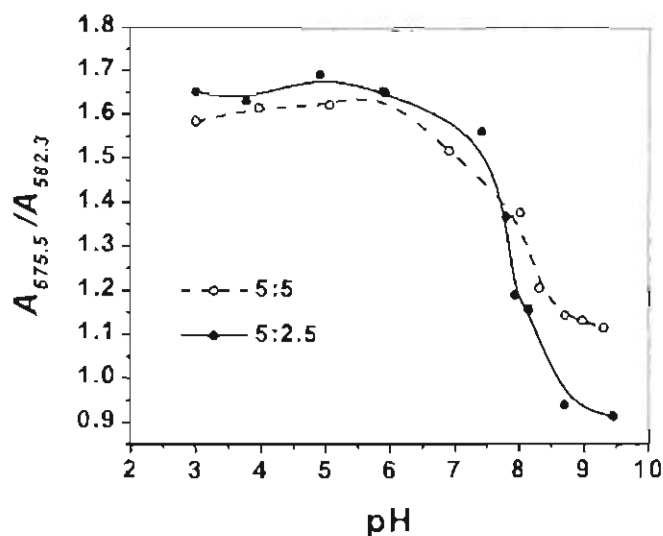


Fig. 95. Relación entre la banda del neodimio (575.5 nm) y la absorbancia en 582.3 nm.

Nuevamente observamos un comportamiento similar hasta pH 8. Por encima de ese valor, el cambio en la relación de intensidades es mayor para la mezcla con exceso de metal, indicando que en condiciones básicas los complejos predominantes son distintos según la relación estequiométrica.

Finalmente, para analizar las diferencias espectrales de los dos sistemas al valor de pH más alto estudiado, recurrimos a la primera derivada. (Fig 96)

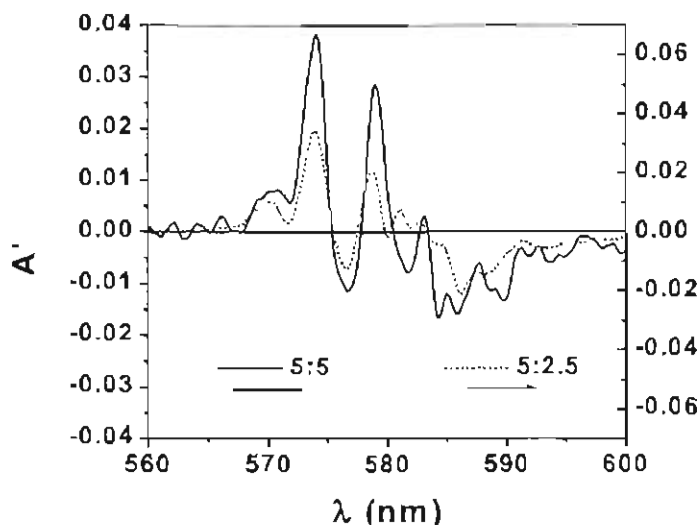


Fig. 96. Primera derivada de los espectros de Nd-bic 5:5 mM (línea continua) y 5:2.5 (línea punteada).

Al igual que en los espectros de diferencia, encontramos mucha similitud hasta 580 nm. Después, los espectros son muy distintos, teniendo el sistema equimolar más puntos de inflexión, es decir más definición de los picos. Nuevamente el sistema con exceso de metal muestra bandas menos definidas debido a que hay varios complejos presentes.

## 8. CONCLUSIONES

➤ Al introducir un grupo carboxilo en los ligantes, la estabilidad de los complejos de éstos con los lantánidos estudiados (lantano(III), praseodimio(III), neodimio(III) y europio(III)) es considerablemente mayor que la de sus análogos.

➤ Por medio de estudios potenciométricos se caracterizó el comportamiento en disolución acuosa del sistema Ln(III)-bicina. La bicina estabiliza las disoluciones de los lantánidos estudiados en medios alcalinos, lo que permite el estudio de la actividad fosfodiesterolítica de estos sistemas.

➤ Además de los complejos anteriormente informados ( $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$  y  $\text{Ln}(\text{bic})_2^+$ ), en medios básicos se forman los complejos hidroxilo binucleares  $\text{Ln}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  y  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ . El complejo  $\text{Ln}(\text{OH})^{2+}$  no se forma de manera apreciable en estos sistemas. Es posible modular la relación de los complejos dinucleares por medio de variaciones en las concentraciones iniciales de lantánido(III) y bicina, así como con variaciones en el pH del sistema. En general la estabilidad de los complejos lantánido(III)-bicina aumenta en el siguiente orden:  $\text{La} < \text{Pr} \approx \text{Nd} < \text{Eu}$ .

➤ El complejo  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$  cataliza la hidrólisis del BNPP. En estos casos el nucleófilo es un ion  $\text{OH}^-$  libre. La constante de velocidad de tercer orden es menor que la del acuacación  $\text{La}(\text{H}_2\text{O})_n^{3+}$ , debido a la reducción en la carga de +3 a +2.

➤ Los complejos  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  muestran una alta actividad catalítica con cinéticas tipo Michaelis-Menten ante el BNPP. Las constantes catalíticas alcanzan el valor de  $4.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a 25 °C, lo que representa un efecto de aceleración  $4.0 \times 10^8$  veces, uno de los más altos informados hasta la fecha.

➤ Aunque la constante catalítica no depende mucho del lantánido utilizado, ésta varía en el siguiente orden:  $\text{La} < \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu}$ . La baja sensibilidad de la constante catalítica con respecto a la acidez del catión indica un mecanismo de reacción "bifuncional". Por un lado el catión metálico realiza la activación electrofílica del sustrato, y por el otro coordina al nucleófilo, disminuyendo su basicidad y por lo tanto su reactividad.



- La estabilidad de los complejos  $[\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4]^+$ -BNPP aumenta en el siguiente orden:  $\text{La} < \text{Pr} < \text{Nd} > \text{Eu}$ . Esta estabilidad es más alta que la de los complejos  $\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_n^{3+}$ -BNPP, ya que con los complejos binucleares se da una coordinación tipo puente.
- Con RMN de  $^1\text{H}$  se determina que los complejos binucleares son hidroxó y no alcoxo. Por la diferencia entre los desplazamientos químicos de la bicina libre y los complejos con lantano se determina que en estos sistemas la bicina funciona como ligante tetradentado, siendo la unión Ln-N la más débil de éstas.
- La formación de estos complejos es lenta en la escala de tiempo de RMN. Los protones de la bicina en los complejos  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$  y  $\text{La}(\text{bic})^{2+}$  muestran una sola señal, lo que indica que la señal se promedia por el intercambio o que los desplazamientos químicos de estas especies son muy cercanos.
- Por medio de estudios de espectrofotometría de Nd-bicina en la región *hipersensible* a varios valores de pH, se confirma la predominancia de distintos complejos en medio básico para las relaciones 1:1 y 2:1 (Nd(III):bic).
- Se caracterizó potenciométricamente al sistema lantánido(III)-tricina en disolución acuosa. Las especies presentes son:  $\text{Ln}(\text{tric})^{2+}$ ,  $\text{Ln}(\text{tric})\text{H}_{-1}^+$ ,  $\text{Ln}(\text{tric})_2^+$ ,  $\text{Ln}_2(\text{tric})_2\text{H}_{-4}$  y  $\text{Ln}_2(\text{tric})\text{H}_{-4}^+$ .
- Con tricina se identificaron tres especies reactivas ( $\text{Ln}(\text{tric})\text{H}_{-1}^+$ ,  $\text{Ln}_2(\text{tric})_2\text{H}_{-4}$  y  $\text{Ln}_2(\text{tric})\text{H}_{-4}^+$ ). El valor de la constante de segundo orden es muy cercano para los tres complejos. Las velocidades obtenidas con este sistema son menores que las de bicina. Al pasar de lantano a los otros lantánidos, las velocidades son ca. 10 veces menores.
- Puede considerarse que el diseño de los sistemas con bicina y con tricina fue exitoso, ya que se obtuvieron sistemas que en medio alcalino producen especies catalíticas con un nucleófilo intamolecular.
- El ligante TES no produce complejos estables con los lantánidos empleados, debido a la poca capacidad coordinante del grupo sulfonato. Los sistemas lantánido(III)-TES no muestran actividad fosfodiesterolítica apreciable ante el BNPP.

## 9. REFERENCIAS

- <sup>1</sup> A. Radzicka, R. Wolfenden, *Science*, **1995**, 267, 90.
- <sup>2</sup> N. H. Williams, B. Takasaki, M. Wall, J. Chin, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32 485.
- <sup>3</sup> Albert L. Lehninger, Bioquímica, Ediciones Omega, S. A., Barcelona **1982**.
- <sup>4</sup> P. C. Hanawalt, *Endeavour*, 31:83 (**1972**). *Repair of genetic material in living cells*.
- <sup>5</sup> a) F. M. Menger, L. H. Gan, E. Johnson, D.H. Durst, *J.Am.Chem.Soc.*, **1987**, 109, 2800 b) R. A. Moss, K. Y. Kim, S. Swarup, *J.Am.Chem.Soc.*, **1986**, 108, 788.
- <sup>6</sup> M. Balali-Mood, M. Shariat, *J Physiol Paris.*, **1998**, 92 (5-6), 375.
- <sup>7</sup> D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, 2295.
- <sup>8</sup> J. Chin, M. Banasczyk, B. Jubian, X. Zou, *J.Am.Chem.Soc.*, **1989**, 111, 186.
- <sup>9</sup> Metal ions in biological systems, **V. 40**, *The lanthanides and their interrelations with biosystems* Fontis Media, Lausanne, Switzerland 2003.
- <sup>10</sup> a) C. F. Baes, R. E. Mesmer, The Hydrolysis of Cations, Wiley, New York, **1976**. b) R. M. Smith, A. E. Martell, Critical Stability Constants Plenum Press, New York, Vol. 4, **1976**.
- <sup>11</sup> R. W. Hay, N. Govan, *J.Am.Chem.Soc.*, *Chem.Commun.* **1990**, 714.
- <sup>12</sup> H. J. Schneider, J. Rammo, R. Hettich, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1993**, 32, 1716.
- <sup>13</sup> a) N. Bjerrum, A., Unmack, *Kgl. Danske vid. Selskab. Mat.-fys. Medd.*, **1929**, No. 1,9. b) W. D. Kumler, J. J. Eiler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1943**, 65, 2355. c) *Tables of rate and equilibrium constants of heterolytic organic reactions*, Ed. V. A. Palmn, Moscow, **1975**. d) J. D. Chanley, E. J. Feageson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 7, 4002.
- <sup>14</sup> Workshop, G. Thomas, E. J., Protein Phosphorilation and Bio-regulation, FMI-EMBO, Podesta and Gordon, Bassel, Editors. Switzerland, **1980**.
- <sup>15</sup> B. J. Walker, Organophosphorus Chemistry, Penguin Books, Great Britain, **1972**.
- <sup>16</sup> J. R. Cox,Jr., O. B.Ramsay, *Chem. Rev.*, **1964**, 64, 317.

- <sup>17</sup> a) T. C. Bruice, S. J. Benkovic, *Bioorganic Mechanisms*, **1966**, V.2, Benjamin, New York. b) G. R. J. Thatcher, R. Kluger, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1989**, 25, 99. c) F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.*, **1968**, 1, 70. e) A. J. Kirby, A. G. Varvoglis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 415.
- <sup>18</sup> a) D. Herschlag, W. P. Jenks, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7938. b) W. P. Jenks, *Acc. Chem. Res.*, **1980**, 13, 161.
- <sup>19</sup> J. P. Knowles, *Ann. Rev. Biochem.*, **1980**, 49, 877.
- <sup>20</sup> J. M. Friedman, J. P. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 6126.
- <sup>21</sup> Metal Ions in biological systems. V. 40 *The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems*, Astid Sigel y Helmuth Sigel, editores. Marcel Dekker y Fontis Media, Suiza, **2003**.
- <sup>22</sup> a) C. A. Bunton, D. R. Llewellyn, K. G. Oldham, C. A. Vernon, *J. Chem. Soc.*, **1958**, 3574. b) P. W. Barnard, C. A. Bunton, D. R. Llewellyn, C. A. Vernon and V. A. Welch, *J. Chem. Soc.*, 1961, 2670.
- <sup>23</sup> S. J. Admiraal and D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 2145.
- <sup>24</sup> A. Kirby and M. Younas, *J. Chem. Soc. (B)*, **1970**, 510.
- <sup>25</sup> N. H. Williams and P. Wyman, *Chem. Commun.*, **2001**, 1268.
- <sup>26</sup> D. E. Wilcox, *Chem. Rev.*, 1996, 96, 2435.
- <sup>27</sup> T. Knofel, N. Strater, *J. Mol. Biol.*, **2001**, 309, 239.
- <sup>28</sup> B. Barbier, A. Brack, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6880
- <sup>29</sup> a) R. Breslow, M. LaBelle, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2655 b) R. Breslow, D-L Huang, Anslyn *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 4473 c) Breslow, R.; Huang, D.-L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9621
- <sup>30</sup> K. Yoshihari, K. Yamazaki, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 5899
- <sup>31</sup> N. H. Williams, B. Takasaki, M. Wall y J. Chin, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 485.
- <sup>32</sup> J. J. Butzow, G. L. Eichhorn, *Biochemistry*, **1971**, 10, 2019 y referencias ahí citadas.

- <sup>33</sup> a) D.R. Jones, L.F. Lindoy, A.M. Sagerson; *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 7819 b) D.H. Vance, A.E. Czarnik; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12165 c) J.S. Seo, N.D. Sung, R.C. Ines, J. Chin; *Inorg. Chem.*, **1996**, *33*, 7472 d) N.H. Williams, A.M. Lebuis, J. Chin; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 3341 e) G.H. Raji, M. Yamada, N.P. Sadler, R.M. Milburn; *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, *303*, 168.
- <sup>34</sup> a) C. Bazicallupi, A. Bencini, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtacoli, D. Zanchi; *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 2784 b) A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, V. Fedi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtacoli; *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 6323 c) C. Bazicallupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, V. Fedi, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtacoli; *Inorg. Chem.*, **1998**, *38*, 4115 d) P. Jurek, A.E. Martell; *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, *287*, 47.
- <sup>35</sup> a) M.J. Young, J. Chin; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 10577 b) S. Liu, A.D. Hamilton; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1997**, *7*, 1779.
- <sup>36</sup> J. Yun, T. Tanase, S.J. Lippard; *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 7590.
- <sup>37</sup> R. Kramer, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *182*, 243
- <sup>38</sup> Y. Matsumoto, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1050.
- <sup>39</sup> M. K. Stern, J. K. Bashkin, E. D. Sall, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5357.
- <sup>40</sup> K. A. Deal, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 2792.
- <sup>41</sup> E. L. Hegg, K. A. Deal, L. L. Kiessling, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 1715.
- <sup>42</sup> P. B. Dervan, *Science*, **1986**, *232*, 464.
- <sup>43</sup> A. Kizuya, R. Mizoguchi, F. Morisawa, K. Machida, M. Komiyama, *J. Am. chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6887.
- <sup>44</sup> J. R. Morrow, W. C. Trogler, *Inorg. Chem.*, **1988**, *27*, 3387.
- <sup>45</sup> J. Chin, M. Banaszczyk, V. Jubian, X. Zou, *J. Am. chem. Soc.*, **1989**, *111*, 186.
- <sup>46</sup> M. A. De Rosch., W. C. Trogler, *Inorg. Chem.*, **1990**, *29*, 2409.
- <sup>47</sup> T. Koike, E. Kimura, *J. Am. chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8935.
- <sup>48</sup> E. Kimura, Y. Kodama, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. chem. Soc.*, **1995**, *117*, 8304.

- <sup>49</sup> E. Kimura, I. Nakamura, Y. Kodama, Y. Ikeda, M. Shionaya, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4764.
- <sup>50</sup> M. J. Young, D. Wahnon, R. C. Inés, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 9441.
- <sup>51</sup> a) K. A. Deal, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1993**, *32*, 3585 b) K. A. Deal, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 2792 c) E. I. Hegg, S. H. Mortimore, C. L. Cheung, J. E. Huyett, D. R. Powell, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 2961.
- <sup>52</sup> K. M. Deck, T. A. Tseng, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 669.
- <sup>53</sup> P. Jurek, A. E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, *287*, 47.
- <sup>54</sup> T. Gajda, Y. Düpre, I. Torok, J. Harmer, A. Schweiger, J. Sander, D. Kuppert, K. Hegetschweiler, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 4918.
- <sup>55</sup> O. Iranzo, A. Y. Kovalevsky, J. R. Morrow, J. P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1988.
- <sup>56</sup> W. W. Butcher, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 2420.
- <sup>57</sup> E. Bamann, M. Meisenheimer, *Chem. Ver.*, **1938**, *71*, 1711.
- <sup>58</sup> F. McC. Blewett, P. Watts, *J. Chem. Soc. (B)*, **1971**, 881.
- <sup>59</sup> D. E. Fenton, P. A. Vigato, *Chem. Soc. Rev.*, **1988**, *17*, 69 y referencias ahí citadas.
- <sup>60</sup> R. W. Hay, N. Govan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 714.
- <sup>61</sup> R. Breslow, D.-L. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 4080.
- <sup>62</sup> Y. Matsumoto, M. Komiyama, *J. Mol. Catal.*, **1990**, *61*, 129.
- <sup>63</sup> J. R. Morrow, L. A. Buttrey, V. M. Shelton, K. A. Berback, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 1903.
- <sup>64</sup> J. R. Morrow, L. A. Buttrey, K. A. Berback, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 16.
- <sup>65</sup> B. K. Takasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9337.
- <sup>66</sup> B. K. Takasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 8582.
- <sup>67</sup> R. Breslow, B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7893.

- <sup>68</sup> a) Y. Mejía-Radillo, A. K. Yatsimirsky, H. J. Foroudian, N. D. Gillit, C. A. Bunton, *J. Phys. Org. Chem.*, **2000**, *13*, 505 b) Y. Mejía-Radillo, A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, *328*, 241 c) Y. Mejía-Radillo, A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, *351*, 97.
- <sup>69</sup> J. Kamitani, J. Sumaoka, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 523.
- <sup>70</sup> H. J. Schneider, J. Rammo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, **1993**, *16*, 3217.
- <sup>71</sup> N. Takeda, M. Irisawa, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 2773.
- <sup>72</sup> J. R. Morrow, K. Aures, D. Eppstein, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2431.
- <sup>73</sup> M. Kalesse, A. Loos, *Bioinorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **1996**, *6*, 2063.
- <sup>74</sup> K. G. Ragunathan, H. J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, **1996**, *35*, 1219.
- <sup>75</sup> A. Roigk, O. V. Yescheulova, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, S. Gromov, H. S. Schneider, *Org. Lett.*, **1999**, *1*, 833.
- <sup>76</sup> S. J. Oh, K. H. Song, D. Whang, K. Kim, t. H. Yoon, H. Moon, J. W. Park, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 3785.
- <sup>77</sup> A. Roigk, R. Hettich, H. J. Schneider, *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*, 751.
- <sup>78</sup> A. A. Neverov, R. S. Brown, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 1039.
- <sup>79</sup> A. Neverov, T. McDonald, G. Gibson, R. S. Brown, *Can. J. Chem.*, **2001**, *79*, 1704.
- <sup>80</sup> a) A. A. Neverov, R. S. Brown, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 3588 b) J. S. W. Tsang, A. Neverov, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1559.
- <sup>81</sup> P. Hurst, B. K. Takasaki, J. Chin., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.*, **1996**, *118*, 9982.
- <sup>82</sup> N. E. Good, G. D. Wingle, . Winter, , T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Sing, *Biochem.*, **1966**, *5*, 467.
- <sup>83</sup> S. J. Oh, Y. s. Choi, S. Hwangbo, S. C. Bae, J. K. Ku, J. W. Park, *Chem. Commun.*, **1998**, 2189.
- <sup>84</sup> P. Gómez-Tagle, A. K. Yatsimirsky, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2001**, 2663.
- <sup>85</sup> P. Gómez-Tagle, A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 3786.

- <sup>86</sup> a) M. Komiyama, N. Takeda, J. Sumaoka, H. Uchida, T. Shiiba, T. Kodama, M. Yashiro, *Chem. Lett.*, **1994**, 1025 b) B. K. Tgasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 1121 c) N. Takeda, T. Imai, M. Irisawa, J. Sumaoka, M. Yashiro, H. Shigekawa, M. Komiyama, *Chem. Lett.*, **1996**, 599 d) M. Komiyama, N. Takeda, Y. Takahashi, H. Uchida, T. Shiiba, T. Kodama, M. Yashiro, *Chem. Lett.*, **1995**, 269.
- <sup>87</sup> J. Sumaoka, S Miyama, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1755.
- <sup>88</sup> K. Bracken, R. A. Moss, K. G. Ragunathan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9323.
- <sup>89</sup> U. Baykal, M. S. Akkaya, E. U. Akkaya, *J. Mol. Cat. A Chem.*, **1999**, 309.
- <sup>90</sup> M. Komiyama, N. Takeda, H. Shigekawa, *Chem. Commun.*, **1999**, 1443.
- <sup>91</sup> a) R. Ott, R. Kramer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, 37, 1957 b) R. A. Moss, K. G. Ragunathan, *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 2064.
- <sup>92</sup> R. A. Moss, J. Zhang, K. Bracken, *Chem. Commun.*, **1997**, 1639.
- <sup>93</sup> T. Ihara, H. Shimura, K. Ohmori, H. Tsuji, J. Takeuchi, M. Takagi, *Chem. Lett.*, **1996**, 687.
- <sup>94</sup> a) J. C. G. Bunzli, G. R. Choppin, Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences., Ed. Elsevier, **1989**, 1 b) J. C. G. Bunzli, Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. Ed. K. A. Gschneider Jr., L. Eyring; Elsevier Science Publishers B. V. ; **1987**, 60, 321 c) F. Arnaud-Neu, *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 235 d) G. Y. Adachi, Y. Hirashima, Cation Binding by Macrocycles, Ed. Y. Inoue, G. W. Gokel, *Marcel Dekker Inc.*, New York, **1990**, 18, 701 e) C. Piguet, J. C. Bunzli, *Chem. Soc. Rev.*, **1999**, 28, 347.
- <sup>95</sup> D. R. Lloyd, *J. Chem. Ed.*, **1986**, 63, 502.
- <sup>96</sup> E. A. Quadrelli, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 167.
- <sup>97</sup> C. F. Baes Jr., B. K. Takasaki, J. Chin, The hydrolysis of Cations, *Wiley*, New York, **1996**.
- <sup>98</sup> P. Hurst, B. K. Takasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9982.
- <sup>99</sup> A. K. Shestakova, V. A. Chertkov, H. J. Schneider, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 6753 .

- <sup>100</sup> S. J. Oh, K. H. Song, D. hang, K. Kim, T. H. Yoon, H. Moon, J. W. Park, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 3780.
- <sup>101</sup> M. Kodama, T. Koike, A. B. Mahatma, E. Kimura, *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 1270.
- <sup>102</sup> a) J. M. Pfefferlé, J. C. Bunzli, *Helv. Chim. Acta*, **1989**, 72, 1487 b) P. G. Tagle, A. K. Yatsimirsky, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2001**, 2663.
- <sup>103</sup> S. J. Oh, Y. S. Choi, S. Hwangbo, S. Bae, J. K. Ku, J. W. Park, *Chem. Commun.*, **1998**, 2189.
- <sup>104</sup> P. G. Tagle, A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 3786.
- <sup>105</sup> Z. M. Anwar, H. A. Azab, *J. Chem. Eng. Data*, **2001**, 46, 613.
- <sup>106</sup> G. Schwarzenbach, G. Anderegg, W. Schneider, H. Senn, *Helv. Chim. Acta*, **1955**, 38, 4147.
- <sup>107</sup> a) E. Lance, R. Nakon, *Inorg. Chim. Acta*, **1981**, 55, L1 b) J. Nepal, S. Dubey, *Ind. J. Chem.*, **1987**, A 26, 269 c) H. A. Azaab, A. Hassan, *Bull. Soc. Chim. Fr. I.* **1989**, 599 d) H. A. Azaab, *Monatsch*, **1992**, 123, 1107.
- <sup>108</sup> E. Bugella-Altamirano, J. M. González-Pérez, A. G. Sicilia Zafra, J. Niclós-Gutiérrez, A. Castiñeiras-Campos, *Polyhedron*, 2000, 2473.
- <sup>109</sup> a) E. Bugella-Altamirano, J. M. González-Pérez, A. G. Sicilia Zafra, J. Niclós-Gutiérrez, A. Castiñeiras-Campos, *Polyhedron*, **1999**, 3333 b) E. Bugella-Altamirano, J. M. González-Pérez, A. G. Sicilia Zafra, J. Niclós-Gutiérrez, A. Castiñeiras-Campos, *Polyhedron*, **2000**, 2463.
- <sup>110</sup> D. L. Rabenstein, S. Libich, *Inorg. Chem.*, **1972**, 11, 2960.
- <sup>111</sup> a) N. C. Li, M. C. M. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958** 80, 5678 b) D. J. Perkins, *Biochemistry*, **1954**, 57, 702 c) C. B. Monk, *Trans. Faraday Soc.*, **1951**, 47, 292 y 297.
- <sup>112</sup> B. Gómez-Reyes, A. K. Yatsimirsky, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 866.
- <sup>113</sup> C. R. Krishnamoorthy, R. Nakon, *Science*, **1983**, 221, 749.
- <sup>114</sup> S. Chaberek Jr., R. C. Courtney, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 2185.
- <sup>115</sup> R. C. Courtney, S. Chaberek Jr. , A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 2121.



- <sup>116</sup> R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 18.
- <sup>117</sup> N. A. Kostromina, E. D. Romanenko, *Zh. Neorg. Khim.*, **1970**, 15, 1782.
- <sup>118</sup> N. A. Kostromina, R. V. Thiova, *Zh. Neorg. Khim.*, **1974**, 19, 2000.
- <sup>119</sup> E. Riečanska, E. Fuleova, J. Majer, *Chem. Zvesti*, **1982**, 36, 501.
- <sup>120</sup> H. Sigel, *Coordination Chemistry Reviews*, **1993**, 122, 227.
- <sup>121</sup> L. Ji, N. A. Corfu, H. Sigel, *Inorganica Chimica Acta*, **1993**, 206, 215.
- <sup>122</sup> Y. Inomata, T. Takeuchi, T. Moriwaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1976**, 49, 1568.
- <sup>123</sup> H. Yamaguchi, M. Nagase, Y. Yukawa, Y. Inomata, T. Takeuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1988**, 61, 2763.
- <sup>124</sup> H. Yamaguchi, M. Nagase, Y. Yukawa, Y. Inomata, T. Takeuchi, *Inorg. Chim. Acta*, **1989**, 161, 217.
- <sup>125</sup> H. Yamaguchi, M. Nagase, Y. Yukawa, Y. Inomata, T. Takeuchi, *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, 172, 105.
- <sup>126</sup> H. Yamaguchi, M. Nagase, Y. Yukawa, Y. Inomata, T. Takeuchi, *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 181, 31.
- <sup>127</sup> Y. Inomata, T. Takei, F. S. Howell, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 318, 201.
- <sup>128</sup> A. Messimeri, C. P. Raptopoulou, V. Nastopoulos, A. Terzis, S. P. Perlepes, C. Papadimitrou, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 336, 8.
- <sup>129</sup> O. M. El-Roudi, E. M. Abd Alla, S. A. Ibrahim, *J. Chem. Eng. Data*, **1997**, 42, 609.
- <sup>130</sup> I. T. Ahmed, *J. Chem. Eng. Data*, **2003**, 48, 272.
- <sup>131</sup> Q. Yu, A. Kandedegara, Y. Xu, D. B. Rorabacher, *Anal. Biochem.*, **1997**, 253, 50.
- <sup>132</sup> a) J. Korbl, R. Pribil, *Chemist-Analyst*, **1956**, 45, 102 b) S. J. Lyle and Md. M. Arman, *Talanta*, **1963**, 10, 1177.
- <sup>133</sup> a) H. Sigel, A. D. Zuberbuller, O. Yamaguchi, *Anal. Chimica Acta*, **1991**, 38, 63. b) A. E. Martell, R.J. Motekaitis, Determination and Use of Stability Constants, 2<sup>a</sup> Ed., *John Wiley and Sons*, New York, **1992**. c) P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, **1996**, 43, 1739.

- d) L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *184*, 311.
- <sup>134</sup> A. Johanson, S. Johanson, *Analyst.*, **1978**, *103*, 305.
- <sup>135</sup> A.K. Covington, M. Paabo, R.A. Robinson, R.G. Bates, *Anal. Chem.* **40** (1968) 700.
- <sup>136</sup> a) Z. Zheng, *Chem. Commun.*, **2001**, 2521. b) R. wang, H. Liu, M. D. Carducci, T. Jin, C. Zheng, Z. Zheng, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 2473.
- <sup>137</sup> J.-M. Pfefferié, J. -C. G. Bunzli, *Helv. Chim. Acta.*, **1989**, *72*, 1487.
- <sup>138</sup> R. G. Bates, H. B. Hetzer, *J. Phys. Chem.*, **1961**, *65*, 677.
- <sup>139</sup> N. H. Williams, B. Takasaki, B. M. Wall, J. Chin, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 485
- <sup>140</sup> F. Medrano, A. Calderón, A. K. Yatsimirsky, *Chem. Commun.*, **2003**, *15*, 1968.
- <sup>141</sup> R. Delgado, J. J. R. Frausto da Silva, M. T. S. Amorim, M. F. Cabral, S. Chaves, J. Costa, *Analyt. Chim. Acta*, **1991**, *245*, 271.
- <sup>142</sup> C. Bazzicalupi, A. Benchini, E. Berni, A. Bianchi, V. Fedi, V. Fusi, C. Giorgi, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 4115.
- <sup>143</sup> Ivano Bertini, Claudio Luchinat, Giacomo Parigi, Solution NMR of Paramagnetic Molecules. Applications to Metallobiomolecules and Models. Current Methods in Inorganic Chemistry. Vol. 2. Elsevier **2001**.
- <sup>144</sup> E. M. Stephens, K. Schoene, F. S. Richardson, *Inorg. Chem.*, **1984**, *23*, 1641.
- <sup>145</sup> a) R. D. Peacock., *Struct. Bonding (Berlin)*, **1975**, *22*,83. b) S. F. Mason, R. D. Peacock, B. Stewart, *Mol. Phys.*, **1975**, *30*,1829.

## 10. APÉNDICES

### 10.1 Modelos cinéticos

#### 10.1.1 Modelo de velocidades iniciales

Para las reacciones lentas, la constante de velocidad de primer orden se calculó por el método de velocidades iniciales. Aquí se considera que la reacción está en una etapa tan temprana que la concentración del sustrato es constante, teniendo la siguiente expresión:

$$\frac{d[NP]}{dt} = k[\text{complejo}][BNPP] = k' \quad \text{A1}$$

Esta expresión se reorganiza y se integra:

$$\int [NP] dt = \int k' dt$$

$$[NP] - [NP]_0 = k'(t - t_0) \quad \text{A2}$$

Si al tiempo cero la concentración de NP es cero:

$$[NP] = k't \quad \text{A3}$$

Y poniendo A3 en función de la absorbancia:

$$\frac{A}{\epsilon l} = k't$$

$$A = \epsilon l k't \quad \text{A4}$$

Al graficar absorbancia contra tiempo, la pendiente tiene el valor  $\epsilon l k'$ . Esta aproximación es válida mientras la función sea lineal, lo que ocurre siempre y cuando la reacción tenga un grado de avance del 10% o menor.

A partir de la pendiente el valor de  $k_{obs}$  se obtiene como sigue:

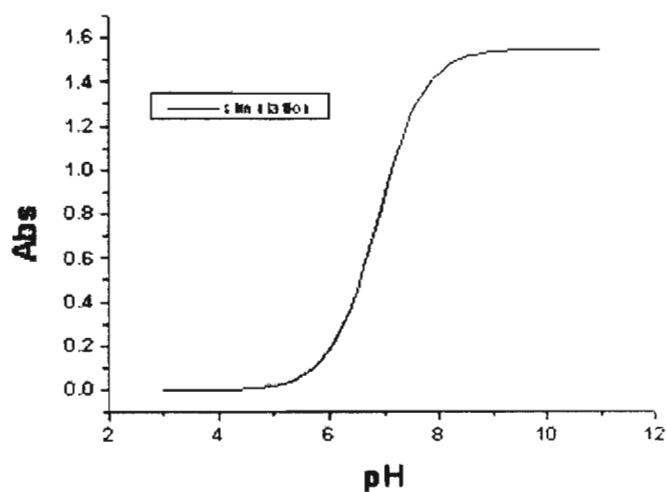
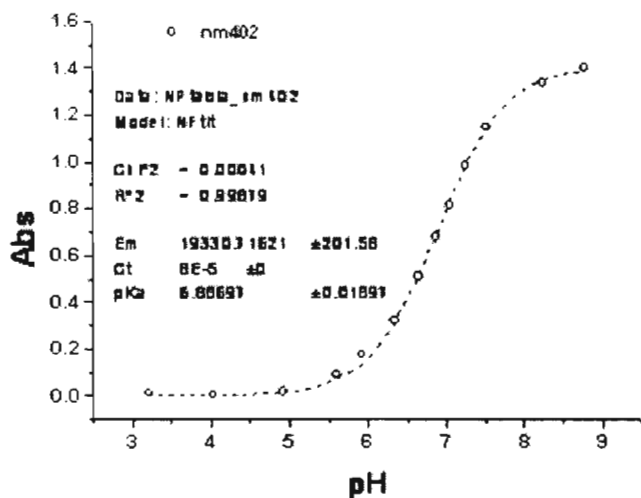
$$m = \epsilon l k' \quad \text{A5}$$

$$k' = k_{obs}[BNPP]_0 \quad \text{A6}$$

$$k_{obs} = m / \varepsilon \ell [BNPP]_0 = m / A_{inf}$$

A7

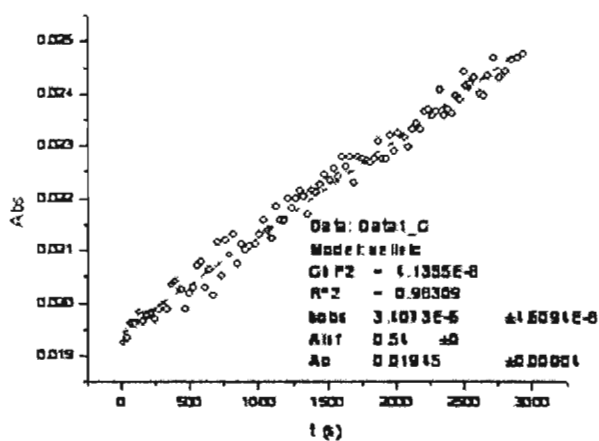
El valor de  $A_{inf}$  se obtiene de una disolución estándar de NP. Ajustando con el modelo de la sección 9.2, obtenemos  $\varepsilon$  y el valor de  $pK_a$ . Con esos valores generamos una curva teórica para cualquier valor de pH.



A continuación se presentan ejemplos de cinéticas con este tipo de ajuste.

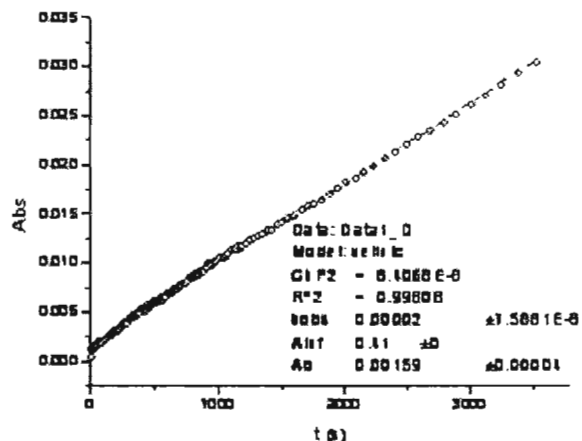
Nd 5 mM, Bic 5 mM, BNPP 0.04 mM

pH = 7.23



Eu 5 mM, Bic 5 mM, BNPP 0.04 mM

pH = 6.90



## 10.1.2 Constantes de primer orden

En reacciones que alcanzan un mayor grado de avance y sólo se observa la producción de un equivalente de NP ( $k_1 \gg k_2$ ), la expresión diferencial es la siguiente:

$$\frac{d[NP]}{dt} = k [\text{complejo}] [BNPP] \quad A8$$

A diferencia del caso anterior, la concentración de BNPP no se puede considerar constante, por lo que se utiliza la siguiente expresión:

$$[BNPP] = [BNPP]_0 - [NP] \quad A9$$

Se sustituye en A8.

$$\frac{d[NP]}{dt} = k' ([BNPP]_0 - [NP]) \quad A10$$

Se integra tomando los límites de integración

$$\int \frac{d[NP]}{([BNPP]_0 - [NP])} = \int k' dt =$$

$$\ln ([BNPP]_0 - [NP]) - \ln ([BNPP]_0 - [NP]_0) = k' (t - t_0) \quad A11$$

Como  $[NP]_0$  y  $t_0$  son cero y reorganizando:

$$\ln \left( \frac{[BNPP]_0 - [NP]}{[BNPP]_0} \right) = \ln \left( 1 - \frac{[NP]}{[BNPP]_0} \right) = k' t \quad A12$$

Ó

$$1 - \frac{[NP]}{[BNPP]_0} = e^{-k' t} \quad A13$$

Se despeja  $[NP]$  de A13:

$$[NP] = [BNPP]_0 \left( 1 - e^{-k' t} \right) \quad A14$$

Y se pone  $[NP]$  en función de la absorbancia.

$$\frac{A}{\varepsilon \ell} = [BNPP]_0 \left(1 - e^{-k't}\right) \quad \text{A15}$$

Rearreglando A15:

$$A = \varepsilon \ell [BNPP]_0 \left(1 - e^{-k't}\right) \quad \text{A16}$$

El producto  $\varepsilon \ell [BNPP]_0$  se sustituye por la absorbancia al infinito.

$$A = A_{inf} \left(1 - e^{-k't}\right) \quad \text{A17}$$

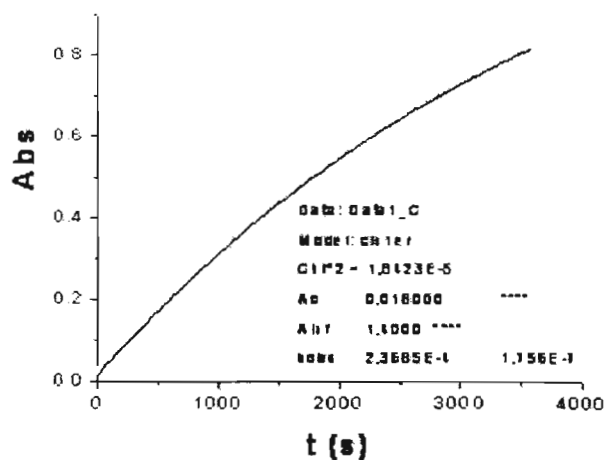
Cuando  $k_2 \gg k_1$ , la expresión A17 también es válida si  $A_{inf}$  se establece como la absorbancia producto de la liberación de dos nitrofenolatos ( $A_{inf} = 2 \varepsilon \ell [BNPP]_0$ ).

El valor de  $A_{inf}$  se obtiene de la misma manera que en la sección anterior.

A continuación se presentan ejemplos de este tipo de ajustes.

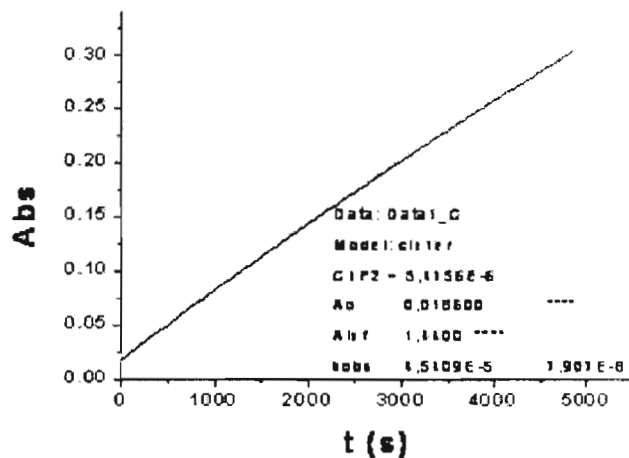
lantano 5 mM, bicina 5 mM

T = 37 °C, pH = 8.3



europio 5 mM, bicina 5 mM

T = 25 °C, pH = 9.9



### 10.1.3 Constantes de hidrólisis consecutiva de BNPP

Cuando  $k_1 \sim k_2$  y se observa la liberación de dos equivalentes de nitrofenolato, la ecuación diferencial es como sigue:

$$\frac{d[NP]}{dt} = k_1[BNPP] + k_2[NPP] \quad A18$$

Por lo que para encontrar la solución deben resolverse las ecuaciones diferenciales para BNPP y para NPP.

$$\frac{d[BNPP]}{dt} = -k_1[BNPP] \quad A19$$

Y

$$\frac{d[NPP]}{dt} = k_1[BNPP] - k_2[NPP] \quad A20$$

La solución de A19 es directa.

$$[BNPP] = [BNPP]_0 e^{-k_1 t} \quad A21$$

Sustituyendo este valor en A20 queda:

$$\frac{d[NPP]}{dt} = k_1[BNPP]_0 e^{-k_1 t} - k_2[NPP] \quad A22$$

Ó

$$\frac{d[NPP]}{dt} + k_2[NPP] = k_1[BNPP]_0 e^{-k_1 t} \quad A23$$

A23 es una ecuación diferencial no homogénea y se resuelve por el método del factor integrante. Ambos lados de A23 se multiplican por  $e^{k_2 t}$ .

$$e^{k_2 t} \frac{d[NPP]}{dt} + e^{k_2 t} k_2 [NPP] = k_1 [BNPP]_0 e^{-k_1 t} e^{k_2 t} \quad A24$$

Teniendo que

$$\frac{d}{dt} \left( e^{k_2 t} [NPP] \right) = e^{k_2 t} \frac{d[NPP]}{dt} + e^{k_2 t} k_2 [NPP] \quad A25$$

Se sustituye el primer término en A24

$$\frac{d}{dt} \left( e^{k_2 t} [NPP] \right) = k_1 [BNPP]_0 e^{t(k_2 - k_1)} \quad A26$$

Ahora las variables pueden separarse para integrar

$$d \left( e^{k_2 t} [NPP] \right) = k_1 [BNPP]_0 e^{t(k_2 - k_1)} dt \quad A27$$

Se integra tomando los valores iniciales como cero

$$e^{k_2 t} [NPP] = \frac{k_1}{(k_2 - k_1)} [BNPP]_0 e^{t(k_2 - k_1)} - \frac{k_1}{(k_2 - k_1)} [BNPP]_0 \quad A28$$

Despejando [NPP] de A28:

$$[NPP] = \frac{k_1 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} \left( e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) \quad A29$$

Ahora, los valores de [BNPP] y [NPP] se sustituyen en A18:

$$\frac{d[NP]}{dt} = k_1 [BNPP]_0 e^{-k_1 t} + \frac{k_2 k_1 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} \left( e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) \quad A30$$

Las variables pueden separarse para integrar, tomando [NP]=0 y  $t_0=0$

$$\int_0^t d[NP] = \int_0^t k_1 [BNPP]_0 e^{-k_1 t} dt + \int_0^t \frac{k_1 k_2 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} e^{-k_1 t} dt - \int_0^t \frac{k_1 k_2 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} e^{-k_2 t} dt \quad A31$$

El resultado de la integración es:

$$\begin{aligned} [NP] = & -[BNPP]_0 e^{-k_1 t} - \frac{k_2 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} e^{-k_1 t} + \frac{k_1 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} e^{-k_2 t} \\ & + [BNPP]_0 + \frac{k_2 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} - \frac{k_1 [BNPP]_0}{(k_2 - k_1)} \end{aligned} \quad A32$$

Y reorganizando:



$$[NP] = [BNPP]_0 \left\{ 2 + \frac{1}{(k_2 - k_1)} \left( k_1 e^{-k_2 t} - (2k_2 - k_1) e^{-k_1 t} \right) \right\} \quad A33$$

Sustituyendo  $[NP] = A / \epsilon l$

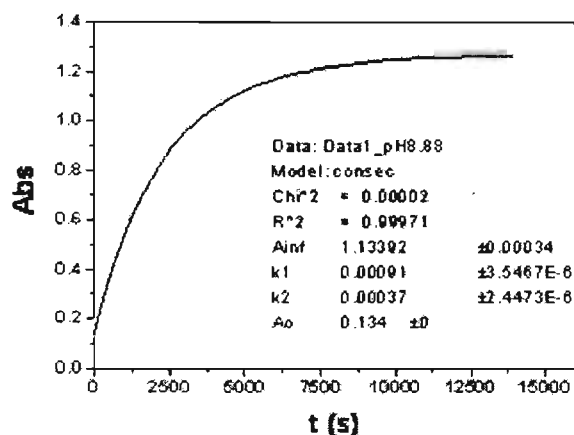
$$A = \epsilon l [BNPP]_0 \left\{ 2 + \frac{1}{(k_2 - k_1)} \left( k_1 e^{-k_2 t} - (2k_2 - k_1) e^{-k_1 t} \right) \right\} \quad A34$$

Ó

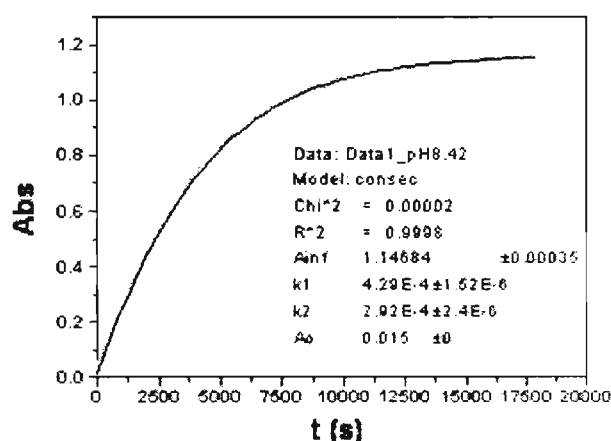
$$A = \frac{A_{inf}}{2} \left\{ 2 + \frac{1}{(k_2 - k_1)} \left( k_1 e^{-k_2 t} - (2k_2 - k_1) e^{-k_1 t} \right) \right\} \quad A35$$

A continuación se muestran ejemplos de ajustes con este modelo.

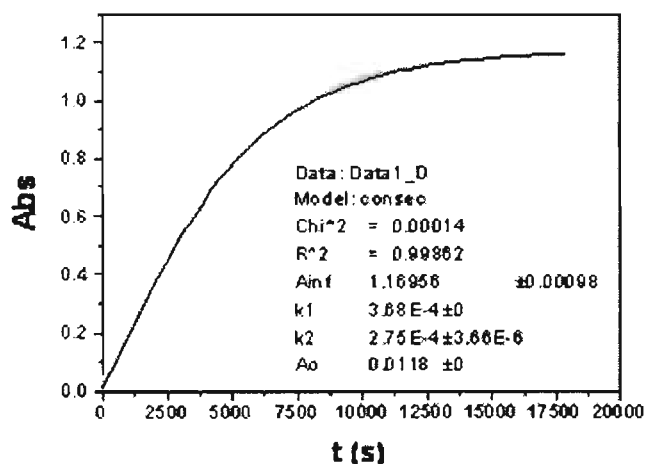
La 5 mM, Bic 2.5 mM, tris 10 mM  
pH = 8.9, T = 25°C



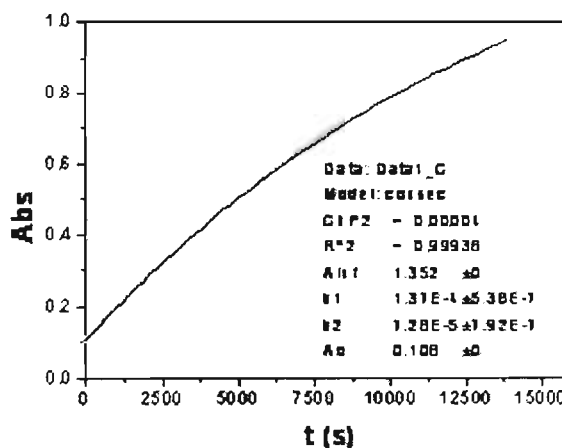
Pr 5 mM, Bic 2.5 mM, tris 10 mM  
pH = 8.4, T = 25°C



Nd 5 mM, Bic 2.5 mM, tris 10 mM  
pH = 8.4, T = 25°C



Eu 2 mM, Bic 1 mM, tris 10 mM  
pH = 9, T = 25°C



### 10.1.4 Modelo de Michaelis – Menten

En este modelo la transformación del sustrato ( $S$ ) en los productos ( $prod$ ) se lleva a cabo en dos etapas: la formación reversible de un complejo sustrato-catalizador ( $cat-S$ ) y la transformación irreversible del sustrato en los productos con la liberación del catalizador ( $cat$ ):



La velocidad para la formación de productos es

$$\frac{d[prod]}{dt} = k_2[cat-S] \quad A37$$

Y la del intermediario, con la aproximación del estado estacionario es

$$\frac{d[cat-S]}{dt} = k_1[cat][S] - (k_2 + k_{-1})[cat-S] = 0 \quad A38$$

El balance de masa para el sustrato es

$$[S]_0 = [S] + [cat-S] \quad A39$$

Se sustituye el valor de  $[cat-S]$  de A39 en A38:

$$k_1[cat][S] - (k_2 + k_{-1})([S]_0 - [S]) = 0 \quad A40$$

De donde se despeja  $[S]$

$$[S] = \frac{[S]_0}{1 + \frac{k_1}{(k_2 + k_{-1})}[cat]} \quad A41$$

Se define a la constante de Michaelis-Menten como

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad A42$$

Esta se introduce en la expresión para el sustrato

$$[S] = \frac{[S]_0 K_M}{K_M + [cat]} \quad A43$$

En la ecuación A38 se sustituye el valor de  $[cat-S]$  que resulta de la ecuación A39.

$$\frac{d[prod]}{dt} = k_2 ([S]_0 - [S]) \quad A44$$

Y se sustituye  $[S]$  de la ecuación A43

$$\frac{d[prod]}{dt} = k_2 \left( [S]_0 - \frac{[S]_0 K_M}{K_M + [cat]} \right) = \frac{k_2 [S]_0 [cat]}{K_M + [cat]} \quad A45$$

En condiciones de primer orden se puede expresar

$$\frac{d[prod]}{dt} = k_{obs} [S]_0 \quad A46$$

Por lo que

$$\frac{k_2 [S]_0 [cat]}{K_M + [cat]} = k_{obs} [S]_0 \quad A47$$

Y

$$k_{obs} = \frac{k_2 [cat]}{K_M + [cat]} \quad A48$$

Como el catalizador se mantuvo en exceso sobre la concentración del sustrato,  $[cat]$  se considera constante y  $k_2$  es la constante catalítica  $k_C$ .

## 10.2 Modelo para el desplazamiento químico de las señales de la bicina en función del pH.

Cuando se tiene un equilibrio dependiente del pH, tal como el que se muestra en A49, y una propiedad observable ( $P$ ) toma el valor promedio de las propiedades individuales de A y B,  $P$  puede expresarse en función de las propiedades de A y B ( $P_A$  y  $P_B$ ) y de sus fracciones mol ( $f_A$  y  $f_B$ ), como se muestra en A50.



$$P = P_A f_A + P_B f_B \quad \text{A50}$$

Tal es el caso del desplazamiento químico si la velocidad de interconversión entre A y B es rápida en la escala de tiempo de la resonancia magnética nuclear. Las fracciones mol se expresan como sigue:

$$f_A = \frac{[A]}{C_T} \quad \text{A51}$$

$$f_B = \frac{[B]}{C_T} \quad \text{A52}$$

Sustituyendo A51 y A52 en A50 queda.

$$P = P_A \frac{[A]}{C_T} + P_B \frac{[B]}{C_T} \quad \text{A53}$$

La constante para el equilibrio en A49 es:

$$K_a = \frac{[B][H^+]}{[A]} \quad \text{A54}$$

Y el balance de masa es

$$[A] + [B] = C_T \quad \text{A55}$$

Si despejamos  $[B]$  de A55 y lo sustituimos en A54

$$K_a = \frac{(C_T - [A])[H^+]}{[A]} \quad \text{A56}$$

De donde podemos despejar  $[A]$

$$[A] = \frac{C_T [H^+]}{(K_a + [H^+])} \quad \text{A57}$$

De manera análoga:

$$K_a = \frac{[B][H^+]}{(C_T - [B])} \quad \text{A58}$$

Y

$$[B] = \frac{K_a C_T}{(K_a + [H^+])} \quad \text{A59}$$

Si sustituimos A57 y A59 en A53:

$$P = P_A \frac{C_T [H^+]}{C_T (K_a + [H^+])} + P_B \frac{K_a C_T}{C_T (K_a + [H^+])} \quad \text{A60}$$

Se elimina  $C_T$  y reorganizando:

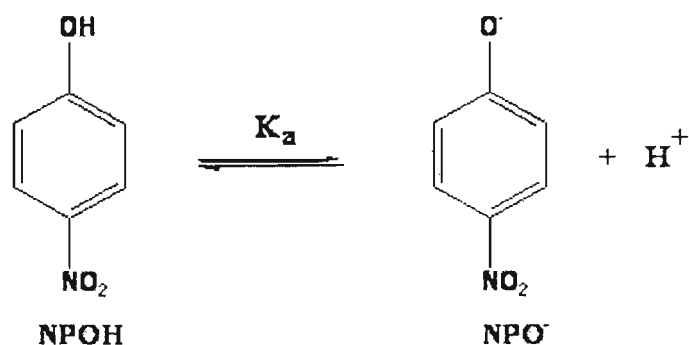
$$P = \frac{P_A}{\left(1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right)} + \frac{P_B}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)} \quad \text{A61}$$

Y finalmente se procede a sustituir  $[H^+]$  y  $K_a$  en función de pH y  $pK_a$

$$P = \frac{P_A}{(1 + 10^{(pH - pK_a)})} + \frac{P_B}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} \quad \text{A62}$$

### 10.3 Modelo para la absorbancia del nitrofenolato en función del pH.

El nitrofenol y el nitrofenolato presentan el siguiente equilibrio:



Este equilibrio está representado por la siguiente constante

$$K_a = \frac{[\text{NPO}^-][\text{H}^+]}{[\text{NPOH}]} \quad \text{A63}$$

El balance de masa es el siguiente

$$C_T = [\text{NPO}^-] + [\text{NPOH}] \quad \text{A64}$$

Por lo que la constante puede expresarse como

$$K_a = \frac{[\text{NPO}^-][\text{H}^+]}{(C_T - [\text{NPO}^-])} \quad \text{A65}$$

Se puede despejar  $[\text{NPO}^-]$

$$[\text{NPO}^-] = \frac{K_a C_T}{([\text{H}^+] + K_a)} \quad \text{A66}$$

En el caso de la absorbancia, el equipo es capaz de detectar la señal de ambas especies. A 400 nm, sin embargo, la absorbancia del nitrofenolato es cero, por lo que podemos plantear

$$A = \varepsilon \ell [\text{NPO}^-] \quad \text{A67}$$

Sustituimos el valor de  $[\text{NPO}^-]$  de A66 en A67

$$A = \varepsilon \ell \frac{K_a C_T}{([\text{H}^+] + K_a)} \quad \text{A68}$$

La cual también puede expresarse como

$$A = \frac{A_{inf}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)}$$

A69

ó

$$A = \frac{A_{inf}}{\left(1 + 10^{(pK_a - pH)}\right)}$$

A70

La expresión A70 es equivalente a A62, si hacemos  $P_A = 0$ . Por lo anterior el modelo utilizado para calcular los desplazamientos químicos de las especies con bicina también se utiliza para calcular el  $pK_a$  del nitrofenol y generar una curva teórica de la absorbancia del nitrofenol en función del pH.

### 10.4 Constantes de desprotonación de complejos en Hyperquad.

Las constantes calculadas con el programa *Hyperquad 2000* ( $\beta_{HQ}$ ) son constantes de formación global, es decir el producto se forma a partir de especies libres. Los complejos desprotonados podrían expresarse incluyendo a  $\text{OH}^-$  como una especie. Esto no sería correcto necesariamente, ya que los protones pueden provenir de la desprotonación de otros ligantes, además de agua. Además, la inclusión de otra especie llevaría a complejidades innecesarias. Por ello la desprotonación de complejos se expresa con un signo negativo en el coeficiente estequiométrico de la especie  $\text{H}^+$ . Por ejemplo, el complejo  $\text{M}_p\text{L}_q$  desprotonado  $n$  veces se expresa con los coeficientes  $p$  para M,  $q$  para L y  $-n$  para  $\text{H}^+$ . Estrictamente hablando esto se refiere al siguiente equilibrio:



Cuya constante de formación es:

$$\beta_{HQ} = \frac{[\text{M}_p\text{L}_q\text{H}_{-n}][\text{H}^+]^n}{[\text{M}]^p[\text{L}]^q} \quad \text{A71}$$

Si en efecto, los protones provienen de aguas coordinadas que se desprotonan para formar hidroxos, la constante de formación en función de la concentración de hidróxido ( $\beta$ ) se puede calcular a partir de la calculada por *Hyperquad 2000*, de la siguiente manera:

Se multiplica a  $\beta$  por  $K_w^n$ , expresado en función de las concentraciones de protón e hidróxido en el numerador y por su valor en el denominador.

$$\beta = \frac{[\text{M}_p\text{L}_q(\text{OH})_n][\text{H}^+]^n[\text{OH}^-]^n}{[\text{M}]^p[\text{L}]^q[\text{OH}^-]^n} \cdot \frac{1}{K_w^n} \quad \text{A72}$$

Eliminamos  $[\text{OH}]^n$

$$\beta = \frac{[\text{M}_p\text{L}_q(\text{OH})_n][\text{H}^+]^n}{[\text{M}]^p[\text{L}]^q} \cdot \frac{1}{K_w^n} \quad \text{A73}$$

Y sustituimos el valor de  $\beta_{HQ}$

$$\beta = \frac{\beta_{HQ}}{K_w^n} \quad \text{A74}$$



Y tomando el logaritmo

$$\log \beta = \log \beta_{\text{HQ}} + n \cdot \text{p}K_w$$

A75

A continuación se muestran las constantes de desprotonación de los complejos de los lantánidos con bicina en la forma  $\log \beta_{\text{HQ}}$  ( $\log \beta$ ).

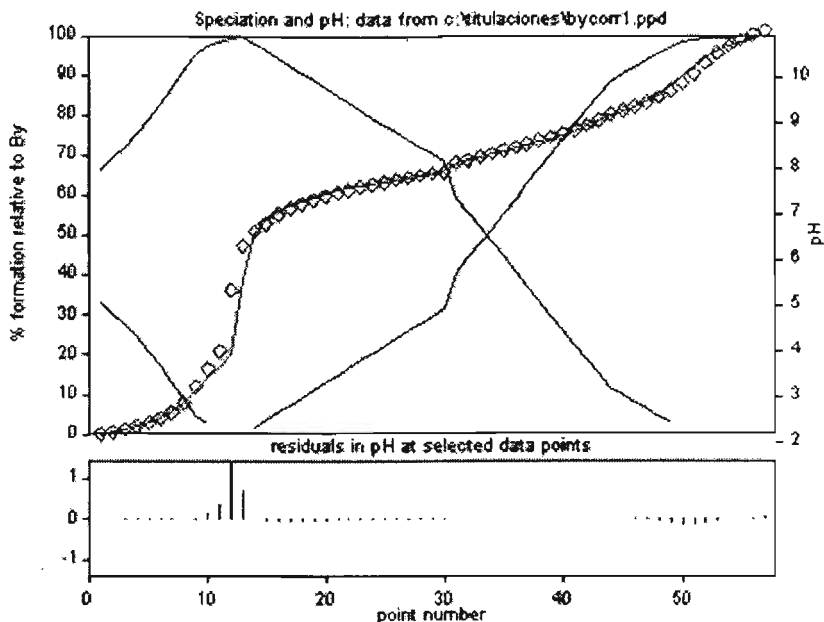
	<b>La(III)</b>	<b>Pr(III)</b>	<b>Nd(III)</b>	<b>Eu(III)</b>
$\text{Ln}_2(\text{bic})_2\text{H}_4$	-24.05 (31.95)	-18.75 (37.25)	-19.36 (36.64)	-19.14 (36.86)
$\text{Ln}_2(\text{bic})\text{H}_4^+$	-27.85 (28.15)	-24.23 (31.77)	-25.26 (30.74)	-22.87 (33.13)

## 10.5 Titulaciones Hyperquad

### 10.5.1 Bicina

A continuación se presentan los ajustes que se realizaron por medio de *Hyperquad 2000*.

Ajuste de la titulación de bicina 0.01 M.



Results page

Run timed at 04.25 on 14 Aug 2002

3 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 16.40

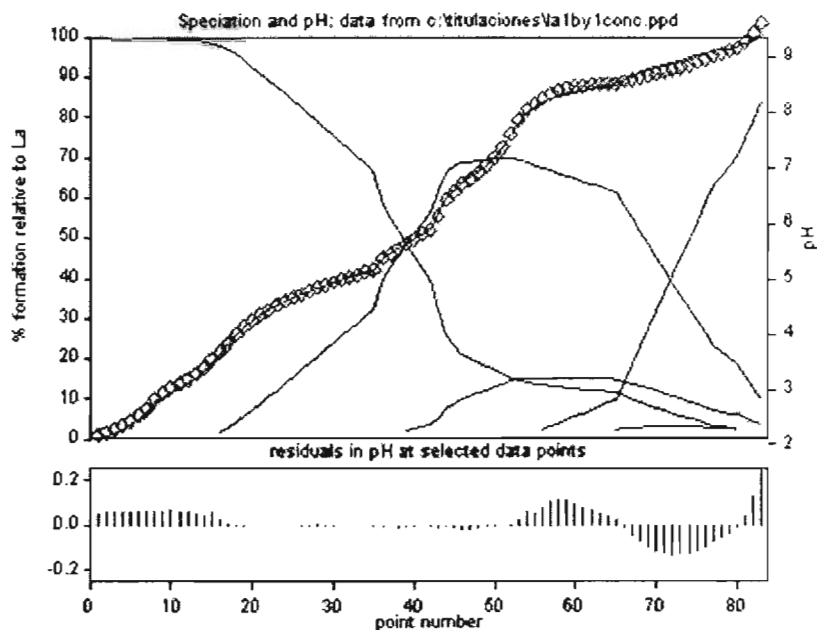
Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 0.4922

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation		
Beta A constant	0.1995E-13		-13.7000		-1	0
Beta B refined	1.7116E 8	0.0195	8.2334	0.0085	1	1
Beta C refined	5.0936E 9	0.0836	9.7070	0.0363	2	1

## 10.5.2 Lantano-bicina

Ajuste de la titulación de bicina 11.1 mM y lantano 10.8 mM según el esquema 2.



Results page

Run timed at 00.16 on 10 Sep 2004

new project

2 iterations

Refinement successful

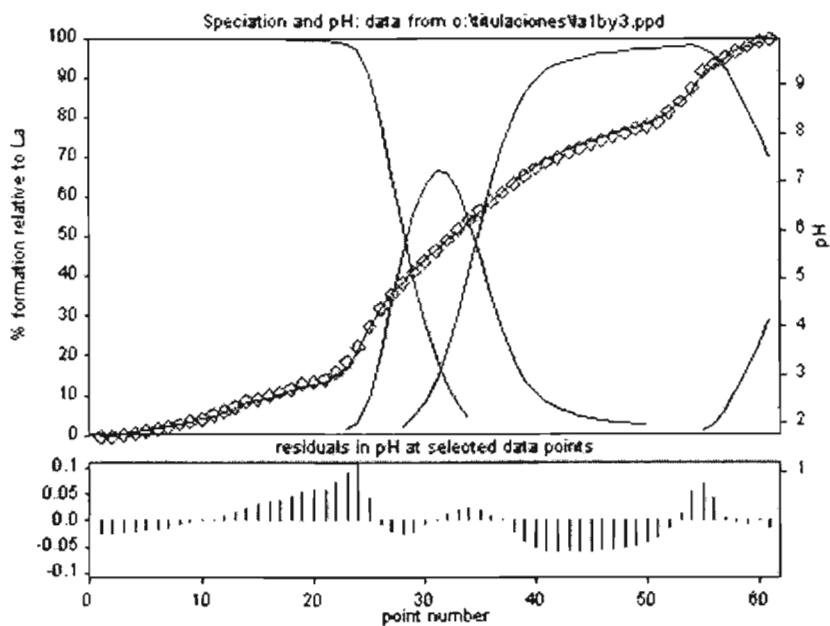
Chi-squared = 38.73

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 3.6002

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2399E-13		-13.6200		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	6.2564E 4	0.0380	4.7963	0.0165	0	1	1
Beta E refined	1.7839E 8	0.1382	8.2514	0.0600	0	2	1
Beta H constant	0.6310E -9		-9.2000		-1	0	1
Beta I refined	0.9937E-13	0.0687	-13.0027	0.0299	-2	1	1

Ajuste de la titulación de bicina 27.4 mM y lantano 5 mM según el esquema 2.



Results page

Run timed at 05.42 on 10 Sep 2004

new project

3 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 7.33

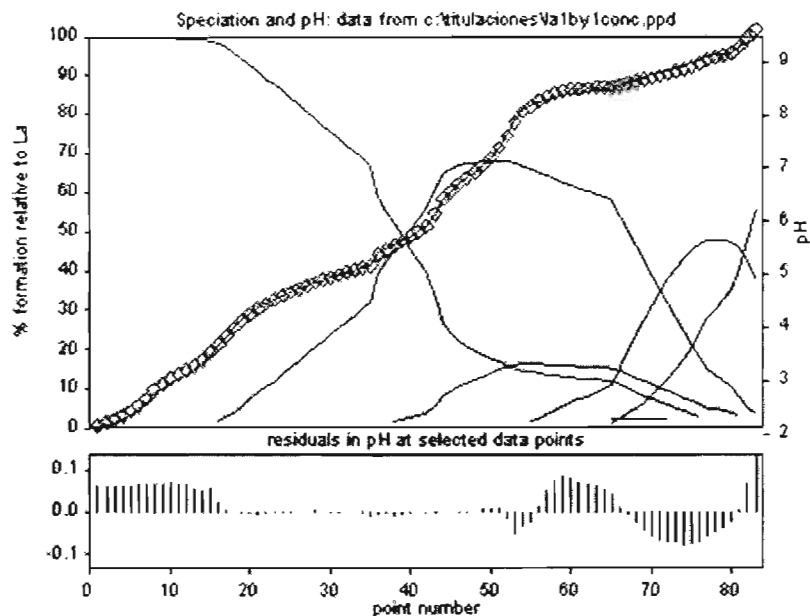
Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 2.2052

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2399E-13		-13.6200		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	7.2404E 4	0.0523	4.8598	0.0227	0	1	1
Beta E refined	3.2566E 8	0.0631	8.5128	0.0274	0	2	1
Beta H refined	0.2843E-13	0.1316	-13.5462	0.0572	-2	1	1
Beta I constant	0.6310E -9		-9.2000		-1	0	1

Para realizar un mejor ajuste se incluyeron complejos dinucleares:

Ajuste de la titulación de bicina 11.1 mM y lantano 10.8 mM según el esquema 3.



Results page

Run timed at 01.42 on 10 Sep 2004

new project

3 iterations

Refinement successful

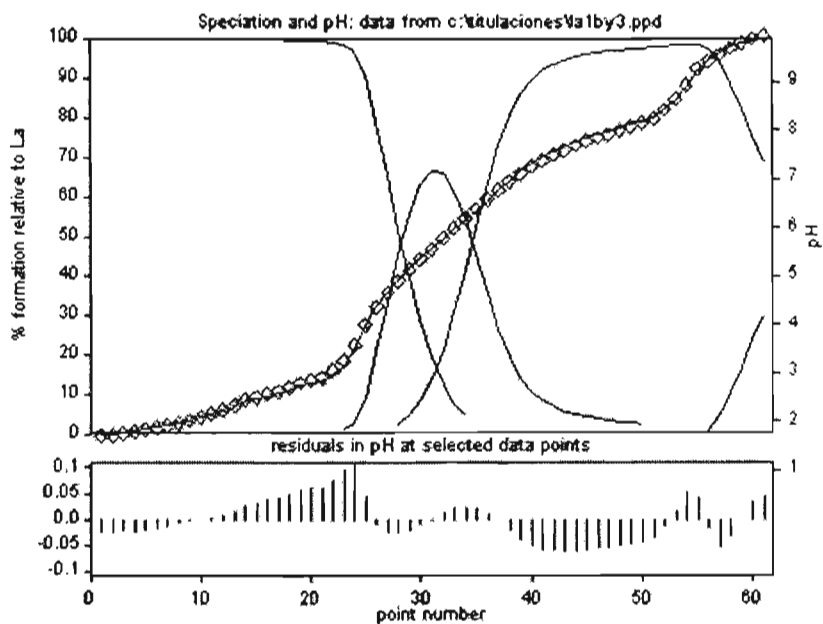
Chi-squared = 46.25

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 2.5078

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2399E-13		-13.6200		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	6.1516E 4	0.0269	4.7890	0.0117	0	1	1
Beta E refined	2.0535E 8	0.0914	8.3125	0.0397	0	2	1
Beta G refined	0.7852E-24	0.1210	-24.1050	0.0526	-4	2	2
Beta H constant	0.6310E -9		-9.2000		-1	0	1
Beta M refined	0.1669E-14	0.1081	-14.7775	0.0469	-3	2	2

Ajuste de la titulación de bicina 27.4 mM y lantano 5 mM según el esquema 3.



Results page

Run timed at 23.52 on 13 Sep 2004

new project

4 iterations

Refinement successful

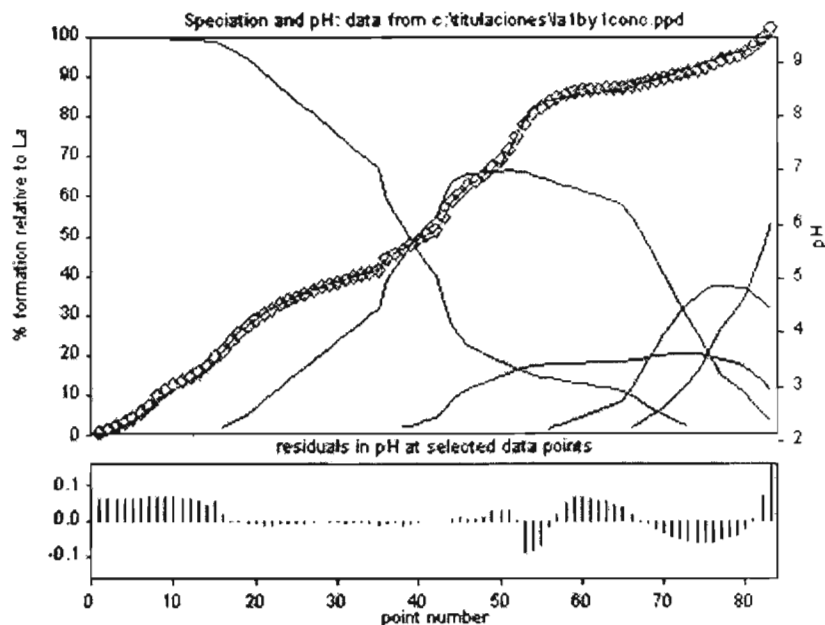
Chi-squared = 7.33

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 2.2217

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2399E-13		-13.6200		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	7.2394E 4	0.0527	4.8597	0.0229	0	1	1
Beta E refined	3.2574E 8	0.0636	8.5129	0.0276	0	2	1
Beta F refined	0.5801E-24	0.2489	-24.2365	0.1081	-4	2	2
Beta K constant	0.6310E -9		-9.2000		-1	0	1

Ajuste de la titulación de bicina 11.1 mM y lantano 10.8 mM según el esquema 5.



Results page

Run timed at 01.41 on 1 Sep 2004

new project

4 iterations

Refinement successful

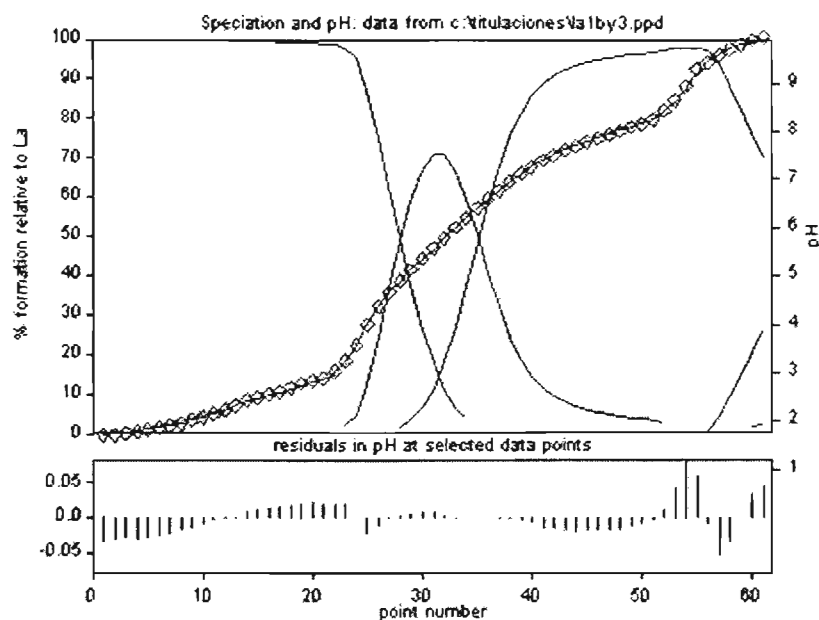
Chi-squared = 24.30

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 2.4924

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2399E-13		-13.6200		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	6.0347E 4	0.0271	4.7807	0.0117	0	1	1
Beta E refined	2.2831E 8	0.0878	8.3585	0.0381	0	2	1
Beta F refined	0.3348E-27	0.1489	-27.4752	0.0646	-4	1	2
Beta G refined	0.7306E-24	0.1297	-24.1363	0.0563	-4	2	2
Beta H constant	0.6310E -9		-9.2000		-1	0	1

Ajuste de la titulación de bicina 27.4 mM y lantano 5 mM según el esquema 5.



Results page

Run timed at 00.17 on 14 Sep 2004

new project

2 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 2.61

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 1.2994

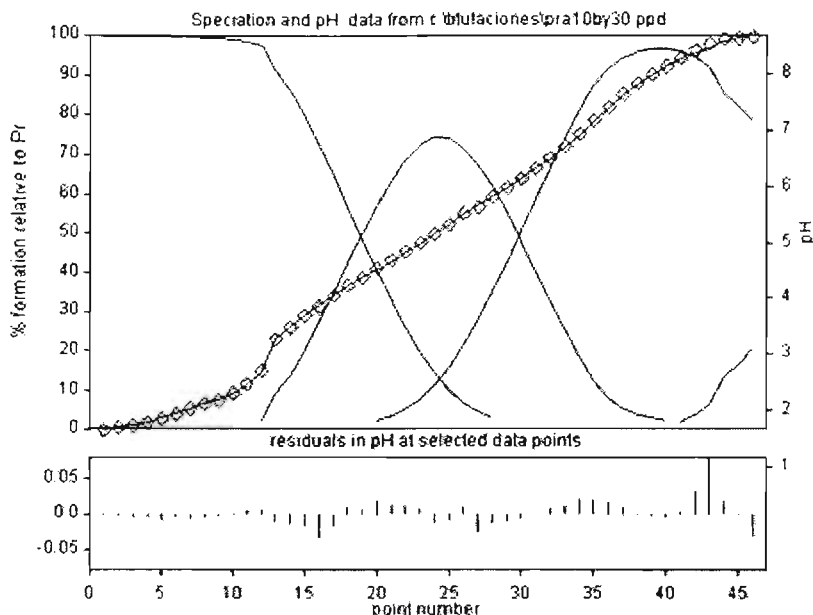
	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2399E-13		-13.6200		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	8.2416E 4	0.0321	4.9160	0.0139	0	1	1
Beta E refined	2.7315E 8	0.0542	8.4364	0.0235	0	2	1
Beta F refined	0.3264E-24	0.1787	-24.4863	0.0776	-4	2	2
Beta G refined	0.5658E-27	0.9700	-27.2474	0.4217	-4	1	2
Beta K constant	0.6310E -9		-9.2000		-1	0	1



### 10.5.3 Pr, Nd, y Eu - bicina

Se realizaron titulaciones de Pr, Nd y Eu con bicina en diversas proporciones, los resultados de las cuales se presentan en la parte de resultados y discusión. A continuación se presentan algunos ejemplos de los ajustes realizados por *Hyperquad 2000*.

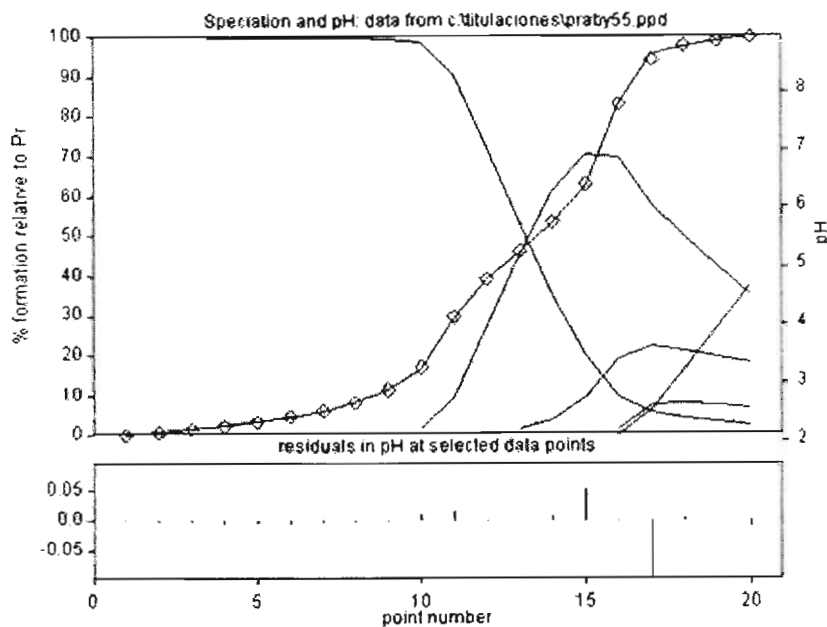
Ajuste de la titulación de bicina 27.24 mM y praseodimio 9 mM.



```
Results page           Run timed at 23.59 on 12 Jul 2005
new project
  3 iterations
Refinement successful
Not enough data for meaningful chi-squared
sigma =    0.5093
```

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.1995E-13		-13.7000		0	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	3.6278E 5	0.0315	5.5596	0.0137	0	1	1
Beta E refined	3.7887E 9	0.0384	9.5785	0.0167	0	2	1
Beta F refined	0.2806E-18	0.0994	-18.5518	0.0432	-4	2	2
Beta H constant	0.3162E -8		-8.5000		-1	0	1

Ajuste de la titulación de bicina 4.88 mM y praseodimio 4.04 mM.



Results page Run timed at 01.15 on 13 Jul 2005

new project

23 iterations

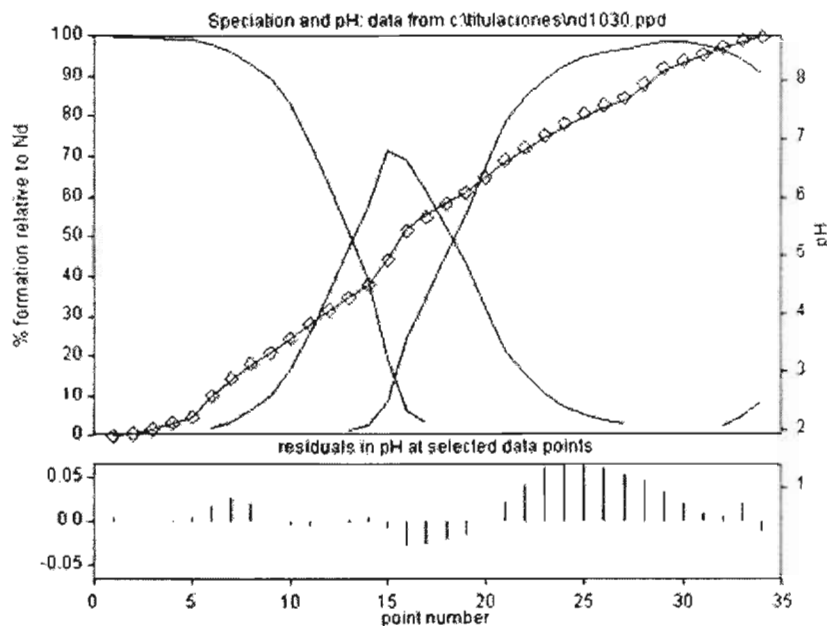
Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.1478

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.1995E-13		-13.7000		0	0	-1
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		0	1	1
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		0	1	2
Beta D refined	3.0796E 5	0.0474	5.4885	0.0206	1	1	0
Beta E refined	3.4229E 9	0.1920	9.4044	0.0834	1	2	0
Beta F refined	0.4720E-22	0.3704	-18.8661	0.0514	2	2	-4
Beta G refined	0.1399E-26	0.9752	-24.2343	0.3492	2	1	-4
Beta H constant	0.3162E -8		-8.5000		1	0	-1

Ajuste de la titulación de bicina 17.6 mM y neodimio 4.8 mM.



Results page Run timed at 01.33 on 13 Jul 2005

new project

14 iterations

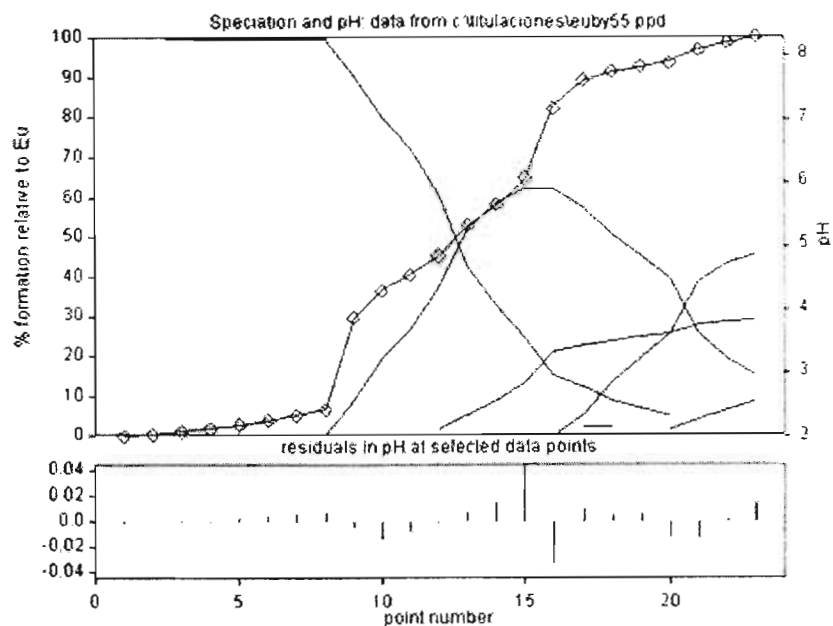
Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.3732

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2188E-13		-13.6600		0	0	-1
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		0	1	1
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		0	1	2
Beta D refined	5.7094E 5	0.0416	5.7566	0.0181	1	1	0
Beta E refined	1.0892E 10	0.0510	10.0371	0.0222	1	2	0
Beta F refined	0.1965E-17	2.0832	-18.2672	0.06584	2	2	-4
Beta G refined	0.5473E-25	2.5303	-25.2618	0.08451	2	1	-4
Beta H constant	0.3981E -8		-8.4000		1	0	-1

Ajuste de la titulación de bicina 4.7 mM y europio 5 mM.



Results page Run timed at 01.45 on 13 Jul 2005

new project

3 iterations

Refinement successful

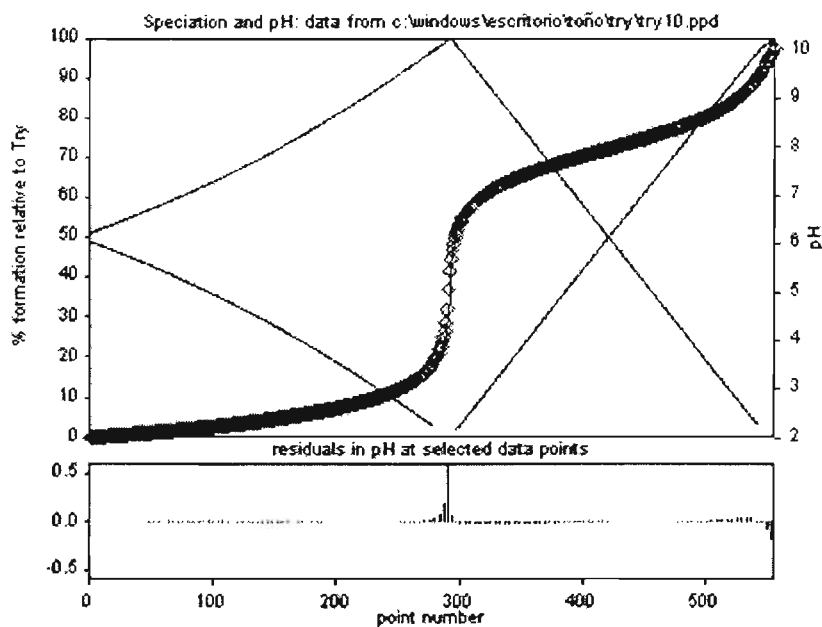
Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 0.1295

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation			
Beta A constant	0.2138E-13		-13.6700		-1	0	0
Beta B constant	1.7116E 8		8.2334		1	1	0
Beta C constant	5.0933E 9		9.7070		2	1	0
Beta D refined	4.9247E 5	0.0426	5.6924	0.0185	0	1	1
Beta E refined	2.0474E 10	0.1674	10.3112	0.0727	0	2	1
Beta F refined	0.1675E-22	0.1123	-22.7760	0.0488	-4	1	2
Beta G refined	0.6986E-19	0.1991	-19.1557	0.0865	-4	2	2
Beta H constant	0.5012E -8		-8.3000		-1	0	1

## 10.5.4 Tricina

Se realizó la titulación de la tricina, obteniendo se los siguientes valores de  $pK_a$ : 1.98 y 7.97.



Results page

Run timed at 01.32 on 21 Aug 2004

new project

3 iterations

Refinement successful

Chi-squared = 16.45

Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 1.6388

	Value	relative std devn	log beta	standard deviation		
Beta A constant	0.1995E-13		-13.7000		0	-1
Beta B refined	9.2497E 7	0.0046	7.9661	0.0020	1	1
Beta C refined	8.8643E 9	0.0061	9.9476	0.0027	1	2

### 10.5.5 Lantánidos - Tricina

Con los resultados anteriores se hicieron titulaciones con lantano, praseodimio y neodimio. A continuación se muestra un resumen de las constantes calculadas.

#### Lantano

M:L (mM)	10:10	5:30	promedio
ML	4.72	5.00	4.86±0.14
ML <sub>2</sub>	8.69	8.67	8.68±0.01
MLH <sub>1</sub>	-4.04	-3.30	-3.67±0.37
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-23.67	-23.16	-23.42±0.25
M <sub>2</sub> LH <sub>4</sub>	-28.26	-25.93	-27.09±1.16

#### Praseodimio

M:L (mM)	5:5	10:10	10:30	promedio
ML	5.61	5.48	5.42	5.50±0.06
ML <sub>2</sub>	8.90	8.83	8.87	8.87±0.02
MLH <sub>1</sub>	-2.47	-	-2.42	-2.44±0.02
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-20.41	-19.79	-19.81	-20.00±0.02
M <sub>2</sub> LH <sub>4</sub>	-	-24.07	-	-24.07±0.08

#### Neodimio

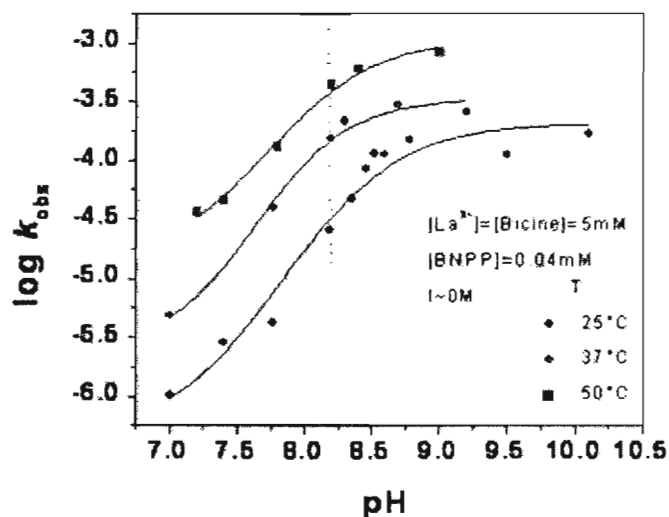
M:L (mM)	5:5	10:10	10:30	promedio
ML	6.06	5.93	6.29	6.09±0.10
ML <sub>2</sub>	9.52	9.33	9.28	9.38 ±0.07
MLH <sub>1</sub>	-2.10	-2.23	-1.35	-1.89±0.27
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-19.60	-20.70	-19.25	-19.85±0.44
M <sub>2</sub> LH <sub>4</sub>	-	-25.98	-	-25.98±0.42

## Europio

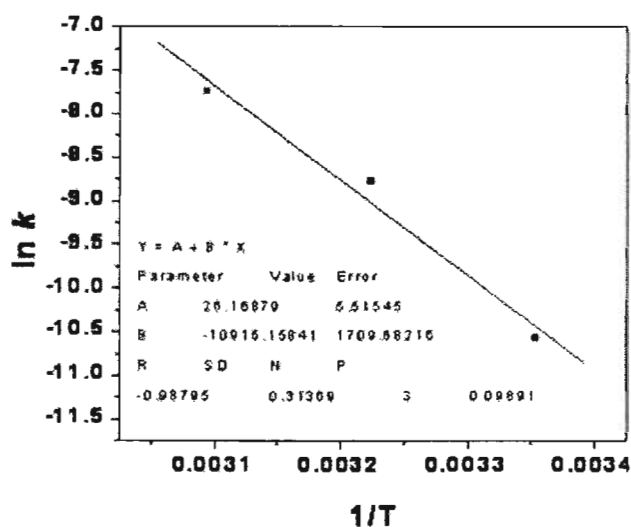
M:L (mM)	5:5	10:30	promedio
ML	5.98	6.44	6.21±0.33
ML <sub>2</sub>	10.21	9.93	10.07±0.20
MLH <sub>1</sub>	-1.01	-1.49	-1.25±0.34
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-17.45	-18.43	-17.94±0.69
M <sub>2</sub> LH <sub>4</sub>	-23.1	-22.28	-22.69±0.58

### 10.6 Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis

Para comparar con otros sistemas, se hicieron experimentos a 37 y 50 °C, cuyos resultados se muestran en la siguiente gráfica, junto con los de 25 °C.



Con la gráfica de Arrhenius (pH=8.20) se obtiene la energía de activación de la siguiente manera:



La energía de activación es función de la pendiente de la gráfica de Arrhenius y la constante del gas ideal (A76).

$$E_a = -m \cdot R \quad A76$$

Se sustituyen los valores del ajuste de la gráfica en A76.

$$E_a = -(-10915.16) \cdot 8.314 = 90748.64 \times 10^4 \text{ J mol}^{-1} = 90.75 \pm 14.214 \text{ kJ mol}^{-1} \quad A77$$

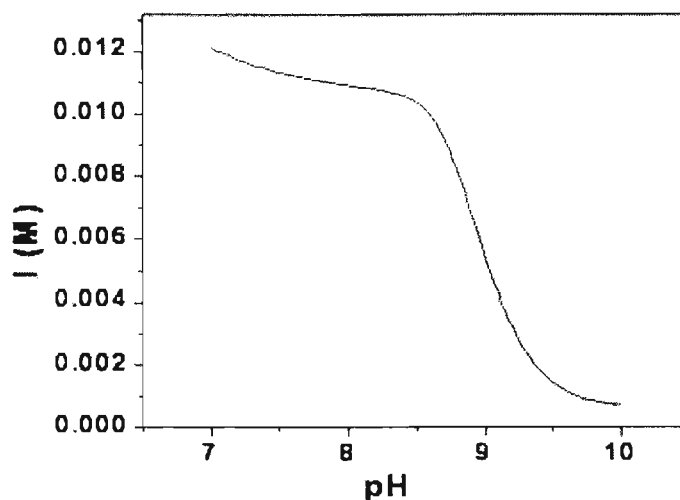


El error calculado es grande debido a que aunque las concentraciones de los reactivos y el pH son iguales, al no conocerse la dependencia de las constantes de equilibrio con la temperatura, no se puede garantizar que las especies presentes se encuentren en la misma concentración. La energía de activación está entre los valores reportados para la de la hidrólisis acuosa ( $103.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) y la básica ( $74.09 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Es de esperar que la energía de activación sea menor que cuando el nucleófilo es agua, ya que el hidróxido es mucho mejor nucleófilo. Con respecto a la hidrólisis básica, la energía de activación es mayor porque el hidróxido al ser coordinado es un nucleófilo más débil que el hidróxido libre.

## 10.7 Efecto de la fuerza iónica en la velocidad de hidrólisis

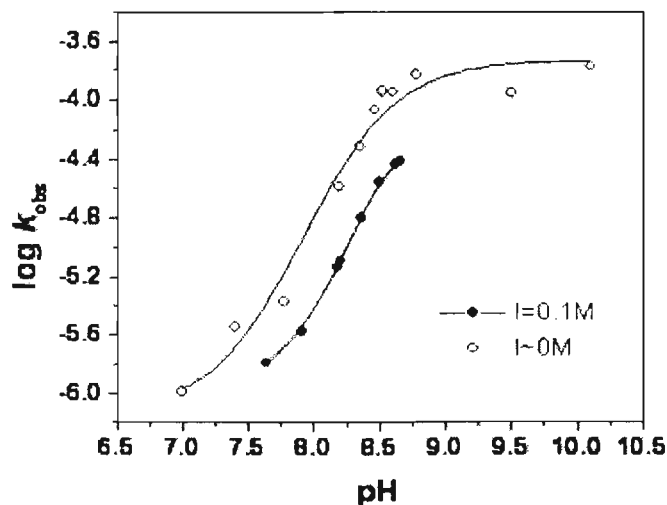
### 10.7.1 Sistemas con bicina

Los experimentos mencionados hasta ahora descritos se realizaron sin la presencia de algún electrolito añadido. Esto significa que para las condiciones 5 mM : 5 mM, por ejemplo, la fuerza iónica sería 0.012 M a pH 7 y  $7.1 \times 10^{-4}$  M a pH 10.



Estos valores son pequeños y la variación no es muy grande, por lo que el efecto no se toma en cuenta.

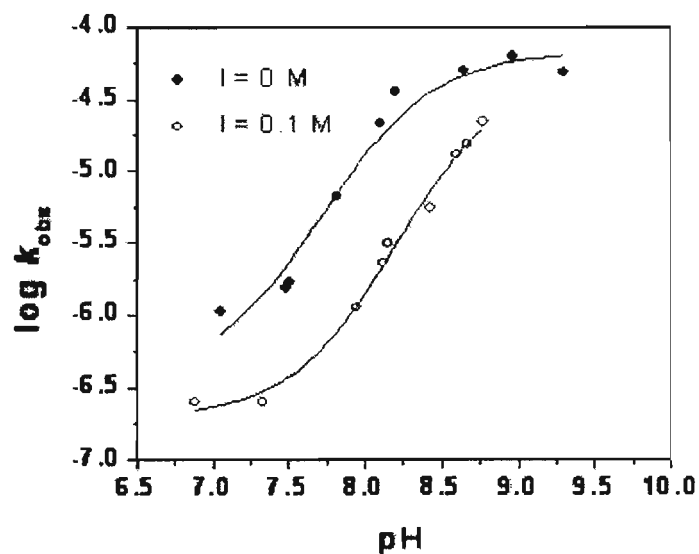
Para evaluar el efecto de la fuerza iónica sobre las reacciones de hidrólisis, se realizaron experimentos de cinética con fuerza iónica 0.1 M impuesta por perclorato de sodio. En la gráfica se muestran los resultados obtenidos junto con los de esas mismas condiciones sin perclorato de sodio. Los experimentos con fuerza iónica muestran una actividad ~100.5 veces menor, lo que representa una disminución del 70% en la actividad hidrolítica.



Esta disminución tan importante no puede ser explicada por el efecto salino simple, por lo que piensa en un efecto específico. En este caso la especie reactiva tiene carga  $1+$ , por lo que la formación de un par iónico con  $\text{ClO}_4^-$  parece poco probable. Sin embargo, este efecto ya ha sido observado y fue adjudicado precisamente a la formación de pares iónicos del anión perclorato con la(s) especie(s) reactiva(s), el efecto salino primario se descarta porque con otros aniones la disminución de la velocidad es mucho menor. La formación de pares iónicos entre el perclorato y algunos lantánidos se ha observado repetidamente en metanol.

### 10.7.2 Sistemas con tricina

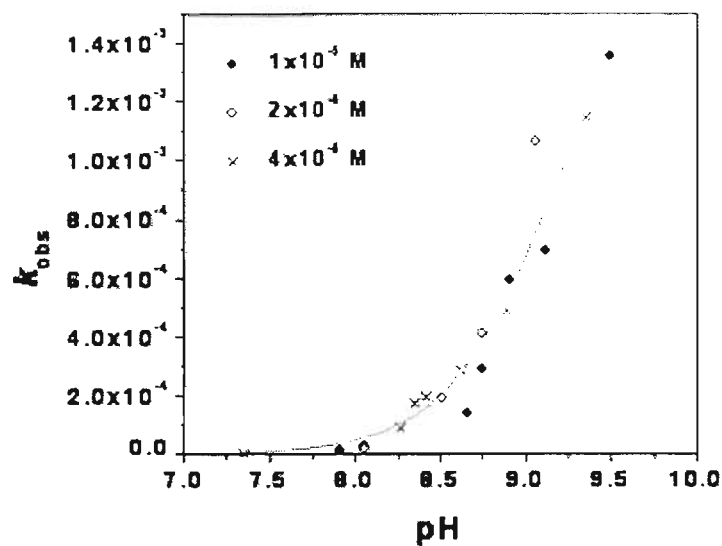
Se realizaron experimentos con fuerza iónica 0.1 M de perclorato de sodio, los resultados se muestran en la siguiente gráfica.



El efecto de la fuerza iónica es similar al de los sistemas con bicina, se observa una disminución en la velocidad, muy probablemente debida a asociaciones de los complejos activos con el ion perclorato.

### 10.8 Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de hidrólisis

Se realizaron corridas cinéticas con lantano 5 mM y bicina 2.5 mM con distintas concentraciones de sustrato. El perfil de pH observado coincide para las tres concentraciones de bnpp utilizadas. Con esto se garantiza que se tienen condiciones de pseudoprimer orden.



# Formation and phosphodiesterolytic activity of lanthanide(III) *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine hydroxo complexes

Antonio Calderón, Anatoly K. Yatsimirsky \*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510 México, D.F., México

Received 16 December 2003; accepted 1 May 2004

Available online 20 May 2004

## Abstract

Potentiometric titrations of *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine (bicine) in the presence of Ln(III) cations (Ln = La, Pr, Nd and Eu) in the pH range extended to ca. 9.5 reveal formation of two types of binuclear hydroxo complexes  $\text{Ln}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  and  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  (bicH = bicine) in addition to previously reported mononuclear mono- and bis-complexes  $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$  and  $\text{Ln}(\text{bic})_2^+$ , which predominate at pH below 8.  $^1\text{H}$  NMR titrations of La(III)–bicine mixtures in  $\text{D}_2\text{O}$  show that the complex formation with bicine is slow in the NMR time scale and confirm formation of hydroxide rather than alkoxide complexes in basic solutions. Formation of a different type of hydroxide species under conditions of an excess of metal over ligand is confirmed by studying the absorption spectra of the Nd(III)–bicine system in the hypersensitive region. The binuclear hydroxide complexes are predominant species at pH above 9 and their stabilities increase in the order  $\text{La} < \text{Pr} \approx \text{Nd} < \text{Eu}$ . They show fairly high catalytic activity in the hydrolysis of bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) at room temperature. Comparison of concentration and pH-dependences of the reaction rates with the species distribution diagrams shows that the catalytic hydrolysis of BNPP proceeds via a Michaelis–Menten type mechanism, which involves the  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  complex as the reactive species. The values of the catalytic rate constants and the Michaelis constants are in the range  $0.002\text{--}0.004\text{ s}^{-1}$  and  $0.35\text{--}1.5\text{ mM}$ , respectively, for all lanthanides studied. The half-life for the hydrolysis of BNPP is reduced from 2000 years to ca. 10 min at  $25\text{ }^\circ\text{C}$  and pH 9.2 in the presence of 5 mM La(III) and 2.5 mM bicine.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Lanthanides(III); Bicine; Hydroxo complexes; Phosphodiester hydrolysis

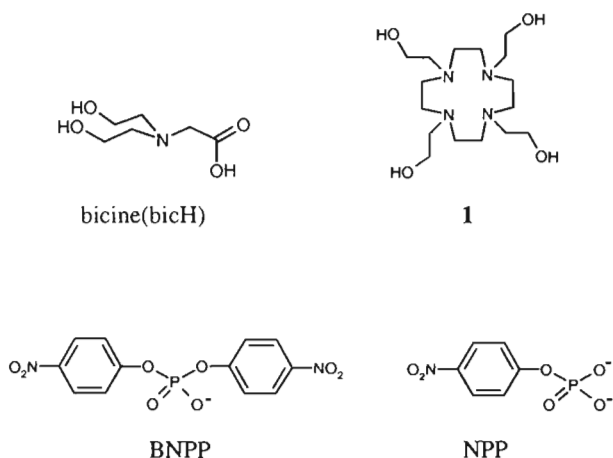
## 1. Introduction

*N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycine (bicine) (Scheme 1) belongs to a group of biological or Good's buffers designed for using in biochemical studies [1]. However, the long recognized metal ion coordinating properties of bicine made it actually less useful as a buffer, but instead has attracted a significant attention to this compound as an important ligand [2,3]. In particular, complex formation of lanthanides(III) with bicine has been studied extensively by several groups [4–9]. Results of potentiometric titrations at pH below 7 showed formation of  $\text{M}(\text{bic})^{2+}$  and  $\text{M}(\text{bic})_2^+$  complexes (bicH = bicine) with stability constants considerably higher than those for glycinate complexes indicating additional chelation by

2-hydroxyethyl groups. Recently published crystal structures of  $[\text{La}(\text{bic})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  [10] and  $[\text{Gd}(\text{AcO})(\text{bic})(\text{Phen})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$  [11] confirm the expected tetradentate binding to this ligand.

Results of titrations of lanthanide(III) ion–bicine mixtures in basic solutions are scarce and were interpreted only qualitatively. Martell and co-workers [8] observed precipitation of La(III) hydroxide in a 1:1 mixture with bicine of an unspecified total concentration at pH 9 after addition of ca. 1.5 mol equivalents of sodium hydroxide. In contrast, Kostromina and Romanenko [4] observed that lanthanide complexes of bicine sustained strongly basic conditions, i.e., there were no metal hydroxide precipitation until pH 13 from 0.1 M La(III) solution in the presence of 0.2 M bicine, and they proposed formation of either alkoxo or hydroxo complexes in basic solutions. Such species are of interest due to their possible catalytic activity in the phosphate ester hydrolysis by analogy with

\* Corresponding author. Tel.: +525556223813; fax: +525556162010.  
E-mail address: [anatoli@servidor.unam.mx](mailto:anatoli@servidor.unam.mx) (A.K. Yatsimirsky).



Scheme 1.

other lanthanide-based catalytic systems [12]. Macrocyclic polyamine metal complexes with alcohol pendants have been often employed as models for serine hydrolases [13–15]. Also the *N*-(2-hydroxyethyl) fragment is the structural element of a series of macrocyclic ligands like **1** (Scheme 1), which form the lanthanide complexes possessing high phosphodiesterolytic activity in their deprotonated forms [16]. These lanthanide complexes are, however, thermodynamically unstable in water and must be pre-synthesized in non-aqueous solutions. In contrast, hydroxo lanthanide complexes stabilized by amino acid ligands are formed spontaneously in water [17] that provides some practical advantages in their using. Our preliminary results on amino acid–La(III) system including bicine and several other glycine derivatives showed formation of sufficiently stable deprotonated binuclear complexes at pH around 9 with rather high phosphodiesterolytic activity [18]. In this paper we report a detailed speciation and kinetic study of the bicine system with a series of lanthanide(III) cations, which reveals formation of a new type of catalytically active binuclear hydroxo complexes stabilized by coordination with only one organic ligand molecule.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Bis(4-nitrophenyl) phosphate, *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycine, NaClO<sub>4</sub> and reagent grade La(III), Pr(III), Nd(III) and Eu(III) perchlorates from Aldrich were used as supplied. The concentration of metal ions in stock solutions was determined by adding excess of ethylenediaminetetraacetic acid and then back titrating with ZnCl<sub>2</sub> with Eriochrome Black T as indicator [19]. Distilled and deionized water (Barnstead nanopure system) was used.

### 2.2. Potentiometry

Potentiometric titrations were performed as described in [20]. All titrations were performed in a 75-ml thermostated cell kept under nitrogen at 25 °C. The initial volume of titrating solution was 50 ml. The ionic strength was kept constant with 0.1 M NaClO<sub>4</sub>. Measurements of pH were taken on an Orion Model 710-A research digital pH meter as carbonate-free NaOH solution was added to the system in small increments. The electrode was calibrated from pH readings of 45 separate titration points of a titration of dilute (ca. 0.01 M) standardized HClO<sub>4</sub> with NaOH with the same background electrolyte. The program Hyperquad 2000 Version 2.1 NT was used to calculate all equilibrium constants [21]. Titrations of bicine and its mixtures with metal perchlorates were performed in the concentration range 2–10 mM of each component. Species distribution diagrams were calculated by using Species Ver. 0.8 Academic Software 1999.

### 2.3. Spectrophotometry and kinetics

Kinetic measurements were performed by using a Hewlett–Packard 8453 diode array spectrophotometer equipped with a Peltier thermostatted cell compartment. Reaction solutions were prepared by combining appropriate amounts of metal and ligand stock solutions to the desired volume and pH was adjusted by adding small volumes of strong base. Reactions were initiated by adding an aliquot of the substrate solution. Solution pH was measured after each run and all kinetic runs in which pH variation was larger than 0.1 were excluded. In order to have sufficiently high buffer capacity 10 mM Tris solution was employed in kinetic measurements. Tris forms weak complexes with trivalent lanthanides with stability constants about 100 M<sup>-1</sup> [12a], ca. three order of magnitude smaller than for bicine. Therefore, it does not compete with bicine in the millimolar concentration range of both ligands.

The course of all hydrolysis reactions was monitored spectrophotometrically by appearance of 4-nitrophenolate anion at 400 nm. Stock solutions of BNPP were freshly prepared in water. Kinetic measurements used 20–40 μM substrate and varied concentrations of metal salts (typically from 0.5 to 5 mM) at 25 °C. The observed first-order rate constants (*k*<sub>obs</sub>) were calculated by the integral method or, for slow reactions, from initial rates. Analysis of two-step kinetics of the hydrolysis of BNPP to NPP and further to inorganic phosphate is described in Section 3.

Spectrophotometric study of the Nd(III)–bicine system was performed by using a Unicam UV-500 double-beam spectrophotometer.

## 2.4. NMR spectroscopy

$^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 300 NMR spectrometer in  $\text{D}_2\text{O}$ . Solution pH was adjusted by adding concentrated NaOD to the mixture of metal and ligand in  $\text{D}_2\text{O}$ . Instrumental pH values measured by standard glass electrode in  $\text{D}_2\text{O}$  solutions were corrected to pD values by adding 0.4 [22].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Complexation equilibria

In preliminary experiments we observed a significant phosphodiesterolytic activity of lanthanides at pH above 8 in the presence of equimolar or smaller amounts of bicine, which rapidly disappeared on increase in the ligand-to-metal ratio. Apparently higher complexes formed with excess of the ligand are inactive and their appearance precludes formation of potentially active hydroxide species. Therefore, we undertook a study of the system at possibly low ligand-to-metal ratios. In the millimolar concentration range the lanthanide solutions remained stable up to pH 9.5 in the presence of one and even half molar equivalent of bicine that allowed us to perform a sufficiently complete potentiometric characterization of the system.

Fig. 1 illustrates a typical titration experiment with 1:1 mixture of bicine and  $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ . The titration curve for the ligand–metal mixture (open squares) is shifted to lower pH values, respectively, the curve for the free ligand (solid squares) indicating the competition of metal ions with protons for the ligand and, consequently, the complex formation. Another difference between these curves is that the system in the presence of metal consumes two additional mole equivalents of hydroxide. Therefore, at the first step the titration results were fitted to a model involving two known complexation equilibria (1) and (2) and an additional equilibrium for formation of a doubly deprotonated species of the type  $\text{MLH}_{-2}$ ,  $\text{ML}_2\text{H}_{-2}$  or  $\text{M}_2\text{L}_2\text{H}_{-4}$ . Stability constants for binary hydroxo complexes  $\text{M}(\text{OH})^{2+}$  and  $\text{M}_2(\text{OH})_2^{4+}$  were taken from literature [23–25] for conditions maximally close to our titration conditions and were used as fixed parameters. The best results were obtained with the set of reactions (1)–(3) although the fitting was not completely satisfactory. For the case of  $\text{La}(\text{III})$ –bicine system in Fig. 1, the respective theoretical fitting curve is shown by the dashed line. The fitting quality was much better when an additional equilibrium (4) was included (solid line in Fig. 1). Formation of a species with 2:1 metal-to-ligand ratio is confirmed indirectly by observation that the solution remains stable up to pH 9.2 even in the presence of an excess of metal over bicine (an example of the titration curve obtained in the presence

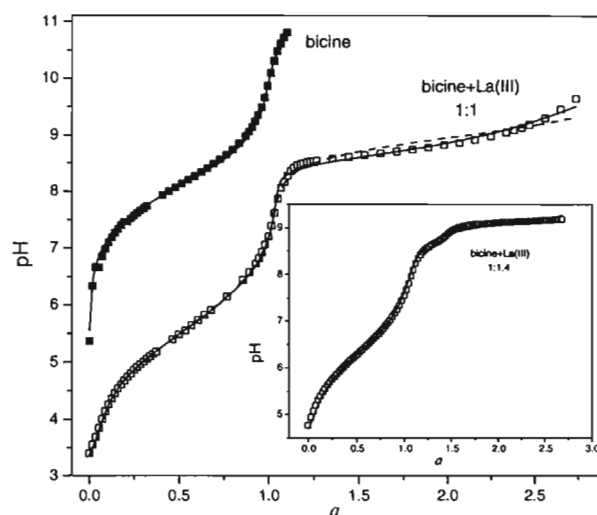
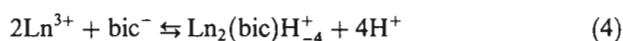


Fig. 1. Titration curves for 10.8 mM bicine alone (solid squares) and in the presence of 11.1 mM  $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$  (open squares); inset: the titration curve for 1.78 mM bicine in the presence of 2.46 mM  $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ ;  $a$  is the number of mole equivalents of NaOH per 1 equiv. of bicine. Solid lines are the fitting curves generated by HYPERQUAD 2000 with the equilibrium constants for reactions (1)–(4) given in Table 1. The dash line is the best fitting curve obtained taken into account only reactions (1)–(3).

of excess metal over the ligand is shown in the insert in Fig. 1) and is in line with spectrophotometric and kinetic results discussed below.



Stability constants for complexes with all metals studied are collected in Table 1. Formation constants for  $\text{Ln}(\text{bic})^{2+}$  and  $\text{Ln}(\text{bic})_2^{+}$  increase on going from  $\text{La}(\text{III})$  to  $\text{Eu}(\text{III})$  and agree well with previously reported values [4,5]. Stabilities of deprotonated complexes follow generally the same trend. These complexes may be either hydroxo or alkoxo complexes formed via deprotonation of coordinated water molecules or hydroxyethyl groups of bicine, respectively. In the case of lanthanide complexes of **1**, the deprotonation of hydroxyethyl groups was demonstrated by observation of ligand phosphorylation in the reaction with BNPP [16]. Also deprotonation of hydroxyethyl pendants coordinated to  $\text{Zn}(\text{II})$  in macrocyclic polyamine complexes was observed [14,15]. We did not observe phosphorylation of bicine in the presence of  $\text{Ln}(\text{III})$  cations, but this observation is not conclusive since the phosphorylated ligand may undergo a rapid dephosphorylation. Additional evidences in favor of formation of hydroxo complexes were obtained by NMR titrations.



Table 1

Logarithms of stability constants of lanthanide complexes of bicine and kinetic parameters of BNPP hydrolysis by  $\text{Ln}_2(\text{bic})\text{H}_{-4}^-$  species at 25 °C and ionic strength 0.1 M<sup>a</sup>

Species	La(III)	Pr(III)	Nd(III)	Eu(III)
bicH	8.20 ± 0.05 <sup>b</sup>			
$\text{Ln}(\text{bic})_2^{2+}$	4.73 ± 0.07	5.40 ± 0.05	5.7 ± 0.1	5.63 ± 0.06
$\text{Ln}(\text{bic})_2^{-}$	8.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.5 ± 0.1	10.48 ± 0.09
$\text{Ln}_2(\text{bic})_2\text{H}_{-4}$	-24.1 ± 0.2	-18.75 ± 0.05	-18.8 ± 0.1	-19.6 ± 0.5
$\text{Ln}_2(\text{bic})\text{H}_{-4}^-$	-28.3 ± 0.4	-25.7 ± 0.1	-25.20 ± 0.05	-22.91 ± 0.08
$k_c$ (s <sup>-1</sup> )	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$(4.0 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(3.3 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$
$K_M$ (M)	$(3.4 \pm 0.8) \times 10^{-4}$	$(6.0 \pm 1.5) \times 10^{-4}$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(4.0 \pm 1.0) \times 10^{-4}$
$k_c$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$1.3 \times 10^{-5}$	$6.3 \times 10^{-5}$		$2.5 \times 10^{-4}$
$K_M$ (M) <sup>c</sup>	$2.6 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-3}$		$2.8 \times 10^{-3}$

<sup>a</sup> Stability constants are the mean values from at least three titrations at different metal and ligand total concentrations.

<sup>b</sup> The ligand protonation constant.

<sup>c</sup> Kinetic parameters for BNPP hydrolysis by lanthanide cations at pH 7.4 and 50 °C [28].

The La(III)–bicine system, which involves a diamagnetic metal ion, was studied by <sup>1</sup>H NMR titration in D<sub>2</sub>O. Fig. 2 shows the spectra of the free ligand at different pD values. The ligand deprotonation induces expected up-field shifts of the signals and the analysis of chemical shifts versus pD profiles for all three chemically non-equivalent methylene groups gives the average  $\text{p}K_a = 8.88 \pm 0.01$  and the chemical shifts of protons in neutral (bicH) and deprotonated anionic (bic<sup>-</sup>) species shown in Table 2. Increased by 0.7 logarithmic units  $\text{p}K_a$  value in D<sub>2</sub>O as compared with H<sub>2</sub>O (cf. Table 1) agrees well with reported isotope effects in  $\text{p}K_a$  for other acids of similar structure and strength [26].

Titration results for the La(III)–bicine 1:1 mixture are shown in Fig. 3. The spectrum at pD = 4.28 essentially coincides with the spectrum of free bicine, although some broadening of the triplet of the N-adjacent methylene of hydroxyethyl group indicates a possible weak complexation of La(III) with bicine zwitterion overlooked in the potentiometric titration experiments. On further increase in pD from 5 to 8, the triplet of the O-adjacent methylene of hydroxyethyl group moves very

Table 2

Proton NMR chemical shifts for neutral, anionic and La(III) bound forms of bicine in D<sub>2</sub>O

Proton	bicH	bic <sup>-</sup>	La(bic) <sup>2+</sup> and La(bic) <sub>2</sub> <sup>+</sup>
N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O	3.37	2.66	2.77
N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O	3.85	3.54	3.79
N-CH <sub>2</sub> -COO	3.80	3.12	3.35

slightly upfield by just 0.02 ppm, the singlet of the methylene group between α-nitrogen atom and carboxylate at 3.77 ppm gradually disappears, and a new signal at 2.75 ppm appears. There is always a signal at ca. 3.34 ppm, which in the free bicine belongs to the N-adjacent methylene of hydroxyethyl group. Both this signal and the new signal at 2.75 ppm are broad at pD below 8, but then the signal at 3.34 ppm is transformed into a sharp singlet and the signal at 2.75 ppm becomes nearly resolved a triplet, which are integrated for 2 and 4 protons, respectively. Such behavior is indicative of slow in the NMR time scale exchange of coordinated bicine when signals of free and bound ligand species appear separately. Thus, the new signal at 2.75 ppm belongs to

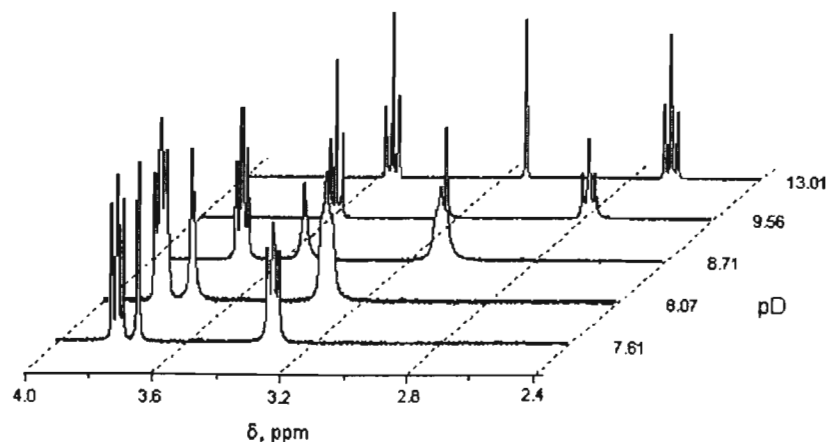


Fig. 2. <sup>1</sup>H NMR spectra of 5 mM bicine at various pD values in D<sub>2</sub>O.

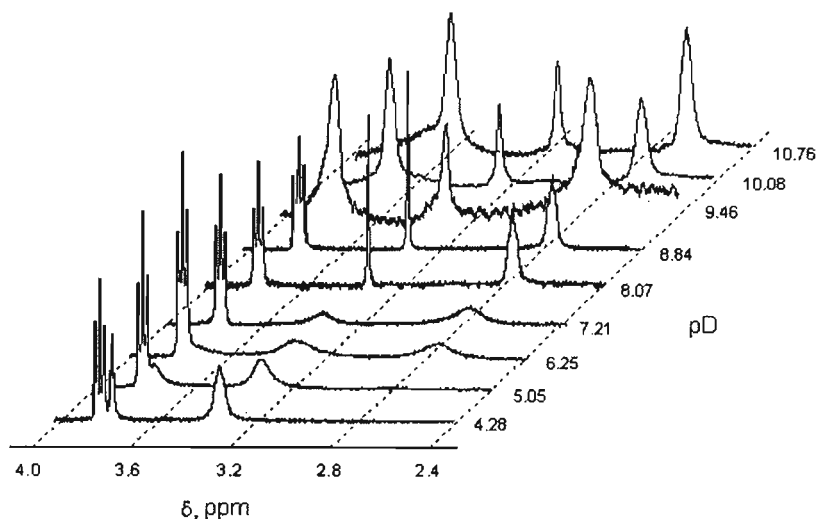


Fig. 3.  $^1\text{H}$  NMR spectra of 5 mM bicine in the presence of 5 mM  $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$  at various pD values in  $\text{D}_2\text{O}$ .

the N-adjacent methylene of hydroxyethyl group of coordinated bicine and the signal of the methylene group between  $\alpha$ -nitrogen atom and carboxylate in the coordinated bicine appears in the place where the signal of N-adjacent methylene of hydroxyethyl group in free bicine is observed.

In the pD range 8.1–8.8, the spectrum remains unchanged and well resolved. Under these conditions less than 5% of bicine remains free, ca. 55% of bicine is incorporated into  $\text{La}(\text{bic})_2^{2+}$  complex and ca. 35% into  $\text{La}(\text{bic})_2^+$  complex. The absence of two sets of signals for mono- and bis-complexes indicates that either binding of the second bicine anion is fast in the NMR time scale and we observe an averaged spectrum or, more probably, signals of both bound anions are very close to each other. From these spectra one can find positions of signals of coordinated bicine anion, which are collected in the third column of Table 2. Obviously, all signals are shifted downfield by 0.1–0.25 ppm in respect to their positions in the free anion due to coordination to the metallic centre.

When pD increases over 9 one observes increased signal broadening and progressive up-field shifts. At highest pD employed 85% of bicine is incorporated into  $\text{La}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  complex and all three signals appear shifted upfield by 0.12–0.16 ppm. These shifts can be attributed to increased electronic density on the coordinated ligand due to complex deprotonation. However, if the deprotonation occurred at hydroxyethyl groups it would produce largest shift of the signal of the O-adjacent methylene and smaller shifts of other signals. In fact all three signals are shifted equally, which agrees with deprotonation of coordinated water molecules and formation of the hydroxide complex  $\text{La}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$ . Also by its absolute value the observed upfield shift is substantially smaller than one would expect in the case

of deprotonation of the alcohol group. For example, deprotonation of the Zn(II)-bound alcohol OH in a Zn(II) macrocyclic complex with pendent alcohol group induced ca. 0.3 ppm upfield shift of the signals of methylene protons adjacent to oxygen [15].

The titration experiment with 5 mM La(III) and 2.5 mM bicine showed similar spectral changes on increase in pD up to 9. At higher pD values (titration with excess of metal was possible only up to pD 9.9) signals also underwent broadening and upfield shifts, but to a lesser degree. At pD 9.9 only 13.5% of bicine is incorporated into  $\text{La}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  complex and 86% of the ligand is in the form of  $\text{La}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$ . Therefore, observed under these conditions upfield shift by ca. 0.05 ppm can be attributed principally to the formation of the latter complex. A smaller shift in this case can be explained by higher positive charge of the complex.

An additional evidence in favor of formation of a different hydroxo complex in the presence of an excess of metal was obtained by spectrophotometric titrations of mixtures of Nd(III) and bicine in the “hypersensitive” region [27] of 4f–4f transitions between 570 and 595 nm. Fig. 4(a) shows the spectra of 1:1 metal-to-ligand mixture at increasing pH values. The spectrum at pH 3.0 coincides with the spectrum of free Nd(III) cation. At pH 6.9 already 80% of metal is incorporated into  $\text{Nd}(\text{bic})_2^{2+}$  complex and ca. 10% into  $\text{Nd}(\text{bic})_2^+$  complex and a relatively small shift of the absorption maximum to higher wavelengths is observed. At pH 9.3 practically all metal (98.2%) is incorporated into the neutral binuclear  $\text{Nd}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  complex. This induces a characteristic shift and splitting of the absorption band due to the field created by highly basic ligands [27]. The spectrum of 2:1 metal-to-ligand mixture at pH near neutrality, Fig. 4(b), is closer to the spectrum of free metal than in the case of the 1:1 mixture apparently because

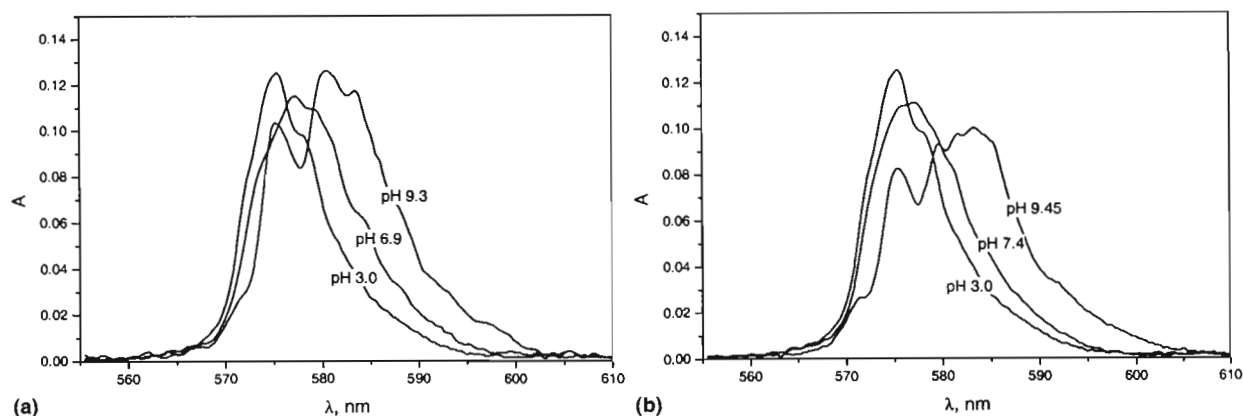


Fig. 4. Absorption spectra of 5 mM Nd(III) in the presence of 5 mM bicine (a) and 2.5 mM bicine (b) in the hypersensitive region at various pH values. The optical path length is 4 cm.

ca. 50% of the metal remains uncomplexed. At pH 9.45, the predominant species is  $\text{Nd}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  complex (52%) and comparison with the spectrum at pH 9.3 in Fig. 4(a), which belongs to practically pure  $\text{Nd}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  complex, shows a different spectral pattern indicating formation of another species.

Possible structures of binuclear hydroxo complexes are shown in Scheme 2, structures 2 and 3. The binuclear doubly bridged fragment  $\text{M}(\text{OH})_2\text{M}$  is often found in lanthanide hydroxo complexes stabilized by amino acid ligands [17] and its presence is highly probable also in bicine complexes. Two other hydroxide ions probably are terminal ligands. Perhaps the closest analog to the complex 2 characterized by X-ray structural analysis is the complex  $[(\text{EDTA})\text{Er}(\text{OH})_2\text{Er}(\text{EDTA})]^{4+}$  [17]. The complex 3 at first glance seems rather unusual, but in fact formation of lanthanide hydroxo complexes containing

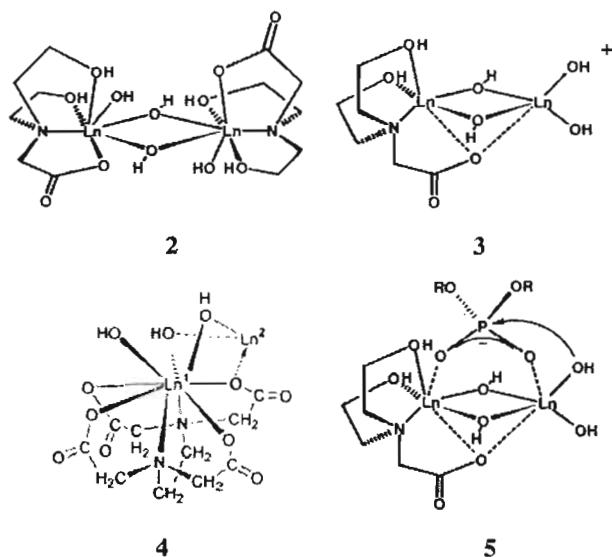
less than 1 mol equivalent of stabilizing organic ligand per one mole of metal has been reported in several instances, e.g., complexes  $[\text{Er}_4(\mu_3\text{-OH})_4(\text{Glu})_3(\text{H}_2\text{O})_8]^{5+}$  and  $[\text{Dy}_{12}(\mu_3\text{-OH})_{16}(\text{I})_2(\mu_3\text{-Tyr})_8(\text{H}_2\text{O})_{20}]^{10+}$  [17]. In addition, the solid-state structure of the complex  $[\text{La}_4(\mu_3\text{-OH})_4(\text{EDTA})_4]^{8-}$ , the fragment of which is shown in Scheme 2 (structure 4), illustrates how the carboxylate group of a polydentate ligand can serve as a bridge between two lanthanides cations [17]. On basis of this analogy we assume the structure 3 for the  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  complexes.

### 3.2. Kinetics of the phosphodiester hydrolysis

The reaction kinetics was studied with a chromogenic phosphodiester substrate BNPP (Scheme 1) widely employed for testing activities of artificial phosphodiesterases. The hydrolysis of BNPP in the presence of  $\text{Ln}(\text{III})$  complexes of bicine proceeds with formation of two *p*-nitrophenolate anions and inorganic phosphate as final products. The absorbance *A* versus time *t* profiles monitored at the absorption maximum of *p*-nitrophenolate anions generally followed the two-exponential equation (5), which corresponds to consecutive first-order hydrolysis of BNPP to mono-*p*-nitrophenyl phosphate (NPP, Scheme 1) with liberation of the first mole equivalent of *p*-nitrophenolate (rate constant  $k_1$  and then of inorganic phosphate and the second mole equivalent of *p*-nitrophenolate (rate constant  $k_2$ ),

$$A = \varepsilon_{\text{NP}}[\text{BNPP}]_0 \left\{ 2 + (k_1 e^{-k_2 t} + (k_1 - 2k_2) e^{-k_1 t}) / (k_2 - k_1) \right\}, \quad (5)$$

where  $\varepsilon_{\text{NP}}$  and  $[\text{BNPP}]_0$  are the molar absorptivity of *p*-nitrophenolate and the initial substrate concentration, respectively. Often  $k_2$  is much larger than  $k_1$  and so only  $k_1$  can be calculated from the experimental kinetic curve. Since  $k_1$  corresponds to the hydrolysis of a phosphodiester bond, we paid principal attention to this constant.



Scheme 2.

As was mentioned above, the rate of BNPP cleavage is sensitive to the molar ratio of metal ion and bicine. Fig. 5 illustrates the effect of  $[La(III)]/[bicine]$  ratio on the rate of BNPP and NPP hydrolyses in form of a plot similar to Job isomolar plots. A sharp maximum in  $k_1$  is observed at the 2/1 ratio. A less pronounced maximum is seen also in  $k_2$ . Similar dependences were observed also with other lanthanides. This indicates qualitatively that the active species are  $Ln_2(bic)(OH)_4^+$  complexes.

To obtain a detailed information on the type of reactive species and to deduce the rate law in terms of concentrations of these species, the reaction kinetics was studied at different total metal and ligand concentrations as a function of pH. A typical experiment is illustrated in Fig. 6 for Nd(III). Solid squares show the rate constants for the first step of BNPP hydrolysis obtained with the twofold excess of the metal over bicine as a function of pH. Solid lines show the distribution of all hydroxide complexes existing in solution calculated for given metal and ligand total concentrations in the same pH-range. Obviously, the trend in rate constants follows the distribution curve for  $Nd_2(bic)(OH)_4^+$  complexes. Open points show the rate constants obtained in a 1:1 mixture of Nd(III) and bicine and dashed lines are the distribution curves under these conditions. The reaction is much slower under these conditions, but again a clear correlation between rate constants and the curve for  $Nd_2(bic)(OH)_4^+$  complexes is observed. It is worth noting that the change in metal-to-ligand ratio just from 2:1 to 1:1 produces a very strong decrease in the fraction of  $Nd_2(bic)(OH)_4^+$  complexes in spite of the fact that the ratio of concentrations of two hydroxide complexes  $[Ln_2(bic)_2(OH)_4]/[Ln_2(bic)(OH)_4^+]$  should be proportional to the ligand concentration in the first degree.

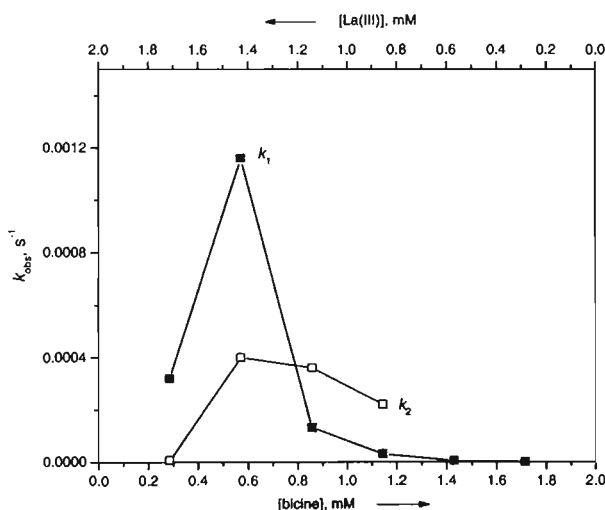


Fig. 5. Observed rate constants for the hydrolysis of BNPP ( $k_1$ ) and NPP ( $k_2$ ) at different molar ratios of bicine and La(III) at the constant total concentration  $[bicine] + [La(III)] = 2 \text{ mM}$  and pH 9.0.

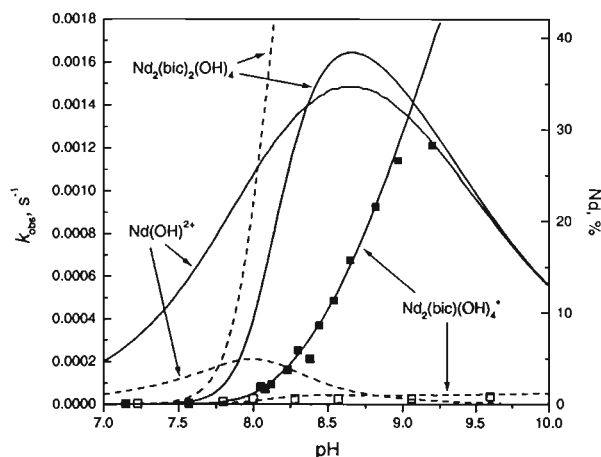


Fig. 6. pH-dependence of observed rate constants for the hydrolysis of BNPP in the presence of 5 mM Nd(III) with 2.5 mM bicine (solid squares) or with 5.0 mM bicine (open squares) and the distribution diagram for all hydroxide complexes of Nd(III) calculated for mixtures of 5 mM Nd(III) with 2.5 mM bicine (solid lines) and 5 mM Nd(III) with 5.0 mM bicine (dashed lines).

However, this ratio depends on the concentration of free rather than total ligand and due to relatively strong binding of bicine to lanthanide cations the concentration of free ligand above pH 7 becomes very low and sharply decreases in the presence of excess metal. Similar results were obtained for other lanthanides and they clearly indicate that the reactive species is the  $Ln_2(bic)(OH)_4^+$  complex. Two other hydroxide species, which are formed in the same pH-range, i.e.,  $Ln(OH)_2^{2+}$  and  $Ln_2(bic)_2(OH)_4$  complexes, do not contribute to the observed reactivity.

Figs. 7(a)–(d) show the plots of the observed rate constant for the first step of BNPP hydrolysis for each metal as a function of concentration of reactive species. They all have a non-linear shape with “saturation” commonly interpreted as indicative of a Michaelis–Menten type mechanism, which involves at the first step formation of the substrate–catalyst complex with instability constant  $K_M$  and at the second step the chemical transformation of the complex with the rate constant  $k_c$ . Indeed in all cases a satisfactory fit to the Michaelis–Menten equation (6) is observed,

$$k_{\text{obs}} = k_c [Ln_2(bic)(OH)_4^+] / (K_M + [Ln_2(bic)(OH)_4^+]) \quad (6)$$

The kinetic parameters, catalytic ( $k_c$ ) and Michaelis ( $K_M$ ) constants, are given in Table 1. Kinetics of this type was observed previously both with free lanthanide cations [28] and their complexes with ligands like **1** [29]. For comparison, results obtained with aquo ions are given in last two rows of Table 1. One can see that the reactivity of binuclear hydroxide complexes manifested in  $k_c$  values are much higher (results for aquo ions are at 50 °C)

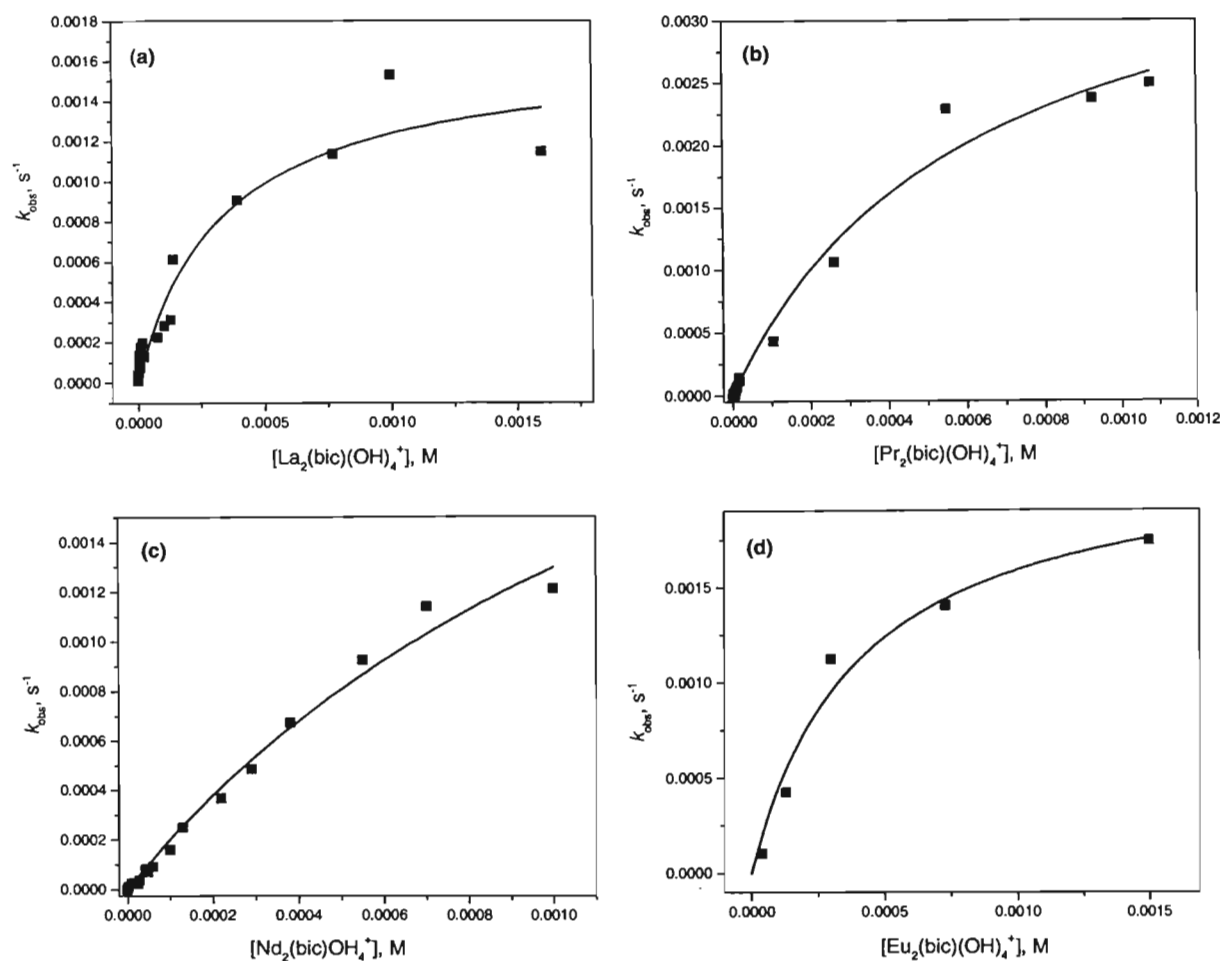


Fig. 7. Observed rate constants for the hydrolysis of BNPP vs. concentration of  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  complexes. Solid lines are theoretical fits to Eq. (6) with parameters given in Table 1.

and does not vary significantly on going from La(III) to Eu(III). In contrast, the reactivity of aquo ions increases by ca. one order of magnitude in the same lanthanide series. This increase, observed also in other lanthanide-based systems [30], was ascribed to stronger electrophilic activation of the phosphodiester by more acidic cations of heavier lanthanides, however, it seems more probable in light of these results that at least partly it may reflect larger degree of formation of metal hydroxide species with more acidic lanthanides in neutral solutions. When reactivities of already hydroxide complexes  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  are compared they appear to be practically the same for different cations. The stabilities of catalyst–substrate complexes do not differ significantly for different cations and are somewhat larger for  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  species than for  $\text{Ln}^{3+}$  aquo ions. This may be due to a bridging coordination of the phosphodiester anion schematically shown in the structure 4 (Scheme 2). Such type of binding was reported for binuclear Co(III) complexes and is often considered as a possibility for lanthanide complexes [31].

Previously binuclear hydroxide complexes of the type  $\text{Ln}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$  were identified as reactive species in the phosphodiester hydrolysis by lanthanide complexes with amino acid [18] and amino alcohol [20] ligands. With La(III) complex of structurally most close to bicine ligand *N,N*-dimethyl glycine (*N,N*-Me<sub>2</sub>Gly), the second-order rate constant for the BNPP hydrolysis at 25 °C equals  $12.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [18]. The respective rate constant for  $\text{La}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  equals  $k_c/K_M = 5.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , but the reactivity of the neutral complex  $\text{La}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  is negligibly small. Thus, additional binding to hydroxyethyl groups, which of course increases the complex stability, blocks the reactivity, apparently leaving too little space for the substrate coordination. Nevertheless, the removal of one bicine anion from the  $\text{La}_2(\text{bic})_2(\text{OH})_4$  complex restores the reactivity at the level similar to that observed for  $\text{La}_2(\text{N,N-Me}_2\text{Gly})_2(\text{OH})_4$ . The proposed reaction mechanism is illustrated in Scheme 2 (structure 5). It involves the bridging coordination of the substrate to the binuclear complex and subsequent nucleophilic attack by a coordinated terminal hydroxide.

The actual independence of the catalytic activity of these complexes of the type of metal ion can be explained in terms of the mechanism shown in Scheme 2 as follows. Smaller lanthanide cations, which should provide a stronger electrophilic assistance to the phosphate ester due to higher positive charge density at the same time reduce more strongly the negative charge on the coordinated hydroxide making it a less active nucleophile. The mutual compensation of these effects leads to observed independence of  $k_c$  on the nature of metal ion.

Comparison with rate parameters for the BNPP hydrolysis in the presence of other lanthanide-based catalysts summarized in [12a] shows that  $\text{Ln}_2(\text{bic})(\text{OH})_4^+$  complexes are among the most active systems. The half-life of BNPP in the presence of 5 mM La(III) and 2.5 mM bicine at pH 9.2 and 25 °C is reduced from 2000 years to 10 min that represents the catalytic effect of  $1 \times 10^8$ .

A large number of lanthanide polynuclear hydroxo complexes stabilized by amino acid ligands has been recently prepared with a purpose to obtain new phosphodiesterase catalysts via a "rational design" procedure [17]. These complexes isolated as solid crystalline materials involve as a common structural motif the tetranuclear  $\text{Ln}_4(\mu_3\text{-OH})_4^{8+}$  core. We do not observe formation of species of this composition in solution neither with bicine nor with other amino acid ligands [18] and it seems that such tetranuclear complexes are formed in the solid state only. Moreover, it is rather improbable that such species might have a phosphodiesterolytic activity because the triply coordinated hydroxide anion may lose completely its nucleophilicity. However, the structural study of solid-state hydroxide complexes provides valuable information on possible types of coordination of organic and hydroxide ligands with lanthanides in catalytically active hydroxide complexes, which differ from isolated complexes in having lower nuclearity and higher hydroxide/metal ratio. Presented in this paper kinetic and solution speciation studies together with previous results on glycinate [18] and other lanthanide amino acid complexes [32–35] show that the use of amino acids as stabilizing ligands is a fruitful approach, which leads to creation of new highly active artificial phosphodiesterases.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Alexander Dikiy for valuable collaboration in performing NMR experiments and the Academic Exchange Program between National Autonomous University of Mexico and University of Bologna for financial support, which made this collaboration possible.

#### References

- [1] N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M.M. Sing, *Biochemistry* 5 (1966) 467.
- [2] S. Chaberek Jr., R.C. Courtney, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 2185.
- [3] H. Sigel, *Coord. Chem. Rev.* 122 (1993) 227.
- [4] N.A. Kostromina, E.D. Romanenko, *Zh. Neorg. Khim. (Russ.)* 15 (1970) 1782; N.A. Kostromina, R.V. Tikhonova, *Zh. Neorg. Khim. (Russ.)* 19 (1974) 2000; N.A. Kostromina, *Zh. Neorg. Khim. (Russ.)* 19 (1974) 665.
- [5] E. Riećanska, E. Fuleova, J. Majer, *Chem. Zvesti* 36 (1982) 501.
- [6] Y. Masuda, H. Sakai, S. Misumi, *Bunseki Kagaku* 22 (1973) 1577 (*Chem. Abstr.* 80 (1974) No. 100705).
- [7] R.C. Kapoor, B.S. Aggrawal, *Indian J. Chem.* 11 (1973) 71; R.C. Kapoor, B.S. Aggrawal, *J. Indian, Chem. Soc.* 51 (1974) 137.
- [8] R.C. Courtney, R.L. Gustafson, S. Chaberek Jr., A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 2121.
- [9] K. Dev, R. Pathak, G.N. Rao, *Talanta* 48 (1999) 579.
- [10] Y. Inomata, T. Takei, F.S. Howell, *Inorg. Chim. Acta* 318 (2001) 201.
- [11] A. Messimeri, C.P. Raptoulou, V. Nastopoulos, A. Terzis, S.P. Perlepes, C. Papadimitriou, *Inorg. Chim. Acta* 336 (2002) 8.
- [12] (a) Recent reviews: H.-J. Schneider, A.K. Yatsimirsky, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, New York, Basel, 2003, p. 369; S.J. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 201; M. Komiyama, N. Takeda, H. Shigekawa, *Chem. Commun.* (1999) 1443; R. Ott, R. Kramer, *Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 761; R. Kramer, *Coord. Chem. Rev.* 182 (1999) 243; E.L. Hegg, J.N. Burstyn, *Coord. Chem. Rev.* 173 (1998) 133.
- [13] S.A. Li, D.X. Yang, D.F. Li, J. Huang, W.X. Tang, *New J. Chem.* 26 (2002) 1831; D.X. Yang, S.A. Li, D.F. Li, J. Xia, K.B. Yu, W.X. Tang, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4042 (2002).
- [14] E. Kimura, Y. Kodama, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 8304.
- [15] C. Bazzicalupi, A. Benchini, E. Berni, A. Bianchi, V. Fedi, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 4115.
- [16] J.R. Morrow, K. Aures, D. Epstein, *Chem. Commun.* (1995) 2431; L.L. Chappell, D.A. Voss, W.D. Horrocks Jr., J.R. Morrow Jr., *Inorg. Chem.* 37 (1998) 3989; K.O.A. Chin, J.R. Morrow, *Inorg. Chem.* 33 (1994) 5036.
- [17] Z. Zheng, *Chem. Commun.* (2001) 2521; R. Wang, H. Liu, M.D. Carducci, T. Jin, C. Zheng, Z. Zheng, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 2743.
- [18] F. Medrano, A. Calderón, A.K. Yatsimirsky, *Chem. Commun.* (2003) 1968.
- [19] S.J. Lyle, Md.M. Rahman, *Talanta* 10 (1963) 1177.
- [20] P. Gomez-Tagle, A.K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 3786.
- [21] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* 43 (1996) 1739.
- [22] A.K. Covington, M. Paabo, R.A. Robinson, R.G. Bates, *Anal. Chem.* 40 (1968) 700.
- [23] R.M. Smith, A.E. Martell (Eds.), *Critical Stability Constants*, vol. 4, Plenum Press, New York, 1976.
- [24] C.F. Baes Jr., R.E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, 1976.
- [25] E.N. Rizkalla, G.R. Choppin, in: K.A. Gschneider Jr., L. Eiring (Eds.), *Handbook of the Physics and Chemistry of Rare Earths*, vol. 15, Elsevier, 1991, p. 393.
- [26] R. Delgado, J.J.R. Fraústo da Silva, M.T.S. Amorim, M.F. Cabral, S. Chaves, J. Costa, *Analyt. Chim. Acta* 245 (1991) 271.

- [27] E.M. Stephens, K. Schoene, F.S. Richardson, *Inorg. Chem.* 23 (1984) 1641.
- [28] A. Roigk, R. Hettich, H.-J. Schneider, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 751.
- [29] J.R. Morrow, L.A. Buttrey, K.A. Berback, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 16.
- [30] R.A. Moss, W. Jiang, *Langmuir* 16 (2000) 49.
- [31] N.H. Williams, B. Takasaki, B.M. Wall, J. Chin, *Acc. Chem. Res.* 32 (1999) 485.
- [32] M. Kalesse, A. Loos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6 (1996) 2063.
- [33] A. Roigk, O.V. Yescheulova, Y.V. Fedorov, O.A. Fedorova, S.P. Gromov, H.-J. Schneider, *Organic Lett.* 1 (1999) 883.
- [34] M.E. Branum, L. Que Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999) 593.
- [35] T. Gunnlaugsson, R.J.H. Davies, M. Nieuwenhuyzen, C.S. Stevenson, R. Viguiet, S. Mulready, *Chem. Commun.* (2002) 2136.