



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Reactividad esterolítica de complejos metálicos de la
amino-oxima tridentada HOxAPy**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA:

José Carlos Lugo González



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dra. MARTHA ELENA SOSA TORRES
VOCAL:	Dra. NORMA ANGÉLICA MACÍAS RUVALCABA
SECRETARIO:	Dra. CLAUDIA PAOLA GÓMEZ TAGLE CHAVEZ
1er. SUPLENTE:	M. EN C. JORGE LUIS LÓPEZ ZEPEDA
2° SUPLENTE:	QFB. CAROLINA FLORES ÁVILA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 213
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor

Dra. Claudia Paola Gómez Tagle Chávez

Sustentante

José Carlos Lugo González

INDICE

1.	Resumen.....	3
2.	Introducción.....	4
3.	Antecedentes.....	6
4.	Objetivo y justificación del trabajo.....	22
4.1	Objetivos particulares y metas.....	23
5.	Material y métodos.....	24
5.1	Reactivos.....	24
5.2	Equipo.....	27
5.3	Programas.....	27
5.4	Condiciones generales de trabajo.....	27
5.5	Determinación de los valores de pK_a del ligante y sus complejos.....	28
5.6	Determinación de los valores de las constantes de formación de los complejos.....	29
5.7	Estudios Cinéticos.....	29
6.	Síntesis y caracterización.....	35
7.	Determinación de los valores de pK_a del ligante HOxAPy.....	51
8.	Constantes de formación de los complejos de HOxAPy con Cd(II) y Zn(II).....	54
9.	Reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy.....	73
10.	Reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy en presencia de cationes metálicos.....	86
11.	Reactividad esterolítica ante los ésteres de fosfato HpNPP y pNPDPP.....	104
12.	Análisis global de resultados.....	107
13.	Conclusiones.....	113
14.	Glosario.....	115
15.	Apéndice.....	116
16.	Bibliografía.....	121

Símbolos y abreviaturas

Abs	Absorbancia
A_{inf}	Valor límite de la absorbancia al tiempo infinito
HOxApy	3-(hidroximino)- <i>N</i> -(piridín-2-ilmetil)butan-2-amina
H ₂ OXDAP	dioxima derivada de la 2,6-diacetilpiridina
BDMO	Butanodiona monoxima
2-AMP	2-aminometil piridina
ϵ	Absortividad molar
IR	Infrarrojo
k	Constante de rapidez
k_{obs}	Constante de rapidez observada
k_{Ox}	Constante de oximinólisis o constante de reactividad intrínseca
k_{Ox}'	Constante de oximinólisis a un valor de pH.
k_{OH}	Constante de rapidez de hidrólisis básica
k_{corr}	$k_{obs} - k_{OH}$
k_{ML}	Constante de rapidez de hidrólisis debida al complejo ML.
K_{OH}	Constante de formación de hidroxocomplejos
nm	nanómetros
pK_a	Constante de disociación ácida
$p\text{-NF}^-$	para-nitrofenolato
$p\text{-NFA}$	para-nitrofenilacetato
$t_{1/2}$	tiempo de vida media
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino) etanolsulfónico
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1- propanosulfónico

1. Resumen

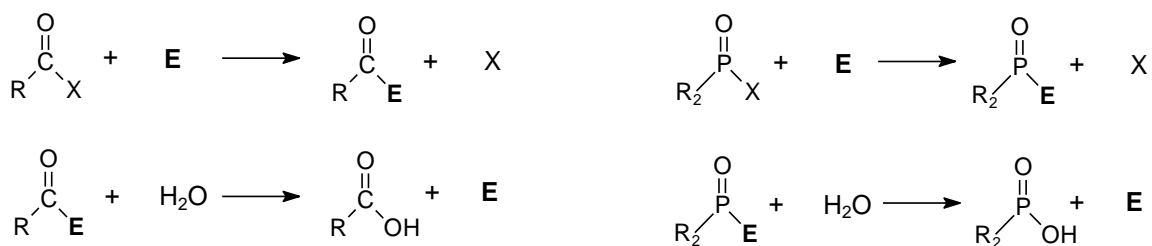
En este trabajo se sintetizó y caracterizó el ligante 3-(hidroximino)-*N*-(piridín-2-ilmetil)butan-2-amina (HOxAPy) para realizar estudios de su reactividad esterolítica frente al éster *p*-nitrofenilacetato en presencia de cationes metálicos divalentes y trivalentes (Mn(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), La(III), Y(III)) para los que se han observado efectos catalíticos de sus complejos otras oximas. Se encontró que en presencia de Mn(II) y Cu(II) no hay ningún efecto catalítico, en presencia de Ni(II), La(III) e Y(III) sí hay un efecto catalítico pequeño y en presencia de Cd(II) y Zn(II) el incremento en la reactividad esterolítica es muy grande, por encima de lo reportado en la literatura, por lo que se hicieron estudios detallados (cinéticos y de equilibrios en disolución) para estos dos cationes. En el aspecto cinético se variaron la concentración del ligante, el pH y la concentración de los cationes metálicos. En el aspecto de los equilibrios en disolución, se determinaron los valores de pK_a del ligante mediante espectrofotometría UV-Vis y titulaciones potenciométricas, así como las constantes de formación de los complejos en disolución con Cd(II) y Zn(II) mediante espectrofotometría UV-Vis, titulaciones potenciométricas y RMN. A partir de las constantes de las especies presentes en disolución se hizo la especiación del ligante y sus complejos a las condiciones usadas en cinética para Cd(II) y Zn(II) y se separaron las contribuciones de las especies cinéticamente activas (OH^- , oximato libre, complejos metal-oximato). El complejo $\text{Cd}(\text{OxAPy})^+$ es el más eficiente con una constante de $12400 \pm 700 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ con efectos notables a $\text{pH} > 9$, mientras que el complejo de $\text{Zn}[(\text{OH})(\text{OxAPy})]1^+$ tiene una constante de $8700 \pm 400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pero da efectos notables a $\text{pH} 7$.

2. Introducción

Las enzimas son los catalizadores más eficientes que se conocen para diversos tipos de reacciones (nucleofílicas, electrofílicas, de óxido reducción) y la química biomimética busca imitarlas para lograr diseñar nuevos catalizadores o “enzimas artificiales”. Un punto de partida es entender cómo funcionan las enzimas para catalizar diferentes procesos y a partir de estos principios diseñar compuestos que sirvan como catalizadores en disolución acuosa a temperatura ambiente.

La hidrólisis enzimática de los derivados de los ácidos carboxílicos y fosfatos tiene algunos principios iguales a los de otras enzimas: primero, las enzimas se asocian a sus sustratos y posteriormente usan la acción de dos o más grupos funcionales estratégicamente localizados para lograr la hidrólisis de un sustrato de manera selectiva y catalítica; vale la pena mencionar que muchas enzimas hidrolíticas tienen un catión metálico en su sitio activo.

En el paso de la hidrólisis se han propuesto dos mecanismos enzimáticos diferentes (Fersht 1977). El primero, observado en enzimas como la fosfatasa alcalina, incluye una etapa en la que se forma un intermediario con la enzima (E) por transferencia de un grupo carboxilato o fosfato a un grupo nucleofílico de la enzima (usualmente un grupo OH de serina) y una segunda etapa en la que se hidroliza esta enzima acilada o fosforilada (esquema 1.1). El segundo mecanismo, observado en enzimas como la nucleasa de estafilococos y la carboxipeptidasa A, incluye un ataque nucleofílico de una molécula de agua coordinada con el metal (que se desprotona a bajo pH), hacia el sustrato que previamente se asocia con la enzima en forma de un complejo no-covalente.



Esquema 1.1. Mecanismos de hidrólisis vía formación de la acil o fosforil enzima.

Buscando imitar estos mecanismos, encontramos que en los sistemas químicos la asociación se puede lograr mediante la formación de pares iónicos, coordinación con cationes metálicos, coordinación tipo ácido-base de Lewis, enlaces de hidrógeno en disolventes no acuosos o en sus mezclas acuosas, etc. Por su parte la reactividad de una enzima hidrolítica se puede imitar empleando diversos nucleófilos mientras que en las enzimas naturales generalmente son grupos OH^- generados a partir de una molécula de agua o el grupo R-OH de serina; en este trabajo se busca emplear aniones oximato como nucleófilos para mimetizar el funcionamiento de una enzima.

3. Antecedentes

El grupo funcional oxima ($>C=N-OH$) está constituido por un nitrógeno unido mediante doble enlace a un carbono y por un grupo hidroxilo unido al nitrógeno; su nombre se deriva de la contracción de *oxi* e *imina*, [Mehotra 1987]. Las oximas pueden sintetizarse por condensación en medio acuoso de un aldehído o cetona con hidroxilamina, aunque existen diversos métodos para su obtención [Sandler 1972]. En los casos en que se utiliza hidroxilamina, debido a su inestabilidad y carácter higroscópico, generalmente se emplea como clorhidrato, liberando la forma básica con una base.

Debido a las características estructurales mencionadas es evidente que las oximas poseen dos sitios donadores y por lo tanto presentan diferentes formas de coordinación (en cuanto a geometría y posiciones), debido a su carácter bidentado. Sin embargo una revisión de sus complejos reportados en la literatura, que se remontan hasta el año 1925 [Barker 1925], muestra que el átomo enlazante en la mayoría de sus complejos es el nitrógeno [Chakravorty 1974, Kenley 1984] aunque existen excepciones [Hutton 1983]. Actualmente se conoce gran diversidad de compuestos de coordinación formados con oximas sustituidas y metales de transición. En la figura 3.1 se muestran algunas de las posibilidades de coordinación de las oximas con cationes metálicos de transición.

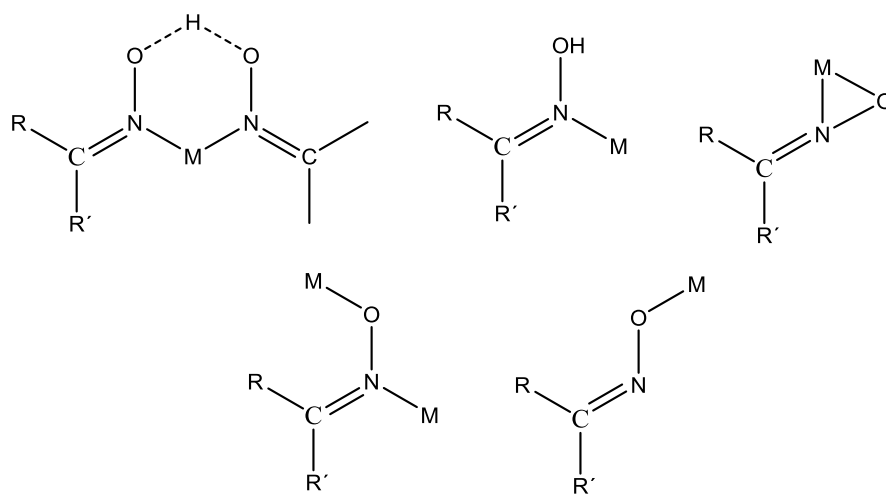


Figura 3.1 Diferentes formas de interacción entre el grupo oxima y cationes metálicos de transición

La acidez del grupo hidroxilo de las oximas está en función de los grupos sustituyentes y se ha encontrado que cuando el nitrógeno del grupo se encuentra coordinado a iones metálicos se modifica la química ácido-base de las oximas [Breslow 1965], observándose un gran aumento de la acidez al favorecer la formación del oximato, que es la base conjugada de las oximas.

En cuanto a su reactividad, de manera general las oximas actúan como nucleófilos, ya sea por el átomo de oxígeno u nitrógeno, sin embargo su reactividad nucleofílica es mayor que la de otro tipo de nucleófilos que también poseen oxígeno como átomo donador; a este fenómeno de alta reactividad se le ha nombrado como el efecto α y a los nucleófilos que lo exhiben se les conoce como α -nucleófilos. Una característica común entre estos α -nucleófilos es que poseen un par de electrones no compartidos en posición α , es decir, inmediatamente adyacentes a un centro nucleofílico. La hidracina, la hidroxilamina, los aniones hipoclorito, los ácidos hidroxámicos, las oximas, los hidroperóxidos, el nitrito y el sulfito son ejemplos de α -nucleófilos, figura 3.2.

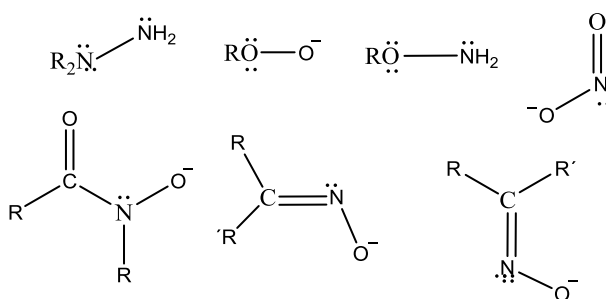


Figura 3.2. Ejemplos de grupos que se comportan como α -nucleófilos

Esta gran reactividad se puede analizar si se compara el logaritmo de la constante de rapidez con el pK_a de varios nucleófilos. En términos generales se esperaría que mientras más básica es una especie, sea mejor nucleófilo, y esto es cierto para muchos nucleófilos. Cuantitativamente, esto se expresa mediante, la ecuación de Brønsted, que correlaciona empíricamente la reactividad con la basicidad de la especie nucleofílica. La ecuación de Brønsted es la siguiente:

$$\log k = \beta pK_a + A$$

En donde:

k = es la constante de rapidez de una reacción de sustitución nucleofílica

pK_a = constante de acidez del ácido conjugado del nucleófilo

A = ordenada al origen

β = pendiente de la recta, considerada como un parámetro que relaciona la basicidad del nucleófilo con su reactividad.

Por lo tanto, si se grafica el logaritmo de la constante de rapidez en función del pK_a de su ácido conjugado (coordenadas de Brønsted), generalmente se observa este comportamiento lineal para nucleófilos del mismo tipo; el valor de la pendiente se ha interpretado como una medida de la afinidad relativa del nucleófilo hacia el sustrato en el estado de transición, dicha afinidad es la comparación de $\log k_{obs}$ con el pK_a del nucleófilo, es decir, la afinidad del nucleófilo hacia el sustrato comparada con la afinidad del nucleófilo hacia el protón. Un valor de $\beta = 1$ indica una interacción del sustrato con el nucleófilo de carácter principalmente electrostática en el estado de transición, implicando un mecanismo de tipo base general; $\beta = 1$ implica que la etapa limitante de la rapidez de reacción no incluye al nucleófilo o que existen factores capaces de compensar la nucleofilia y la basicidad del nucleófilo.

Algunos aniones nucleofílicos muy básicos salen de esta correlación lineal y dan una desviación positiva; dicha desviación es un efecto cinético comúnmente asociado a mayores constantes de rapidez que las esperadas para otros nucleófilos cuyos valores de pK_a sean semejantes. También se ha observado que los α -nucleófilos muestran una tendencia de “nivelación” después de determinado valor de pK_a , de este modo un incremento en la basicidad no se refleja en un aumento de la reactividad; este efecto se ha relacionado con los efectos de solvatación para especies nucleofílicas muy básicas [Terrier 1991,1988, Jencks 1982, Ik-Hwan Um 2001, Buncl 2002] ya que deben desolvatarse para poder realizar el ataque nucleofílico y si son más básicas es más difícil la desolvatación. Vale la pena mencionar que en las enzimas esta desolvatación sucede en la cavidad protéica en donde está el sitio activo.

Esta correlación puede racionalizarse pensando que una reacción nucleofílica, al involucrar la donación de electrones de un nucleófilo a un sustrato, implica la formación parcial de un enlace con el sustrato en el estado de transición, de esta manera la reactividad puede ser relativamente anticipada comparando la energía libre de la donación del par electrónico y la energía libre involucrada en la formación del estado de transición.

El primer intento para explicar el fenómeno de la reactividad de los α -nucleófilos fue argumentar un incremento de la densidad electrónica del átomo nucleofílico [Jencks 1969], sin embargo este aumento se muestra sólo en la reactividad y no en la basicidad del nucleófilo. Una explicación más detallada implica considerar una interacción tipo π , entre el orbital π_{CO} del sustrato y el orbital π_{CN} de la oxima [Guillot-Edlheit 1978]. También se ha sugerido un aumento de la energía del orbital HOMO debido al par de electrones libres pertenecientes al átomo de nitrógeno y adyacentes al centro nucleofílico (oxígeno), favoreciendo así las interacciones blando-blando asociadas a estados de transición, que en el caso de ataques nucleofílicos están desplazados hacia los reactivos [Fillippini 1972]. Otras consideraciones desarrolladas para explicar el origen del efecto α incluyen la desestabilización del reactivo a través de la repulsión electrónica entre los pares de electrones no enlazantes en la posición α , la estabilización del estado de transición, la estabilización del producto α , el efecto del disolvente y un estado de transición con carácter aromático o radical. Sin embargo, ninguno de estos factores de forma aislada es responsable del fenómeno denominado efecto α , y se puede decir que la correlación empírica es la suma de varios factores.

De manera general para las piridín oximas aromáticas se ha observado mediante las coordenadas de Brønsted la nivelación de su reactividad. Uno de los estudios que pone de relieve dicha tendencia es el de Hoz y Bunzel [Hoz 1985] quienes reportaron un decremento en el efecto α cuando la basicidad de las oximas es muy grande: la reactividad nucleofílica para oximas muy básicas deja de incrementar con el aumento de su pK_a a partir de un valor límite. Para ilustrar esta situación, se muestran a continuación los valores de pK_a para algunas oximas y

las constantes de rapidez, k_{Ox} ($M^{-1}s^{-1}$) de sus aniones oximato (tabla 3.1 y gráfica 3.3.a). Las estructuras correspondientes se muestran en la figura 3.3.b.

Tabla 3.1 Valores de pK_a y constantes de velocidad de esterólisis del *p*-NFA a 25°C para iones oximato libres

	Oxima	$k_{Ox} M^{-1} s^{-1}$	pK_a	Referencia
1	3-dimetilsulfonio-MINA	2.4	6.54	Degorre 1988
2	HI-6	11.8	7.13	Terrier 1991
3	2-PAM	25	7.75	Terrier 1991
4	4-PAM	61	8.27	Terrier 1991
5	Salicilaldoxima	53.3	9.2	Jencks 1960
6	6-[(metilamino)metil]picolinaldehído oxima	71	9.9	Mancin 2000
7	4-piridín aldoxima (4-PAO)	63.3	9.98	Meyer 1981
8	2-piridín-aldoxima (2-PAO)	77.2 ^c 45 ^f	3.56 ^e 9.9 ^a , 10.18 ^b , 10.04 ^c , 10.22 ^d	^{a,b} Martell 1989 ^c Breslow 1965 ^d Hannania 1962 ^e Pinart 1974 ^f Mancin 2000
9	2-piridín-acetoxima (2-PAcO)		10.8	Suh 1984
10	2,6 dialdehido piridín dioxima		2.18 ^g 10.54 ^g , 9.91 ^g , 10.88 ^h	^g Pinart 1974 ^h Hannania 1962
11	6-[(Metilamino)metil]-2-[1-hidroximino)etil]piridina	45	11.1	Mancin 2000
12	Acetofenona oxima	42.3	11.45	Yatsimirsky 1992
13	Acetoxima	61.7	12.14	Jenck 1960

pK_a N piridín

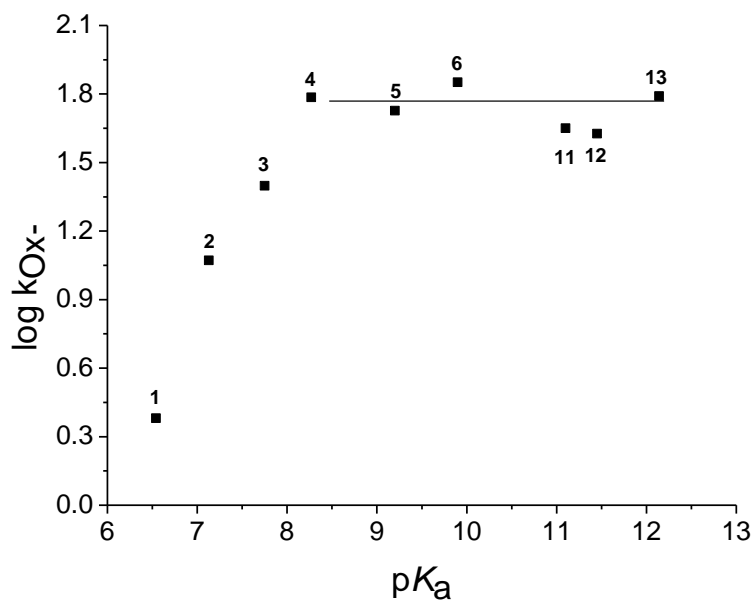


Figura 3.3.a. Gráfica $\log k_{Ox}$ en función del pK_a para aniones oximato de la tabla 3.1. La línea horizontal indica la nivelación en la reactividad. Los valores de $\log k_{Ox}$ y pK_a se encuentran citados en la tabla 3.1.

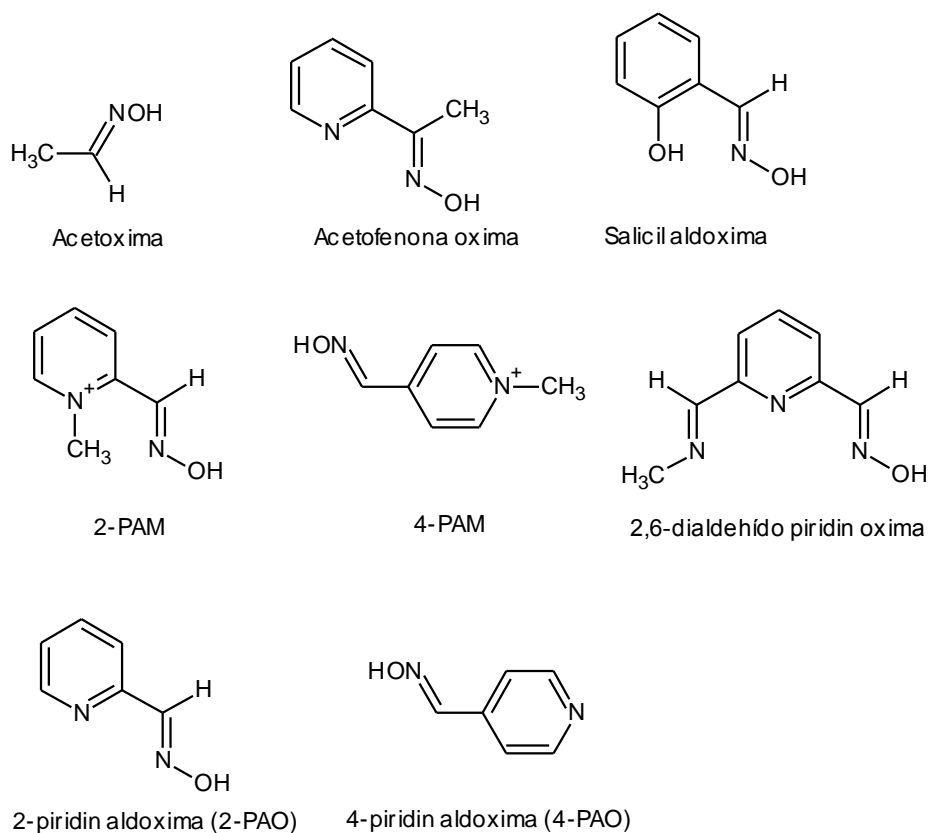


Figura 3.3b. Estructuras de las oximas citadas en la tabla 3.1

De los anteriores valores de constantes de rapidez y pK_a es posible notar el efecto de nivelación en la reactividad nucleofílica en disolución acuosa para algunas oximas aromáticas con valores de $pK_a > 8.0 - 8.5$, esto se observa mejor en las coordenadas de Brønsted $\log k_{Ox} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs pK_a , figura 3.3.a. Dicho efecto de nivelación se ha atribuido a la solvatación del nucleófilo oximato [Terrier 1988], y posibilita que este tipo de oximas puedan ser “activadas” al coordinarse con iones metálicos, para de esa manera disminuir su pK_a y exhibir una mayor reactividad nucleofílica a valores menores de pH.

Las oximas de pK_a grandes, 10 - 13, exhiben una baja reactividad nucleofílica a valores de pH cercanos al fisiológico, debido a que la fracción desprotonada a dichos valores de pH es baja y por lo tanto la concentración de la especie nucleofílica también lo es. Debido a ello es razonable pensar en la introducción de grupos funcionales electroattractores en las oximas para estabilizar la carga negativa del oximato y en consecuencia obtener un valor de pK_a menor; no obstante esta alternativa resulta muy costosa.

Otra forma de disminuir el valor de pK_a de las oximas más básicas es por coordinación con cationes metálicos, siendo una posibilidad muy interesante y se podría lograr un aumento de la reactividad nucleofílica a valores de pH cercanos al fisiológico como resultado de la disminución del pK_a de las oximas coordinadas. Sin embargo, también es previsible que la elevada reactividad de las oximas puede perderse, ya que al coordinarse el átomo de nitrógeno, los electrones en posición alfa al sitio nucleofílico ya no se encuentran disponibles para producir los efectos que se han señalado como causantes del efecto α .

Comparado con la diversidad de compuestos de coordinación que involucran oximas, se conoce relativamente poco sobre la reactividad nucleofílica de las oximas coordinadas, que podrían ser utilizadas por sus propiedades como catalizadores eficientes de la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos y fosfatos en condiciones fisiológicas. Finalmente, los estudios de reactividad de las oximas resultan de interés debido a que se conoce muy poco sobre la reactividad de los iones oximato coordinados.

Es importante señalar que el régimen catalítico que se observa para los aniones oximato como nucleófilos hacia el éster *p*-NFA incluye dos etapas esquematizadas en la figura 3.4, en las que la constante de velocidad k_1 es la etapa en la que sucede el ataque del nucleófilo y k_2 la etapa en la que sucede propiamente la hidrólisis del intermediario acilado. Si se trabaja en condiciones de exceso de sustrato, cuando $k_1 \gg k_2$, se observan curvas cinéticas con un “initial burst” que corresponde a un estado pre-estacionario seguida de una etapa de hidrólisis más lenta, este caso es el más común para las oximas; si se trabaja en condiciones de exceso de nucleófilo no se observan estas dos etapas ya que se libera todo el nitrofenol de la etapa 1 y hay más nucleófilo presente en la disolución, por lo que las curvas cinéticas son de pseudoprimer orden. Por otro lado, si se trabaja en condiciones con exceso de nucleófilo o con exceso de sustrato y $k_2 \gg k_1$ no se observa este “initial burst” porque la desacilación es tan rápida que todo el nucleófilo está siempre disponible para realizar un nuevo ataque nucleofílico y las curvas cinéticas tienen la forma de pseudoprimer orden.

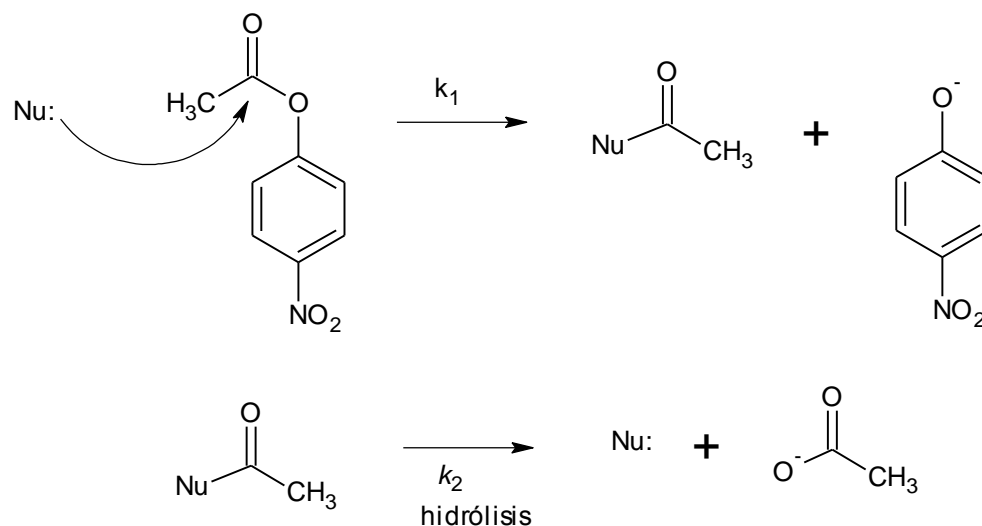


Figura 3.4. La rápida desacilación del intermediario en el mecanismo propuesto para la hidrólisis del *p*-NFA es clave para entender el régimen catalítico e implica que $k_2 \gg k_1$. [Suh 1981, Suh 1992]

El mecanismo general para la esterólisis con oximas coordinadas es similar al de las oximas libres, sucede primero el ataque nucleofílico del grupo oximato sobre el carbonilo del éster formando un intermediario O sustituido y después se hidroliza este intermediario. En el caso del éster *p*-nitrofenilacetato (*p*-NFA), las velocidades

del ataque nucleofílico y de desacilación, dependen fuertemente del tipo de oxima de que se trate y de la naturaleza del metal que forma el complejo oximato.

Los complejos de la 2-piridínaldoxima y 2-acetilpiridínoxima con Cu(II) y Zn(II) fueron estudiados por primera vez en el grupo de Breslow [Breslow 1965] quien observó que ambos cationes acidifican el grupo oximato y observaron que el compuesto de Zn(II) era mucho más reactivo; posteriormente, Suh y colaboradores [Suh 1981, Suh 1992] mostraron que en el caso del complejo de Cu(II) el pK_a de la oxima disminuye tanto que el oximato coordinado deja de ser un buen nucleófilo y la etapa limitante de la velocidad es el ataque nucleofílico; por otro lado, en el caso del complejo con Zn(II) encontraron que se acidifica menos y el grupo oximato retiene su reactividad como nucleófilo, con lo que la etapa limitante de la velocidad es la hidrólisis del intermediario O-acilado (figura 3.5).

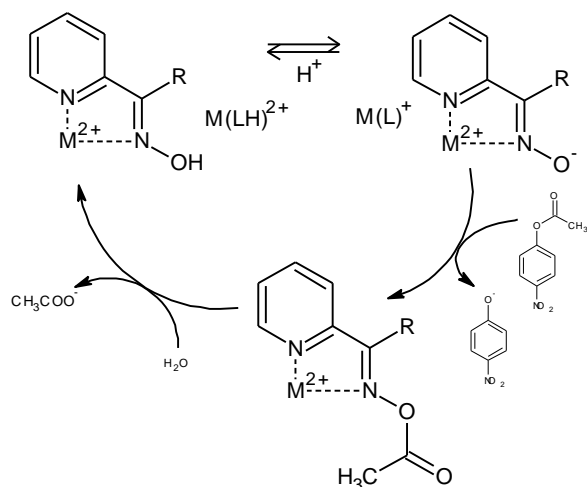
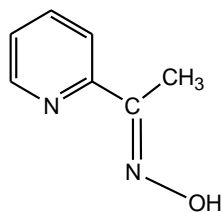


Figura 3.5. Esquema del mecanismo de ruptura de ésteres carboxílicos para complejos de la 2-acetilpiridínoxima, en donde $M(LH)^{2+}$ es el complejo protonado y $M(L)^+$ es el complejo desprotonado.

Si se compara la reactividad de la piridíncetoxima ($R = CH_3$) y de la piridínaldoxima ($R = H$), se observa que la reactividad del anión oximato es mayor en el caso de la aldoxima. Sin embargo, esto se invierte en el caso de sus complejos con Cu(II) y Zn(II), la presencia del grupo metilo en el compuesto incrementa la constante de formación para los complejos de coordinación y también se observa mayor reactividad. En la figura 3.6 se resumen los resultados los complejos de zinc y cobre con la 2-acetilpiridínoxima y 2-piridínaldoxima.



2-acetilpiridínoxima

$$pK_{a\text{ LH}} = 10.8$$

$$pK_{a\text{ ZnLH}} = 7.0$$

$$pK_{a\text{ CuLH}} = 3.5$$

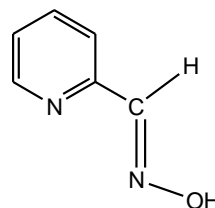
$$K_{\text{Zn(LH)}^{2+}} = 420\text{ M}^{-1}$$

$$K_{\text{Cu(LH)}^{2+}} = 79400\text{ M}^{-1}$$

$$k_{(\text{L}^-)} = 22\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{ZnL}^+)} = 400\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{CuL}^+)} = 0.2\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$



2-piridíaldoxima

$$pK_{a\text{ LH}} = 10.0$$

$$pK_{a\text{ ZnLH}} = 6.5$$

$$pK_{a\text{ CuLH}} = 3.2$$

$$K_{\text{Zn(LH)}^{2+}} = 150\text{ M}^{-1}$$

$$K_{\text{Cu(LH)}^{2+}} = 50100\text{ M}^{-1}$$

$$k_{(\text{L}^-)} = 45\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{ZnL}^+)} = 10\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

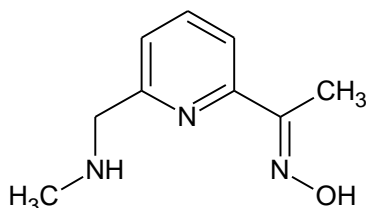
$$k_{(\text{CuL}^+)} \text{ n.d.}$$

Figura 3.6. Constantes de acidez (pK_a) y constantes de rapidez de esterólisis de p -NFA (k) para los aniones oximato de la 2-piridinaldoxima y la 2-acetilpiridinoxima, y de sus complejos con Cu(II) y Zn(II) [Suh 1984, Breslow 1965, Mancin 2000].

De aquí se puede ver, primero, que los complejos con la cetoxima son más estables que con la aldoxima, por ejemplo en el caso de Zn(II) las constantes de formación son 3 veces mayores para la cetoxima ($K_{\text{Zn(LH)}^{2+}} = 420\text{ M}^{-1}$ y $K_{\text{Zn(LH)}^{2+}} = 150\text{ M}^{-1}$). Segundo, esta diferencia en reactividad no puede atribuirse a una diferencia en el valor de pK_a de los complejos puesto que no son muy diferentes para el mismo catión metálico. Tercero, la rapidez de esterólisis es mucho mayor para los complejos con las cetoximas, en el caso del complejos de Zn(II) es 40 veces mayor. Además, se puede notar comparando los respectivos complejos de Cu(II) y Zn(II) que los de Cu(II) son mucho más estables pero la oxima se acidifica demasiado (pK_a 3.5 y 3.2) dando como resultado una pérdida importante en la reactividad nucleofílica.

Otros complejos similares con actividad esterolítica fueron reportados por el grupo de Tonellato [Mancin 2000] empleando el ligante de la figura 3.7, que es un derivado de la 2-acetilpiridinoxima en la que se introduce un grupo amino en la

posición 6. En comparación con la 2-acetilpiridinoxima, este grupo incrementa la estabilidad de los complejos con Cu(II), Ni(II) y Zn(II) por un orden de magnitud, duplica la reactividad del anión oximato, pero disminuye más de 50 veces la reactividad del complejo con Zn(II).



$pK_{a\text{ LH}} = 11.1$		$k_{\text{L}}^- = 45 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$pK_{a\text{ ZnLH}} = 7.8$	$\log K_{\text{Zn(L)}}^+ = 3.2$	$k_{\text{ZnL}}^+ = 7.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$pK_{a\text{ NiLH}} = 6.9$	$\log K_{\text{Ni(L)}}^+ = 6.0$	$k_{\text{NiL}}^+ = 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$pK_{a\text{ CuLH}} = 4.4$	$\log K_{\text{Cu(L)}}^+ > 7$	n.d.

Figura 3.7. Constantes de acidez (pK_a), constantes de formación de los complejos (K_{ML}^+) y constantes de rapidez de esterólisis de *p*-NFA (k) para los aniones oximato del ligante mostrado y de sus complejos con Cu(II) y Zn(II) [Mancin 2000].

Terrier y colaboradores [Terrier 1991] reportaron la reactividad “anómala” de algunos aniones piridinio-carboxaldoximato con valores de pK_a entre 7.13 y 9.0 frente a *p*-NFA. En su trabajo muestran la nivelación de la nucleofilia de estos aniones oximato aromáticos, alcanzada a un valor de pK_a cercano a 8. De sus resultados, comparados con la reactividad previamente reportada para iones oximato más básicos y estructuralmente diferentes, sugieren que este efecto de saturación es característico de la funcionalidad oximato, esto es, la mayoría de los iones de pK_a mayor a 8.0-8.5 son objeto de un efecto de nivelación en su reactividad en disolución acuosa.

Un estudio de importancia en lo concerniente a la explicación del mecanismo de reacción de esterólisis por oximatos activados fue el reporte de la eficacia catalítica de oximas del tipo ortopaladato aril oximas en reacciones de esterólisis,

donde el ion metálico está unido covalentemente al grupo arilo como se muestra en la figura 3.8 [Yatsimirsky, 1992].

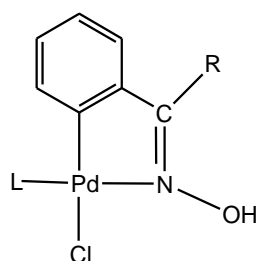


Figura 3.8. Pd^{II}-2-acetofeniloxima

Estas ortopaladato aril oximas son capaces de coordinar agua en disolución acuosa (por sustitución del cloruro en la figura 3.4) y disminuir el pK_a del agua. En la hidrólisis de éster *p*-NFA en presencia de estos complejos se observa que el intermediario O acilado se hidroliza muy rápidamente por un ataque intramolecular del OH⁻ coordinado al catión Pd(II) (generado a partir de la desprotonación de la molécula de agua coordinada), sin embargo, debido a la gran electrofilia del catión Pd(II), el grupo oximato coordinado resulta ser poco básico para el ataque nucleofílico en la primera etapa de la ruptura del éster, por lo que, aunque el proceso es catalítico, las constantes de velocidad observadas son pequeñas por la baja nucleofilia del anión oximato unido al Pd(II).

De los sistemas anteriores se debe subrayar que para tener un complejo eficiente en la hidrólisis de ésteres que opere de modo catalítico es necesario que sean rápidas ambas etapas: la del ataque nucleofílico y la de desacilación, y esto implica que los complejos sean estables pero que la coordinación del grupo oximato le permita retener su reactividad como nucleófilo alfa. Esto, como hemos visto, puede ser regulado con diferentes cationes metálicos.

En nuestro grupo de trabajo fue logrado un avance muy importante estudiando una serie de complejos de la dioxima derivada de la 2,6-diacetilpiridina (H₂OXDAP) con metales divalentes (Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, figura 3.9) para los cuales se observa una buena reactividad en la ruptura del éster y una segunda

etapa de desacilación muy rápida, con lo cual se logra cerrar un ciclo catalítico [Yatsimirsky 1998]. Las constantes de segundo orden son, para Zn(II) del orden de lo esperado pues tiene un pK_a de 6.0 y constante de $53 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, es decir su pK_a es una unidad menor que el complejo de Zn(II) de la 2-acetilpiridinoxima y la reactividad 10 veces menor, y para los cationes divalentes Pb, Mn y Cd es mucho mayor, sobrepasando en estos tres casos la reactividad para el anión oximato libre, que en principio sería la reactividad máxima que se esperaría aunque a un pH menor (figura 3.5). Este aspecto es muy importante porque una contribución importante al efecto alfa de un nucleófilo está dada por el par de electrones adyacentes al sitio nucleofílico, y no se observa que la constante de velocidad disminuya (respecto a la del anión oximato libre) cuando este par de electrones está en un enlace de coordinación con un catión metálico. Una explicación que se dio a esta gran reactividad fue la participación de una molécula de agua coordinada al catión metálico; esta molécula de agua se desprotona y genera un OH^- que funciona como nucleófilo intramolecular dando asistencia para la posterior hidrólisis del oximato acilado.

Otro aspecto importante es que los complejos operan en una forma catalítica, regenerando el anión oximato, es decir, la velocidad de desacilación también es rápida. La figura 3.10 muestra el mecanismo propuesto en su generalización para los complejos catalíticos de la oxima OXDAP.

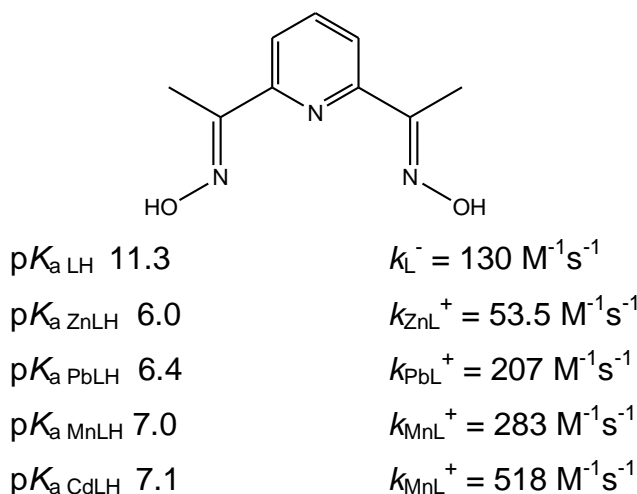


Figura 3.9. Constantes de acidez (pK_a), y constantes de rapidez de esterólisis de *p*-NFA (k) para los complejos oximato de H_2OXDAP [Yatsimirsky 1998].

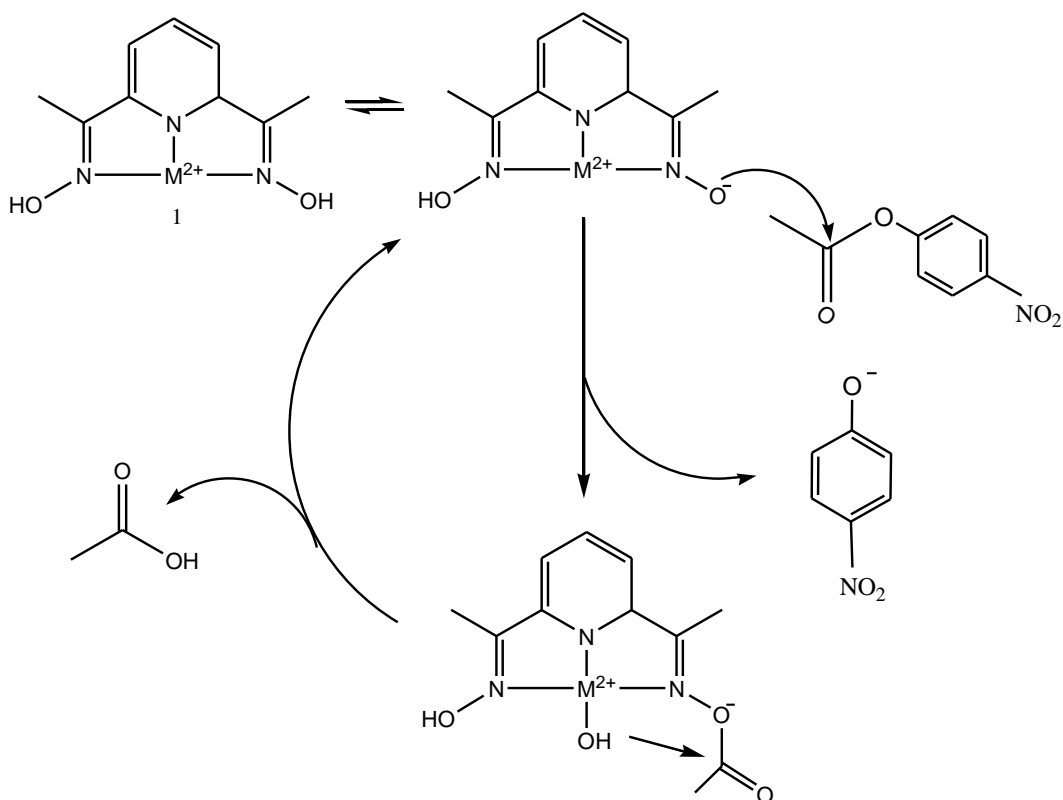


Figura 3.10. Mecanismo propuesto para la esterólisis del *p*-NFA para los complejos de OXDAP [Yatsimirsky 1998].

Entre las características importantes de estos sistemas es que el ligante (H_2OXDAP) es tridentado y los complejos que forma son bastante estables, no se observa la precipitación de los hidróxidos de los cationes metálicos y permite que quede al menos una posición de coordinación libre para una molécula de agua. Este motivo se encuentra en muchas metaloenzimas de $Zn(II)$ [Vallee 1993].

Sin embargo, estos complejos tienen algunas desventajas: el ligante es poco soluble en agua, lo cual obstaculiza llevar a cabo estudios potenciométricos detallados para establecer la especiación mediante los equilibrios de las especies en disolución para estos sistemas y por otro lado, los complejos 1:1 metal:ligante tienden a formar especies diméricas inactivas, limitando también los intervalos de concentraciones en que pueden ser estudiados.

Otro sistema estudiado en nuestro grupo es el formado por la 2,3-butanodiona monoxima (HBDMO) y sus complejos con $La(III)$, se muestra en la figura 3.11.

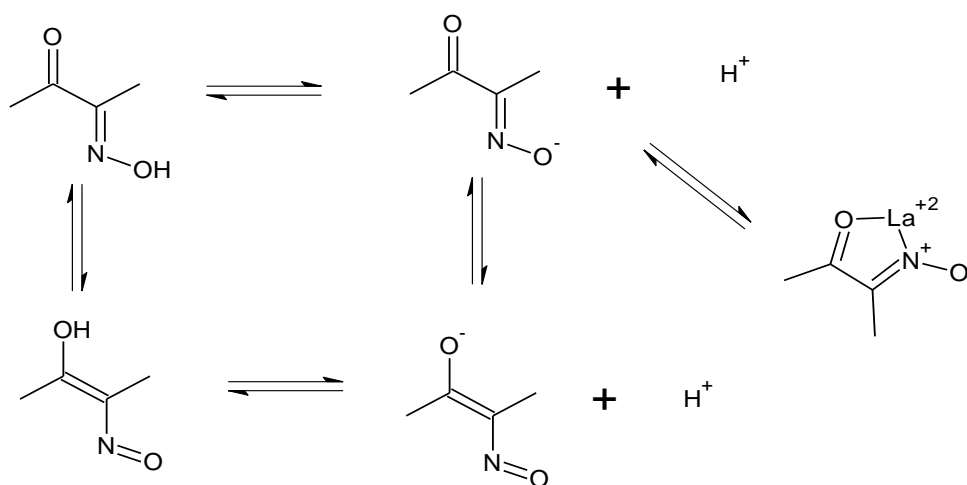
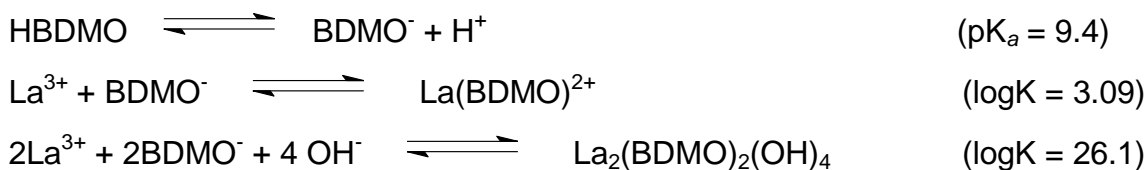


Figura 3.11. Sistema formado por el ligante HBDMO en presencia de La (III), [Gómez Tagle, Tesis doctoral, 2001].

Los valores de las constantes de acidez de la HBDMO y de formación de sus complejos con La (III) son los siguientes:



El complejo $\text{La}(\text{BDMO})^{2+}$ presenta reactividad esterolítica, pero como su valor de la constante de formación es relativamente bajo y se forma también el complejo neutro $\text{La}_2(\text{HBDMO})_2(\text{OH})_4$, el intervalo de concentración y pH en el que se puede estudiar la reactividad esterolítica del complejo $\text{La}(\text{BDMO})^{2+}$ es pequeño y no permite llegar a conclusiones relevantes. Un aspecto importante es que el ligante HBDMO es altamente soluble en agua y presenta posibilidades de ser modificado estructuralmente mediante condensación con alguna piridín amina aromática y así formar derivados tridentados que sean solubles en agua al mismo tiempo que conserva la funcionalidad oxima que puede tener reactividad esterolítica.

En este trabajo se propone sintetizar el ligante tridentado HOxAPy, derivado de la oxima HBDMO (figura 3.12.A), y estudiar la reactividad hacia *p*-NFA de su anión oximato y sus complejos con cationes metales divalentes y trivalentes. Una

diferencia importante con los sistemas anteriores es que el ligante es más flexible y puede adaptarse mejor a la geometría de coordinación de varios cationes metálicos; por su parte los cationes trivalentes son ácidos de Lewis más fuertes que los cationes divalentes y pueden dar un efecto catalítico diferente. Este ligante resulta interesante, además, porque es estructuralmente análogo a los complejos B (figura 3.12.B) y a dos derivados de piridinoximas empleados como detoxificantes clínicos, obidoxima y pralidoxima (figura 3.13).

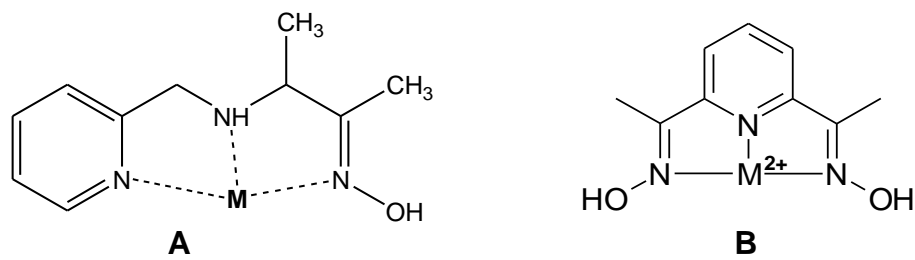


Figura 3.12. Analogía estructural de los complejos con H₂OXDAP y HOxAPy propuesto para este trabajo.

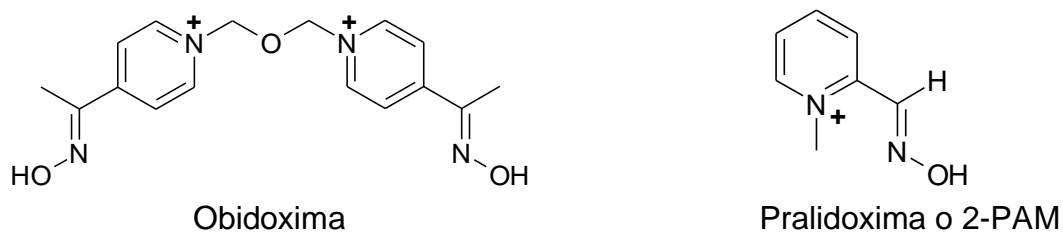


Figura 3.13. Agentes detoxificantes clínicos.

Si bien el ligante HOxAPy aquí propuesto para llevar a cabo este estudio no es una oxima aromática, presenta características que nos permiten pensar que puede ser un α -nucleófilo y que su reactividad esterolítica ésta puede regularse mediante su coordinación con cationes metálicos ya que posee tres posiciones de coordinación con nitrógeno (piridina, amina, oxima) espaciados entre sí por dos enlaces cada uno. Los complejos estructuralmente más cercanos son los reportados por Mancin y Tonellato [Mancin 2000], figura 3.14, ya que tiene los mismos grupos presentes con la diferencia de que los sustituyentes están en las posiciones 2 y 6 del anillo piridínico, mientras que en la HOxAPy integra el sustituyente alifático al mismo lado de la función oxima, conservando la capacidad de ser un ligante tridentado.

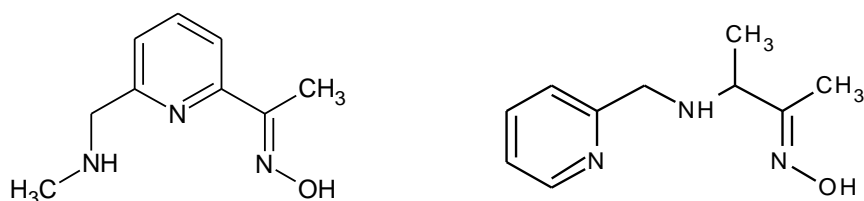


Figura 3.14 Analogías estructurales entre la oxima reportada por Mancin, 2000 y la HOxAPy.

4.0. Objetivo y justificación del trabajo

En este trabajo nos propusimos sintetizar el ligante HOxAPy que es tridentado y puede formar complejos estables con iones metálicos M(II) y M(III) del tipo $M(\text{HOxAPy})^{n+}$ y $M(\text{OxAPy})^{n+}$ en donde las posiciones de coordinación restantes para el catión metálico pueden ser ocupadas por moléculas de agua o contra iones, estudiar la reactividad esterolítica de la oxima y sus complejos con varios cationes metálicos divalentes y trivalentes en la esterólisis del *p*-NFA y, para aquellos complejos con los que se observe mayor reactividad, realizar estudios detallados tanto cinéticos como de sus equilibrios en disolución acuosa para obtener información relacionada con las especies cinéticamente activas, su concentración y su reactividad intrínseca.

Este trabajo permite contribuir a la comprensión del efecto α de complejos en disolución, tema que ha sido poco estudiado, además de contribuir al diseño de nuevos catalizadores biomiméticos que pueden tener un gran número de aplicaciones.

4.1. Objetivos particulares y metas

1. Sintetizar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas convencionales el ligante HOxAPy.
2. Estudiar la reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy en función del pH y de la concentración del ligante y determinar la constante de oximinólisis hacia el sustrato modelo *p*-nitrofenil acetato.
3. Estudiar la reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy en presencia de varios cationes metálicos divalentes (Mn(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) y Cd(II)) y trivalentes (La(III), Y(III)), para los que se han observado efectos catalíticos con otras oximas, variando tanto la concentración del catión metálico como el pH.
4. Seleccionar los cationes metálicos que resulten más eficientes en la esterólisis del *p*-NFA y para estos complejos determinar las constantes de formación con la HOxAPy mediante titulaciones: potenciométricas, por UV-visible y mediante ¹H RMN.
5. Usando las constantes de formación de los complejos y los valores de pK_a determinados hacer la especiación del anión oximato libre y los complejos para los cationes metálicos más eficientes y comparar esta especiación con las constantes de velocidad observadas.
6. Usando la distribución de las especies, determinar cuáles son las especies cinéticamente activas, calcular la concentración de éstas y determinar las constantes de velocidad de segundo orden para cada especie cinéticamente activa.
7. Comparar la reactividad nucleofílica del ligante libre y el ligante coordinado con diferentes cationes metálicos.

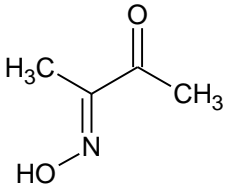
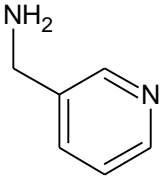
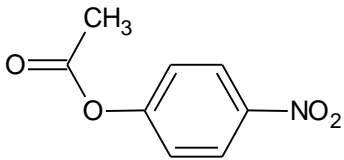
5. Material y Métodos

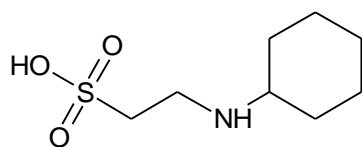
5.1. Reactivos

Para los experimentos se utilizó agua desionizada con resistividad de 18 ± 0.1 M Ω -cm obtenida de agua destilada con el equipo Nanopure Barnstead.

Se presenta a continuación la tabla donde se encuentran los reactivos usados en el desarrollo de este trabajo junto con sus datos más relevantes.

Tabla 5.1 Estructuras y características principales de los reactivos utilizados.

	2,3-butanodiona-monoxima (BDMO) Aldrich (98%) Masa molar = 101.10 g/mol
	2-aminometilpiridina (2-AMP) Aldrich (97%) Masa molar = 118.14 g/mol
NaBH ₄	Borohidruro de sodio Aldrich (97%) Masa molar = 37.87 g/mol
	p-Nitrofenil acetato (p-NFA) Fluka ($\geq 99.0\%$) Masa molar = 181.14 g/mol



CHES

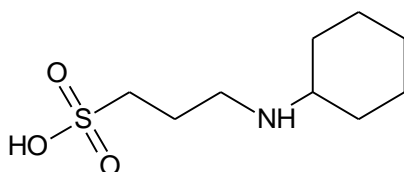
Ácido 2-(ciclohexilamino)
etanolsulfónico

Sigma (99%)

Masa molar = 207.09 g/mol

pK_a = 9.30 en medio acuoso a 25°C

Intervalo de pH: 8.6 a 10



CAPS

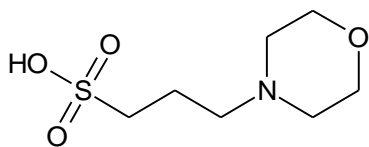
Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-
propanosulfónico

Sigma (>98%)

Masa molar = 221.32 g/mol

pK_a = 10.40 en medio acuoso a 25°C

Intervalo de pH: 9.7 a 11.1



MOPS

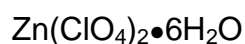
Ácido 3-[N-morfolino]
propanosulfónico

Sigma (>98%)

Masa molar = 209.30 g/mol

pK_a = 10.40 en medio acuoso a 25°C

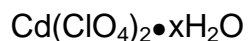
Intervalo de pH: 6.15 a 8.06



Perclorato de zinc hexahidratado

Aldrich (≥97.0%)

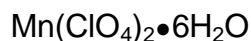
Masa molar = 372.38 g/mol



Perclorato de cadmio hidrato (~6)

Aldrich

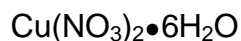
Masa molar = 311.31 g/mol anhidro



Perclorato de manganeso
hexahidratado

Fluka (≥97.0%)

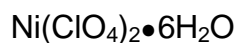
Masa molar = 419.11 g/mol



Nitrato de cobre trihidratado

Aldrich (99-104%)

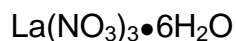
Masa molar = 241.60 g/mol



Perclorato de níquel hexahidratado

Aldrich

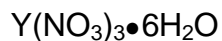
Masa molar = 365.69 g/mol



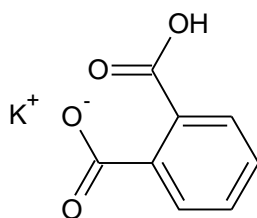
Perclorato de lantano

Aldrich (99.9%), dis. 40% peso

Masa molar = 437.26 g/mol



Nitrato de ytrio hexahidratado
Aldrich(99.8%)
Masa molar = 383.01 g/mol



Biftalato de potasio
Sigma ($\geq 99.95\%$)
Masa molar = 204.22 g/mol

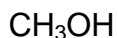


Hidróxido de sodio
Meyer ($> 97\%$)
Masa molar = 40 g/mol



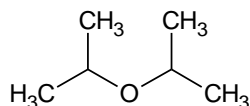
Ácido clorhídrico
J. T. Baker, % (m/m), Reactivo ACS
Densidad de 1.2 g/mL

Se emplearon los siguientes disolventes:

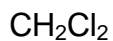


Metanol Absoluto

J. T. Baker, 99% (m/m), Reactivo ACS
Masa molar = 32.04 g/mol



Eter isopropílico
Aldrich, 99% (m/m),
Masa molar = 108.18 g/mol



Diclorometano
J. T. Baker, 99% (m/m), Reactivo ACS
Masa molar = 84.93 g/mol

5.2. Equipo

Las mediciones espectrofotométricas UV-Vis se realizaron en un equipo Hewlett Packard 8452 (con una ventana espectral de 190-1100 nm, una resolución de 1nm y una precisión de longitud de onda $< \pm 0.5$) de arreglo de diodos y sistema de control de temperatura utilizando un baño de recirculación de agua marca *Fischer Scientifics Isotemp 1016S* ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). La temperatura de las disoluciones fue verificada con un termómetro digital Digi-Thermo (± 0.1). Las celdas utilizadas fueron de cuarzo con una longitud de paso de 1 cm y un volumen de 3 mL.

Las mediciones de volumen se realizaron con micropipetas Eppendorf Research serie 2000 con volúmenes variables.

Las mediciones de pH se realizaron usando un electrodo de vidrio *Orion ROSSTM* con un potenciómetro *Orion* modelo 710A con una precisión de ± 0.005 unidades de pH, en una celda a temperatura de constante, con agitación y flujo de nitrógeno constante.

Para calibrar el potenciómetro se usaron amortiguadores estándar de referencia a 25°C , pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión de ± 0.01).

Los espectros de RMN- ^1H se realizaron en un espectrómetro Varian Gemini de 300 MHz de la Unidad de Apoyo a la investigación, Facultad de Química, UNAM.

5.3. Programas

Todos los ajustes por regresión lineal y no lineal mediante el método de mínimos cuadrados se hicieron en el programa *OriginPro 8.5.0*.

Las constantes de formación a partir de titulaciones espectrofotométricas fueron calculadas utilizando el programa *Hyperquad 2000* versión 2.1 NT.

5.4. Condiciones generales de trabajo

Disoluciones

Se hicieron disoluciones patrón del ligante HOxAPy (0.1 M en agua) y de los iones metálicos (0.1 M en agua), a partir de las cuales se hicieron las disoluciones

necesarias para cada experimento. Las disoluciones stock de los cationes metálicos se prepararon a partir de las sales, se estandarizaron mediante titulaciones complejométricas con EDTA o alizarina y se comprobó la concentración de las disoluciones de los cationes metálicos mediante su análisis por absorción atómica.

Las disoluciones stock para el sustrato, *p*-NFA (10 mM y 2 mM), se hicieron usando como disolvente DMSO, ya que es soluble en éste y se usaron volúmenes pequeños de forma que la adición de DMSO a la disolución no fuera mayor del 2% del volumen de la celda donde se corrieron las reacciones, por lo tanto las disoluciones se pueden considerar acuosas.

Temperatura

Los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25 ± 0.2 °C regulada mediante un baño recirculador con error en la temperatura de ± 0.1 °C

pH

El pH se fijó en cada uno de los experimentos realizados usando un amortiguador de mayor concentración que los reactivos, típicamente 500 veces, que se varió dependiendo de sus valores de pK_a y descartando la influencia de estos en la actividad esterolítica o de coordinación con los cationes metálicos empleados. Se utilizaron amortiguadores de tipo biológico debido a que son muy poco coordinantes, con valores de pK_a adecuados y que no presentan bandas de absorción en la región de 250 a 850 nm.

5.5. Determinación de los valores de pK_a del ligante y sus complejos

La determinación de los valores de pK_a del ligante HOxAPy se hizo mediante titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas UV-Vis.

Para potencimetría se hicieron disoluciones 1-10 mM de HOxAPy con fuerza iónica 0.1 M empleando como electrolito soporte cloruro de sodio. Las titulaciones se realizaron con disoluciones 0.1-1.0 M de hidróxido de sodio adicionando volúmenes pequeños a la disolución del ligante o ligante y catión metálico en una celda termostatada y bajo el flujo de nitrógeno.

Para el método espectrofotométrico se usaron concentraciones de HOxAPy entre 0.1 y 0.5 mM, (se realizaron mayor número de titulaciones en concentración 0.2 mM porque la absorbancia del ligante es más adecuada) y se tituló con disoluciones 0.1 M-0.5 M de NaOH adicionando volúmenes pequeños a la disolución del ligante o ligante y catión metálico en una celda termostatada y bajo el flujo de nitrógeno. Después de cada adición de titulante se registró el valor de pH de la disolución y su espectro UV-Vis.

Los valores de pK_a del grupo oxima en los complejos metálicos de ligante HOxAPy fueron obtenidos por potenciometría, formando el complejo *in situ* mediante la adición de un equivalente del catión M^{n+} a una disolución 1-10 mM del ligante y con fuerza iónica 0.1 M empleando como electrolito soporte cloruro de sodio.

5.6. Determinación de los valores de las constantes de formación de los complejos

La determinación de las constantes de formación de los complejos que resultaron cinéticamente activos se hizo mediante titulaciones espectrofotométricas con un mínimo de 50 puntos y por 1H RMN con 10-12 espectros. En este caso la disolución amortiguada a pH neutro del ligante HOxAPy se tituló con la sal del catión metálico de interés, midiendo tras cada adición el espectro UV-Vis de la disolución y monitoreando el valor fijo de pH. El sistema se mantuvo termostatado a 25°C y con flujo de nitrógeno constante.

5.7. Estudios Cinéticos

Para los estudios cinéticos realizados se utilizaron disoluciones stock 1-100 mM, dependiendo del reactivo y las condiciones deseadas, de las cuales se tomaron los volúmenes apropiados para obtener la concentración deseada de cada reactivo en la disolución y se mezclaron en las celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico. El volumen dentro de estas fue de 2.5 mL. Las celdas se mantuvieron termostatadas a 25°C.

En estas reacciones se siguió el progreso de la reacción de esterólisis empleando como sustrato el *p*-NFA. Al romperse el éster se forma el *p*-nitrofenol el cual se encuentra en equilibrio con su forma desprotonada, el anión *p*-nitrofenolato de color amarillo y que en el UV-Vis absorbe a 400 nm. En la figura 5.1.a se muestran espectros de *p*-nitrofenol en función del pH entre 5.8 y 9.3 y en la 5.1.b la curva de absorbancia a 400 nm en función del pH de donde se midió el valor de pK_a del *p*-nitrofenol en 7.17 ± 0.01 .

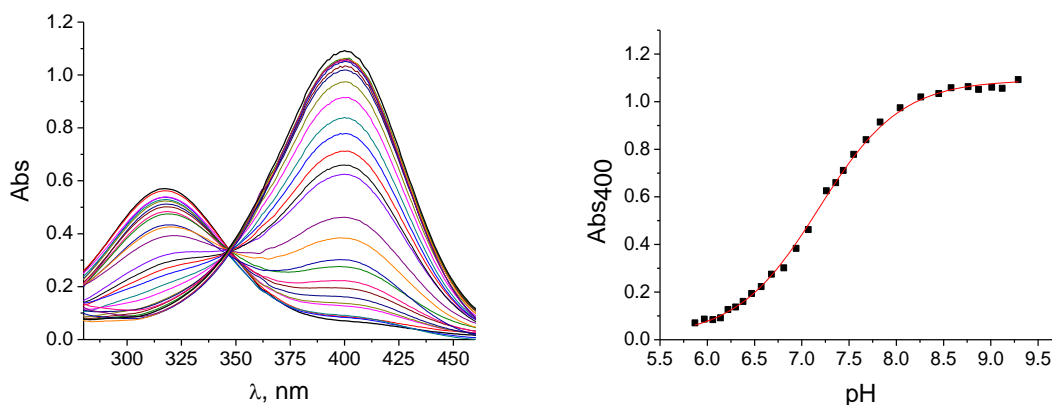


Figura 5.1. (a) Espectros de UV-vis de *p*-nitrofenol 0.06 mM en función del pH, 5.8 a 9.3 y (b) determinación del pK_a del nitrofenol a 400 nm, 7.17 ± 0.01 .

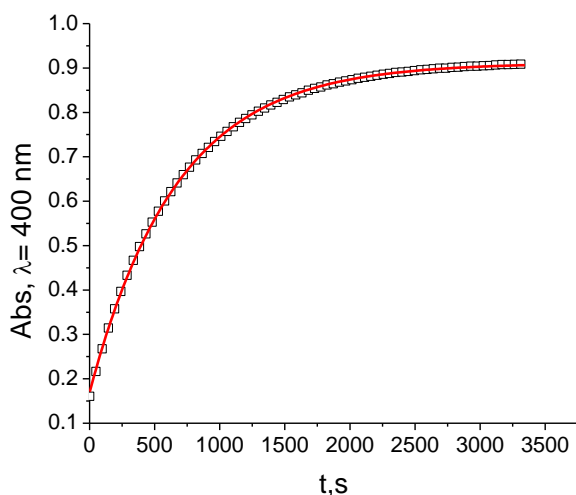
Para cada pH al que se trabajó, se determinó el coeficiente de absortividad molar para el anión *p*-nitrofenolato a partir de curvas de calibración con *p*-nitrofenol ya que la absorbancia correspondiente a la hidrólisis de todo el sustrato con la liberación de un equivalente de *p*-nitrofenol depende del pH al que se trabaja. El coeficiente de absortividad molar del producto, ϵ_{NF} , nos permite verificar la extensión de la reacción y tener los valores de absorbancia esperados cuando la hidrólisis del sustrato es completa, representados por los valores de la absorbancia al infinito, A_{inf} .

En el estudio de la reactividad esterolítica de la HOxAPy las cinéticas se llevaron a cabo, generalmente, en condiciones de pseudo-primer orden. El sustrato *p*-NFA se mantuvo a una concentración menor (típicamente 0.05 mM) que la del nucleófilo, por lo cual se puede considerar la concentración total de este último está en exceso en el transcurso de la reacción.

Las reacciones rápidas se monitorearon espectrofotométricamente hasta la conversión completa del sustrato seleccionando intervalos de tiempo que permitieran tener como mínimo 100 puntos de absorbancia a 400 nm, Abs_{400} , en función del tiempo. Las reacciones lentas se siguieron hasta un 10% de conversión buscando tener como mínimo 50 puntos de Abs_{400} en función del tiempo. Todos los datos fueron corregidos por el ruido del instrumento restando a los valores de Abs_{400} los valores de absorbancia a 550 nm, Abs_{550} , en donde no absorben ninguna de las especies presentes y por lo tanto las lecturas representan el ruido instrumental.

Las constantes de rapidez observada, k_{obs} , se calcularon a partir de los datos experimentales mediante ajustes no lineales de las curvas obtenidas usando principalmente dos métodos: método integral, velocidades iniciales.

Los datos de las reacciones rápidas monitoreadas hasta la hidrólisis completa del sustrato se analizaron ajustándolos mediante la ecuación 5.7.1 para obtener k_{obs} , la cual corresponde a una ecuación integral de primer orden (consultar Apéndice) en donde A_{400} es la absorbancia corregida a 400 nm, ΔA_{∞} , es la diferencia entre absorbancia inicial y la infinita, A_0 es la absorbancia al inicio, k_{obs} es la constante de rapidez observada y t es el tiempo. En la figura 5.7.2 se muestra un ejemplo de los ajustes realizados.



$$A^{400} = A_0 + \Delta A_{\infty}^{400} (1 - e^{-k_{obs}t})$$

Ecuación 5.7.1

Figura 5.7.2. Ejemplo del ajuste integral para una curva cinética. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.7.1.

Los datos de las reacciones lentas, cuando en el transcurso de 2-3 horas la reacción no llegaba más allá del 10% de conversión del sustrato, se analizaron por el método de la rapidez inicial para calcular k_{obs} . Los datos experimentales de las curvas cinéticas, con un máximo de 10% de conversión del sustrato, se ajustaron mediante regresiones lineales en donde la pendiente de la recta es la rapidez inicial, v_0 , y es directamente proporcional a la constante de rapidez de pseudo primer orden, ecuación 5.7.2, por esto se requiere conocer el coeficiente de absortividad molar del producto, ϵ_{NF} , a las condiciones en las que se realiza la cinética; esto también se comprobó haciendo adición de *p*-nitrofenol como estándar en la celda de reacción.

$$k_{obs} = \frac{v_0^{exp}}{\epsilon_{NF} [p - NFA]_0} \quad \text{Ecuación 5.7.2}$$

En algunos casos, cuando las reacciones eran demasiado rápidas en medio básico (al medir la reactividad esterolítica de los complejos de Cd(II) y Zn(II) con la HOxAPy) fue necesario trabajar en condiciones en las que la concentración del ligante y metal eran 0.01-0.05 mM tanto del ligante y el catión metálico, por lo que son del mismo orden que la del sustrato y entonces ya no se tiene complejo en exceso. Estas condiciones no se esperaba observar un perfil cinético de primer orden, sin embargo las curvas cinéticas ajustan muy bien a una ecuación de primer orden.

A manera de ejemplo se muestran los siguientes ajustes de datos cinéticos. El primer ejemplo es una reacción en la que se tienen concentraciones $Zn(NO_3)_2$ 7.14×10^{-6} M, HOxAPy 0.1 mM y *p*-NFA 0.055 mM a pH 7.0 y 25°C, figura 5.7.3. En estas condiciones el ligante es 2 veces más concentrado que el sustrato y el catión metálico es 7 veces menos concentrado que el sustrato, pero a pesar de esto la curva cinética obtenida se ajusta a una ecuación de pseudo-primer orden. La única razón por la que la curva cinética sigue un perfil exponencial de primer orden es que en el transcurso de la misma no se consumen el ligante y el catión metálico, es decir que la reacción sea catalítica. De esta forma, el complejo acilado se hidroliza generándose nuevamente el complejo metálico y su

concentración permanece prácticamente constante en el transcurso de la reacción.

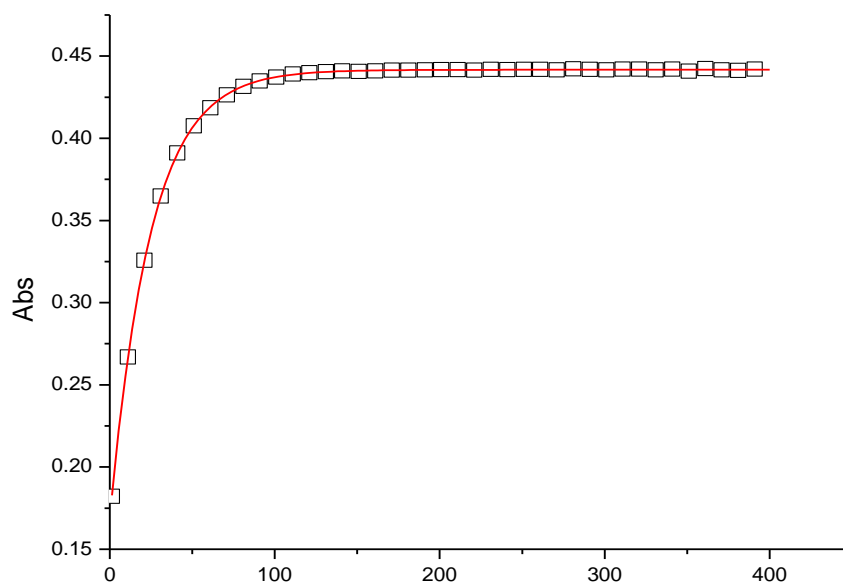


Figura 5.7.3. Curva cinética de hidrólisis de *p*-NFA. $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 7.14×10^{-6} M, HOxAPy 0.1 mM y *p*-NFA 0.055 mM, pH 7.0, 25°C. La línea continua es el ajuste a la ecuación 5.7.1, $k_{\text{obs}}=0.00362 \text{ s}^{-1}$, A_{inf} esperada 0.45 (para mayor claridad sólo se muestran 1 de cada 10 puntos experimentales).

Un segundo ejemplo es una reacción en la que se tienen concentraciones $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 M, HOxAPy 0.01 mM y *p*-NFA 0.05 mM, a pH 7.27 y 25°C, figura 5.7.4. En estas condiciones la concentración del ligante y del catión metálico es 5 veces menor que la del sustrato. Estas curvas cinéticas aparentemente se pueden ajustar a una ecuación de pseudo-primer orden, sin embargo la absorbancia final no es la esperada a este pH (debería ser cercana a 0.45) por lo que es necesario ajustar estos datos a una ecuación que contempla la suma de dos etapas: una acilación rápida (ajuste exponencial de primer orden) y una desacilación lenta (velocidad inicial) que permite que el nucleófilo quede libre para hidrolizar más sustrato y liberar más *p*-nitrofenol.

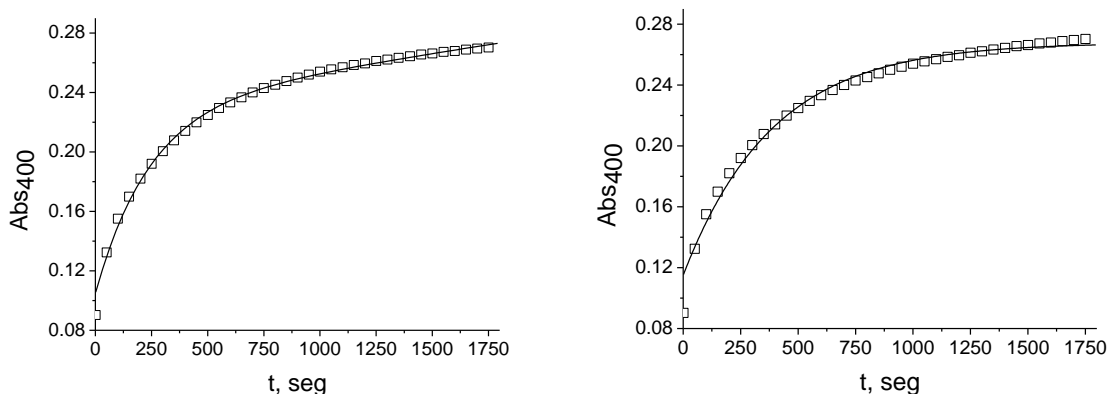


Figura 5.7.4. Curva cinética de hidrólisis de *p*-NFA. $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0.01mM, HOxAPy 0.01 mM y *p*-NFA 0.05 mM, pH 7.27, 25°C con dos formas de ajustar los datos (línea continua). (a) ajuste a una ecuación con dos etapas (suma de una ecuación exponencial de primero orden y una recta), $k_{\text{obs acilación}} = 0.041 \text{ s}^{-1}$ y (b) ajuste a una ecuación de primer orden, ecuación 5.7.1, $k_{\text{obs}} = 0.026 \text{ s}^{-1}$. (para mayor claridad sólo se muestran 1 de cada 10 puntos experimentales).

Al incrementar el pH a las mismas condiciones, la reacción de desacilación con $\text{Zn}(\text{II})$ es más rápida que a pH bajo o en ausencia del catión metálico y entonces las curvas cinéticas se ajustan a ecuaciones de primer orden, por lo tanto se puede decir que la reacción es catalítica y el nucleófilo se regenera, ver figura 5.7.5.

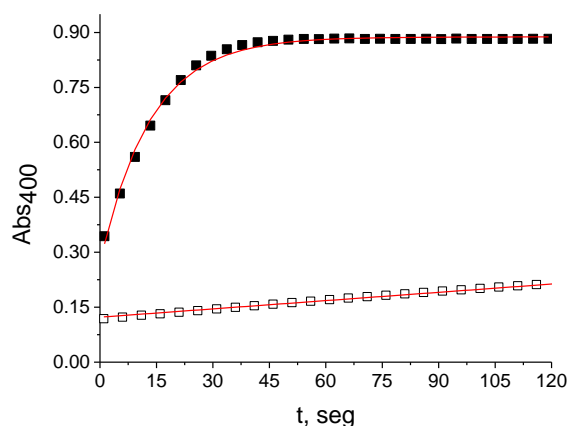


Figura 5.7.5. Curva cinética de hidrólisis de *p*-NFA. $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0.01mM, HOxAPy 0.01 mM y *p*-NFA 0.05 mM, pH 8.97, 25°C. Los cuadros rellenos son los datos con $\text{Zn}(\text{II})$ y los cuadros abiertos son en ausencia de $\text{Zn}(\text{II})$ a las mismas condiciones. La línea continua es el ajuste a la ecuación 5.7.1, $k_{\text{obs}}=0.0752 \text{ s}^{-1}$, o bien una recta (para mayor claridad sólo se muestran 1 de cada 10 puntos experimentales).

6. Síntesis y caracterización.

El esquema general de la síntesis de la 3-(hydroximino)-*N*-(piridina-2-ilmetil)butan-2-amina (HOxAPy) se muestra en la figura 6.1. Se parte de la 2-aminometil piridina (2-AMP) y la 2,3-butanodiona monoxima, que por condensación en éter isopropílico forman una imina que es precursor directo de la HOxAPy. La siguiente etapa es reducir el doble enlace C=N de la imina formado en la condensación, con NaBH₄ en metanol para así obtener el ligante HOxAPy.

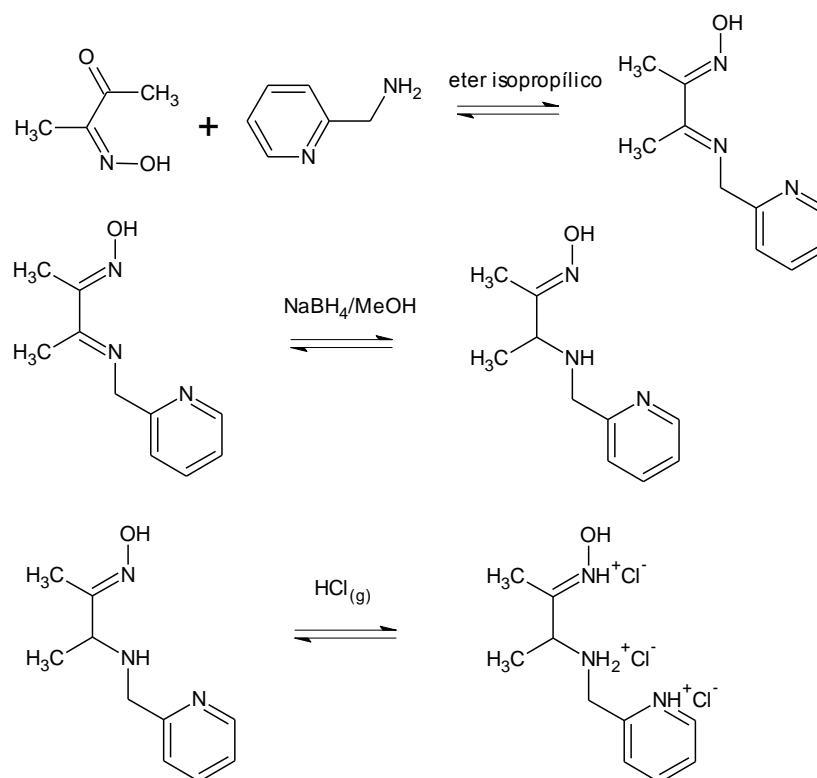


Figura 6.1. Síntesis de HOxAPy.

Sobre el método de síntesis reportado [Catalano, 1996] fue conveniente hacer algunas modificaciones posteriores a la reducción debido a que el producto de esta reacción es un aceite que descompone al aumentar la temperatura y en contacto prolongado con la atmósfera, lo cual dificulta su almacenamiento, y porque con este método no fue posible reproducir los rendimientos reportados. Lo más importante fue disminuir el tiempo de reacción en la etapa de reducción para lograr el producto deseado sin más subproductos, ya que al monitorear la reacción en placas de TLC en alúmina teniendo como referencia la HBDMO, la 2-AMP y el

producto, encontramos que la reacción se completa rápidamente. Para estabilizar el ligante deseado el paso final de la síntesis es la formación del clorhidrato mediante un sistema de burbujeo de $\text{HCl}_{(g)}$ en diclorometano.

El método de síntesis empleado finalmente es el siguiente. Se disuelven en 15 mL de éter isopropílico 20 mmol de 2,3-butanodiona monoxima y 20 mmol de 2-aminometil piridina y se ponen a reflujo a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. El producto sólido de esta condensación es filtrado y lavado con varias porciones de éter isopropílico, se obtiene un rendimiento del 88 % del producto lavado. La siguiente reacción es la reducción del doble enlace $\text{C}=\text{N}$ y se lleva a cabo disolviendo 17.5 mmol del producto de la reacción anterior en 50 mL de metanol. Una vez disuelto el sólido se agregan gota a gota 80 mmol de NaBH_4 disuelto en el mínimo volumen de metanol, se mantiene durante 45 min en un baño de hielo con agitación y posteriormente se deja que la reacción llegue a temperatura ambiente, dejando la reacción bajo agitación por una hora más. Después se evapora el metanol sin pasar de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ obteniéndose como producto un aceite amarillo pálido. Finalmente, el aceite resultante se disuelve en 20 mL de diclorometano para luego burbujear a través de esta disolución $\text{HCl}_{(g)}$. El clorhidrato que precipita es un sólido blanco higroscópico que debe ser lavado con varias porciones de diclorometano frío y finalmente almacenado en un desecador.

Se hizo la caracterización por métodos espectroscópicos convencionales: RMN ^1H , RMN ^{13}C espectrometría de masas, espectroscopía del infrarrojo, UV-Vis y también por argentometría para determinar el número de equivalentes de HCl que forman el clorhidrato de la HOxAPy.

El ligante HOxAPy resultó ser muy soluble en agua por lo que no hay necesidad de realizar mezclas de disolventes para estudiar la reactividad nucleofílica del ligante y sus complejos metálicos.

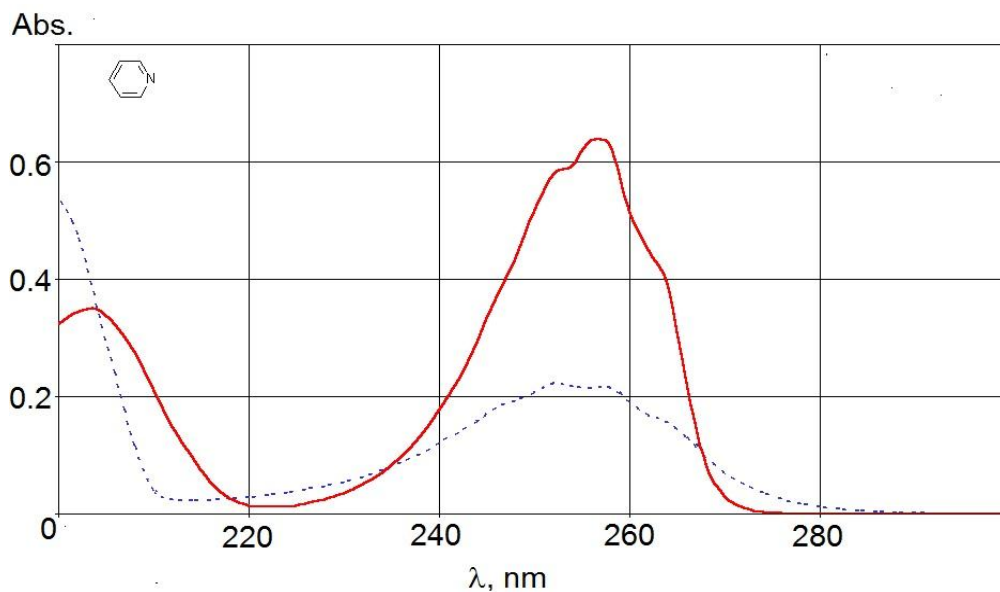


Figura. 6.3. Espectro electrónico de la Piridina en agua. Tomado de Kaljurand, Ivri, Universidad de Tartu 2001.

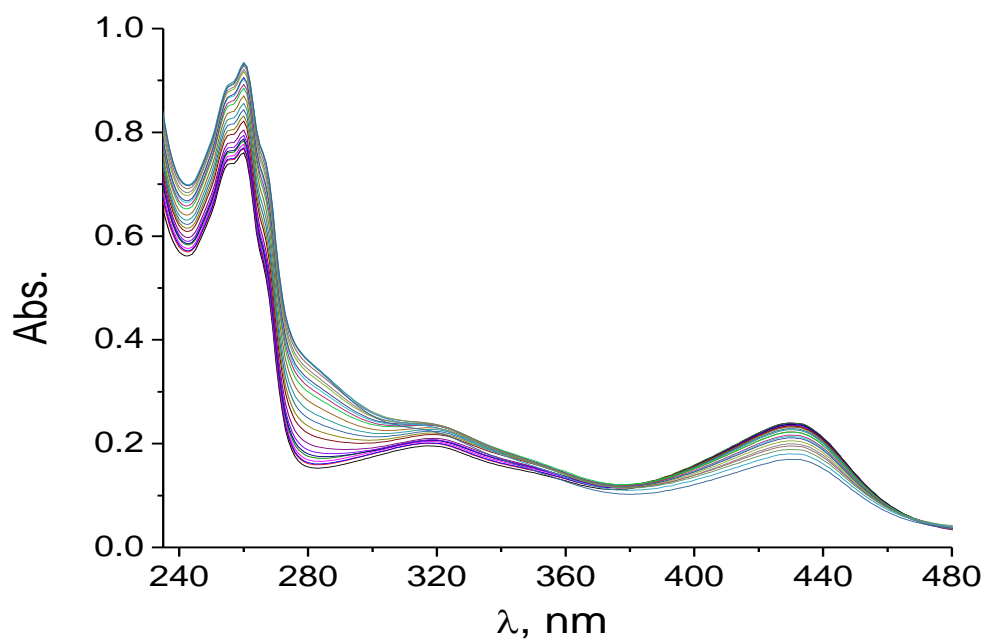


Figura. 6.4. Espectros electrónicos de la HOxAPy a partir de pH = 11.0 y hasta pH12.5, aparecen los máximos de las bandas de absorción del grupo oximato en 315 y 430 nm.

Espectrometría de masas

Se obtuvieron los espectros de masas del precursor no reducido (figura 6.5) y del ligante HOxAPy (figura 6.6) mediante la técnica de bombardeo de partículas (FAB).

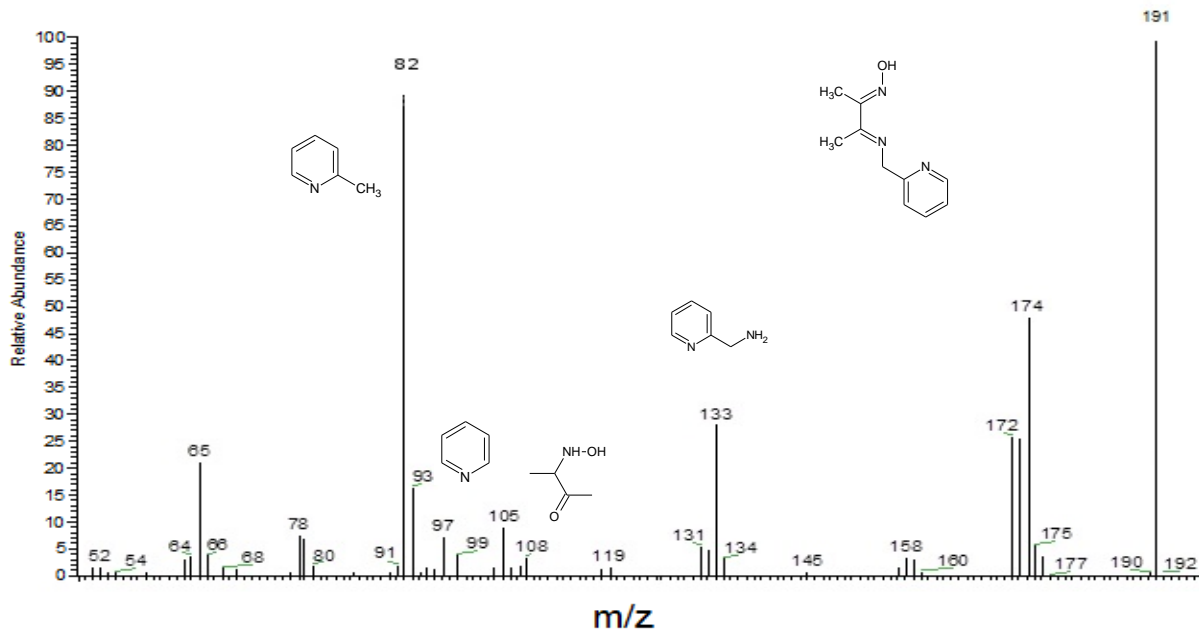


Figura 6.5. Espectro de masas del precursor no reducido de la HOxAPy

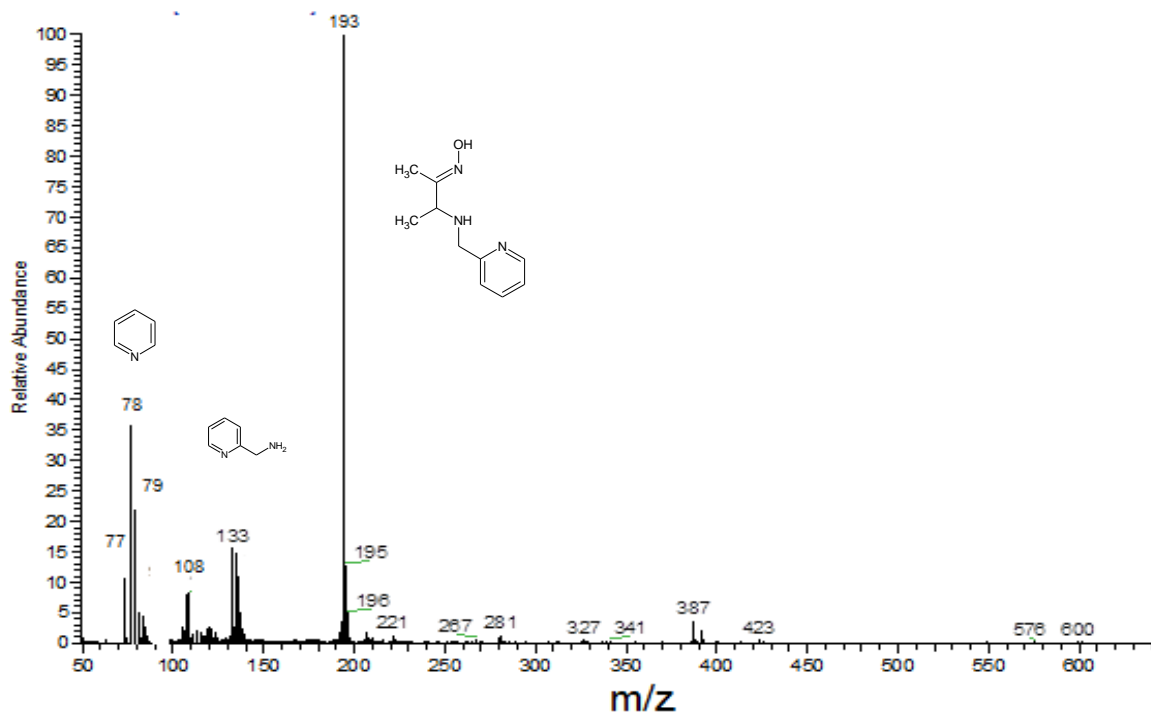


Figura 6.6. Espectro de masas de la HOxAPy

En la figura 6.7 se presentan los fragmentos de donde provienen los valores de m/z más representativos en ambos casos.

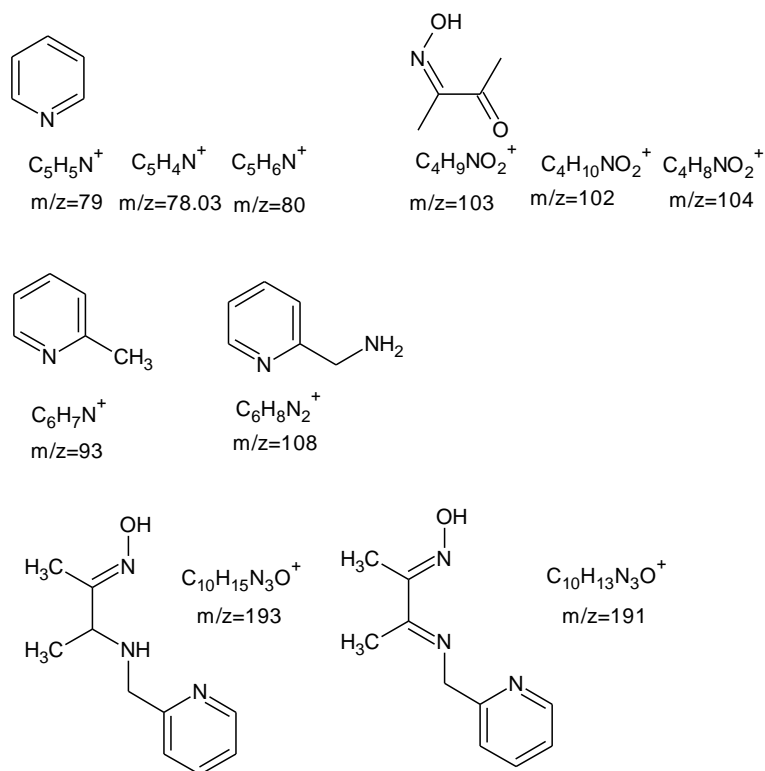


Figura 6.7 Fragmentos encontrados en los espectros de masas tanto del ligante HOxAPy como de su precursor no reducido. Se muestran las estructuras neutras para mayor claridad en el reconocimiento de los fragmentos encontrados.

Se pueden ubicar en los espectros de masas mostrados en la página anterior, las señales correspondientes a varios fragmentos que era previsible encontrar dadas las estructuras del ligante y su precursor no reducido. En ambos casos las señales que representan la abundancia relativa de 100% son los correspondientes al ion molecular $m/z = 193$ y $m/z = 191$ respectivamente (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Ion Molecular del ligante HOxAPy y su precursor no reducido.

Compuesto	Formula	F.W.	m/z de M ⁺
HOxAPy	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O	193.25	193
precursor HOxAPy	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O	191.11	191

¹H RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica se obtuvieron utilizando las muestras del ligante HOxAPy y de su precursor no reducido, producto de la condensación entre la 2,3-butanodionamonoxima y la 2-aminometilpiridina.

Para el ligante HOxAPy se determinó en DMSO deuterado a temperatura ambiente y también en D₂O a diferentes adiciones de NaOD para neutralizar los equivalentes de HCl que forman el clorhidrato y que provocan estados protonados de la HOxAPy cuyos espectros de RMN ¹H varían según se modifique el valor de pH. Para el precursor no reducido sólo se determinó en DMSO deuterado.

En la figura 6.8 se muestra el espectro de ¹H RMN del precursor no reducido y en la tabla 6.2 se resumen las señales asignadas con la estructura numerada para mayor claridad.

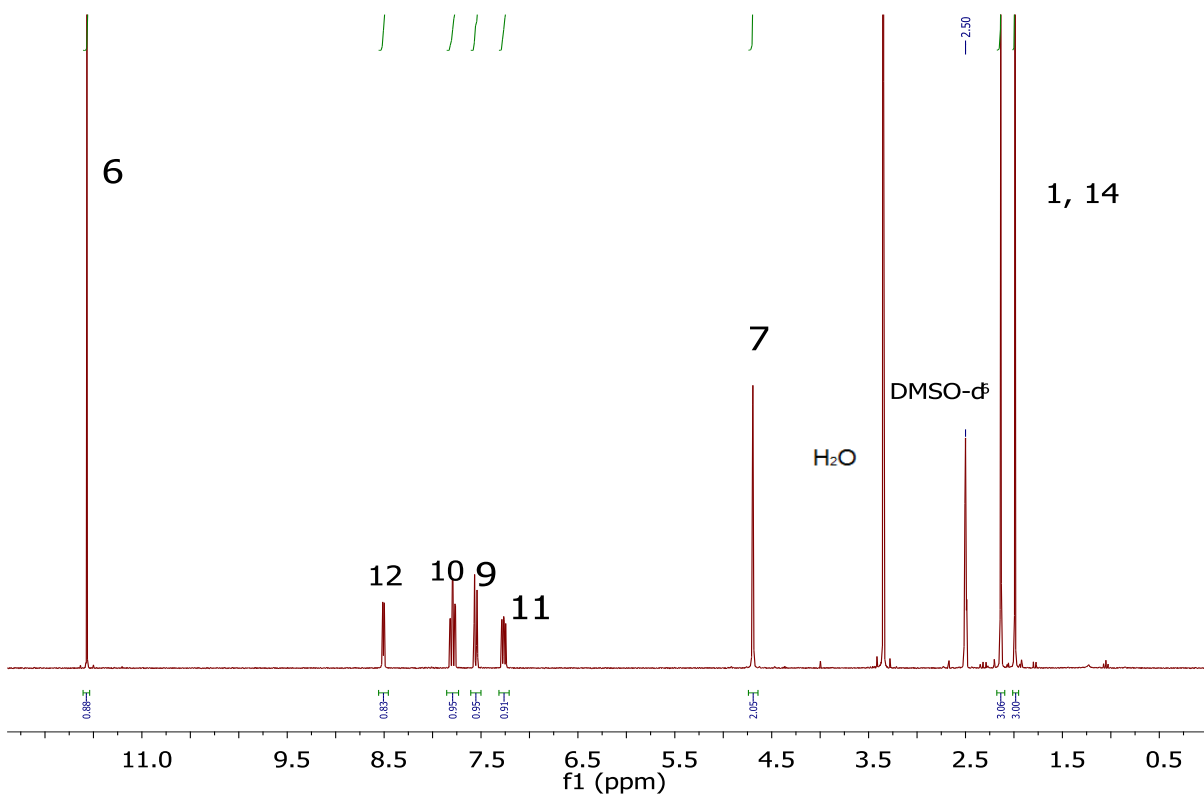


Figura 6.8. Espectro de ^1H RMN de la oxima no reducida, precursora de la HOxAPy a temperatura ambiente en DMSO deuterado

Tabla 6.3. Señales asignadas para el espectro RMN ^1H de la oxima precursora de la HOxAPy

Estructura	H	δ	Señal	Integración	Constante acoplamiento (Hz)
	10	7.73	Triplete	1	4.7
	11	7.24	Triplete	1	7.9, 1.7
	9	7.33	Doblete	1	8.0
	12	8.58	Doblete	1	6.8, 5.6
	6	11.57	Singulete	1	
	7	4.69	Singulete	2	6.65
	1	2.14	Singulete	3	
	14	1.99	Singulete	3	6.9

Se observan un par de tripletes en $\delta = 7.73$ ppm y 7.24 ppm que integran para un protón cada una correspondientes a los protones en posición *para* (10) y *meta* (11)

al nitrógeno de la piridina, dos dobletes en 7.33 ppm y 8.58 ppm que integran para un protón cada una y corresponden a los protones en las posiciones *meta* (9) y *orto* (12) al nitrógeno de la piridina. El singulete $\delta = 4.69$ ppm integra para dos protones y corresponde al grupo $-\text{CH}_2$ sustituyente del anillo piridínico (7). Los dos singuletes observados en $\delta = 2.14$ ppm y 1.99 ppm integran para tres protones cada uno y corresponden cada uno a un metilo (1 y 14).

Por otra parte, el espectro RMN ^1H del ligante HOxAPy se determinó en DMSO deuterado y también en D_2O en este último antes y después de adiciones de NaOD para neutralizar la acidez proveniente de la disolución del clorhidrato HOxAPy 3HCl e incluso llegar a pH básico. El espectro en DMSO se muestra en la figura 6.9 y en la tabla 6.4 se resume la asignación de señales y se muestra la estructura numerada para mayor claridad.

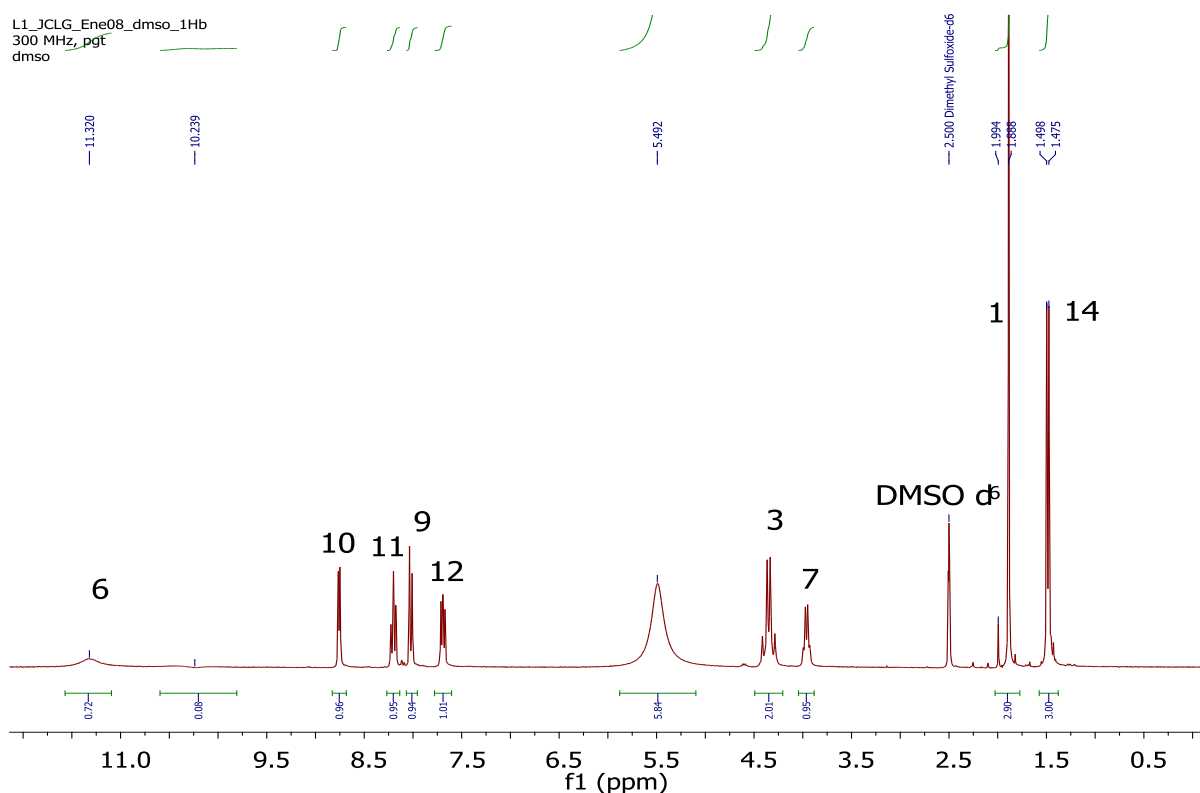


Figura 6.9. Espectro ^1H RMN de la oxima HOxAPy a temperatura ambiente en DMSO deuterado

Tabla 6.4. Asignación de señales para RMN ^1H de la HOxAPy a temperatura ambiente en DMSO deuterado.

Estructura	H	δ (ppm)	Señal	Integración	Constante acoplamiento (Hz)	
	10	8.76	dd	1	4.5	
	11	8.20	td	1	7.8, 1.5	
	9	8.02	dd	1	7.9	
	12	7.69	dd	1	6.7, 5.5	
	6	11.32	Singulete	1		
	7	3.96	Cuadruplete	1	6.5	
	3	4.35	Cuadruplete	2		
	1	1.88	Singulete	3		
	14	1.49	Doblete	3	6.7	

Para el ligante HOxAPy se observan las siguientes señales. Una señal en $\delta = 11.32$ que integra para un protón asignable al grupo oxima. El patrón de señales del grupo piridina se encuentra en $\delta = 8.76$ ppm como doblete dobleteado (dd), 8.20 ppm como triplete dobleteado (td), 8.02 ppm como doblete (d) y en 7.69 ppm, cada señal integra para un protón que corresponde a cada uno de los que posee el grupo piridina en la HOxAPy. En $\delta = 3.96$ ppm se observa un cuarteto que integra para un protón cuya constante de acoplamiento es $J = 6.5$ Hz, dicha señal puede asignarse al protón del grupo $-\text{CH}$ (3) que está unido al grupo metilo (14) cuya señal es un doblete ubicado en 1.49 ppm que integra para tres protones con una constante de acoplamiento es $J = 6.7$ Hz. Lo dicho para las señales en 3.96 ppm y 1.49 ppm es relevante pues es lo esperado para la HOxAPy luego de la reducción del enlace $\text{C}=\text{N}$ en el precursor no reducido y en cuyo espectro, que ya hemos analizado, no aparece ningún cuarteto como es de esperar. Sin embargo en

$\delta = 4.35$ ppm aparece un cuarteto más que integra para dos protones con una $J = 14.5$ Hz, esta señal no es esperada de tal forma pues la única señal que podría integrar para dos protones es la correspondiente a los protones ubicados en el grupo $-\text{CH}_2$ (7). La integración coincide con dos protones pero se espera un singulete. En este análisis se asigna dicha señal al grupo $-\text{CH}_2$ (7) ya que como

se verá más adelante, al medir nuevos espectros RMN ^1H de HOxAPy en D_2O deuterado y cambiar los estados de protonación mediante el cambio de pH de medio ácido (por disolución del clorhidrato) hasta medio básico por adición de NaOD, encontramos que los espectros se modifican de manera notable y además el cuarteto que aparece en DMSO deuterado en $\delta = 4.35$ ppm integrando para dos protones, cambia su señal a un singulete que sigue integrando para dos protones, por lo que se deduce que se trata de la señal de los protones unidos al grupo $-\text{CH}_2$ (7). Finalmente en DMSO d_6 se observa un singulete en $\delta = 1.88$ ppm que integra para tres protones y que es asignable a los protones del restante grupo metilo (1).

En la figura 6.10 se muestra el espectro de la HOxAPy en D_2O y en la tabla 6.4 se resume la asignación de señales.

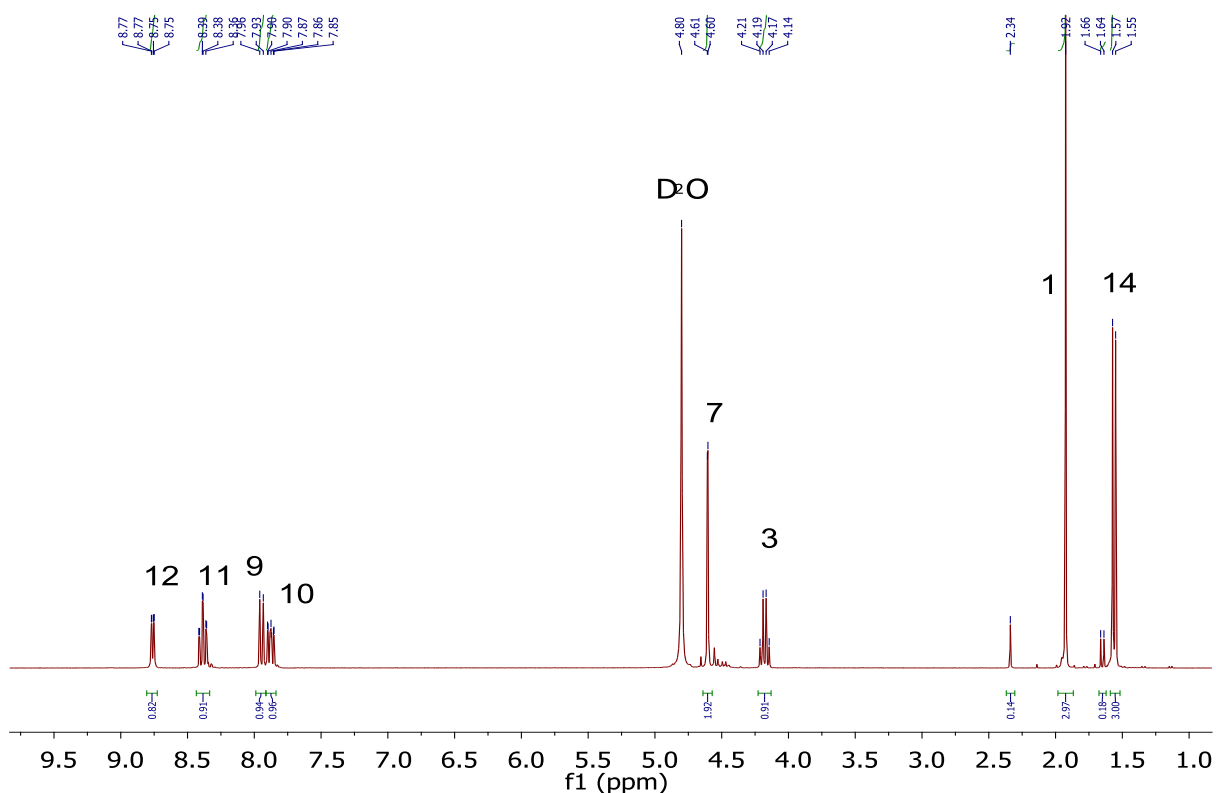


Figura 6.10 Espectro RMN ^1H de la HOxAPy 3HCl en D_2O

Tabla 6.4 Señales asignadas para el espectro RMN ^1H de la oxima HOxAPy en D_2O y medio básico.

Estructura	H	δ	Señal	Integración	Constante acoplamiento (Hz)
	10	7.87	dd	1	4.90
	11	8.39	td	1	7.90, 1.74
	9	7.9	dd	1	8.20
	12	8.75	Doblete	1	6.89, 5.67
	7	4.6	Singulete	2	
	3	4.19	Cuadruplete	1	6.91
	1	1.92	Singulete	3	
	14	1.57	Doblete	3	6.90

Se observan las señales esperadas para los metilos (1 y 14) como singulete y doblete respectivamente, ambos integrando para tres protones. La señal singulete en $\delta = 4.6$ ppm con integración de dos protones es asignable al protón del grupo (7), que en $\text{DMSO } d_6$ señalizaba un cuarteto.

Ya que se tiene interés en el anión oximato es importante ver la diferencia en los espectros de RMN ^1H que se nota principalmente en las señales correspondientes al grupo piridina y en los metilos (1) y (14) cuando el espectro se mide en medio ácido (DCI en D_2O) y cuando se hace luego de la adición de NaOD en D_2O hasta medio básico. En la figura 6.11 se muestra la comparación de los espectros RMN ^1H en medio ácido y básico para las señales de la piridina y en la figura 6.12 se muestran las señales para los metilos que en medio ácido presentaron un patrón de duplicación que prácticamente desaparece en medio básico, lo cual se atribuye, al igual que en el caso de las señales de la piridina, a los diferentes estados de protonación de la HOxAPy.

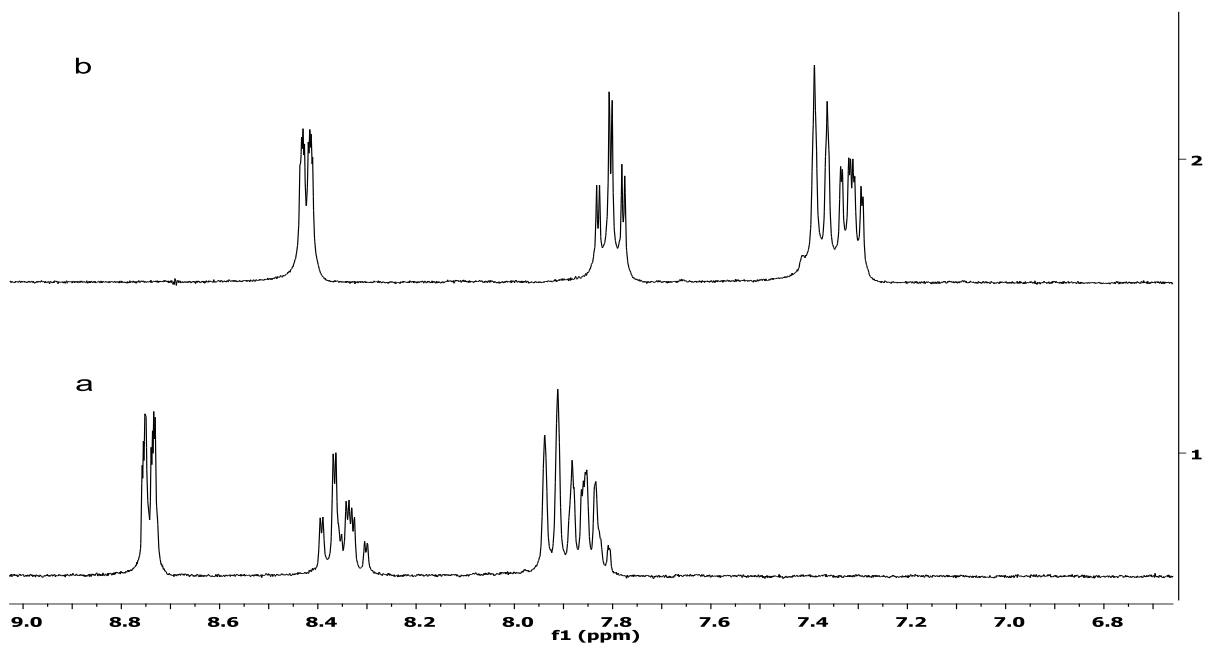


Figura 6.11 Señales del grupo piridina en el espectro RMN ^1H de la HOxAPy 3HCl en D_2O . (a) medio ácido. (b) medio básico. Se muestran las diferencias que se producen entre las señales del estado protonado y desprotonado del grupo piridina. La adición de NaOD hasta medio básico permite obtener señales más definidas y con un desplazamiento a campo alto.

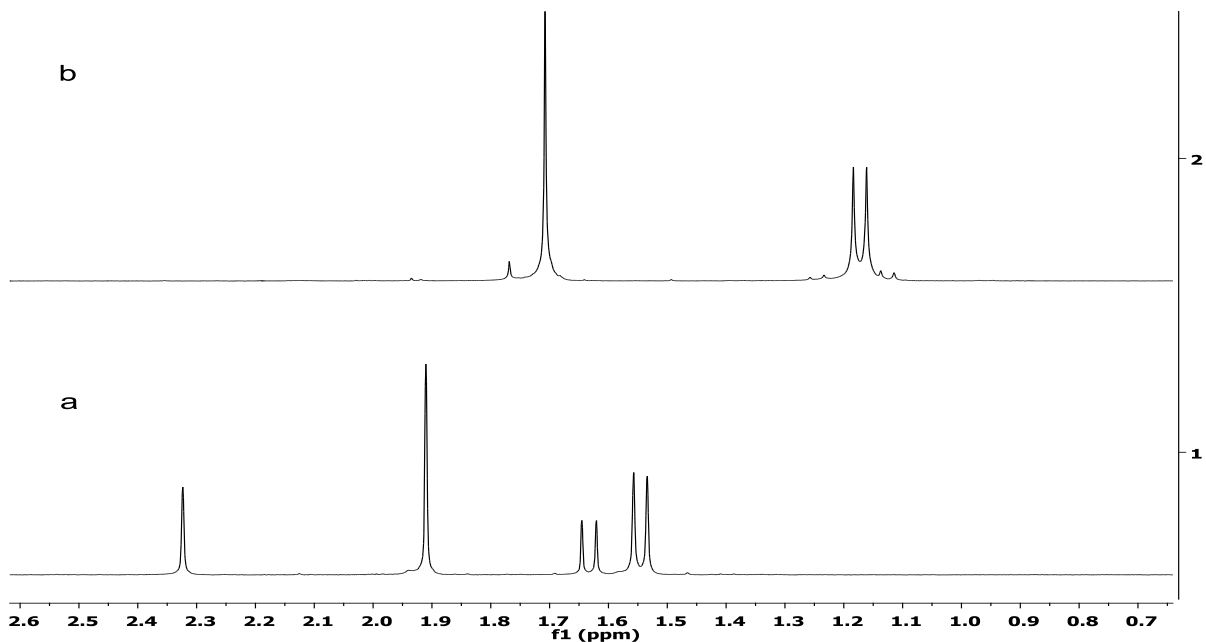


Figura 6.12. Señales de los grupos metilos en el espectro RMN ^1H de la HOxAPy 3HCl en D_2O . (a) medio ácido. (b) medio básico.

En medio ácido el singulete en $\delta = 1.92$ ppm asignado a los protones del metilo (1) aparece duplicado con una señal en $\delta = 2.33$ ppm. La suma de las integraciones de ambas señales es de tres protones. El doblete en $\delta = 1.57$ ppm, asignado a los protones del metilo (14) aparece duplicado en $\delta = 1.66$ ppm pero la suma de las integraciones para cada doblete es de tres protones. Medir los espectros RMN ^1H en medio básico ayudó a confirmar con mayor seguridad la identidad del compuesto, ya que al estar en forma de clorhidrato sus espectros en DMSO d_6 o D_2O presentan algunas señales no esperadas para el ligante neutro y cuya causa son los distintos estados de protonación de la HOxAPy.

RMN ^{13}C

Se obtuvo el espectro RMN ^{13}C a temperatura ambiente para una muestra del ligante HOxAPy en D_2O . En la figura 6.13 se muestra el espectro y la estructura numerada para mayor claridad. Como puede observarse, ninguno de los carbonos de la estructura es equivalente por lo que se obtienen diez señales distintas en el espectro, igual al número de carbonos no equivalentes en la estructura de la HOxAPy.

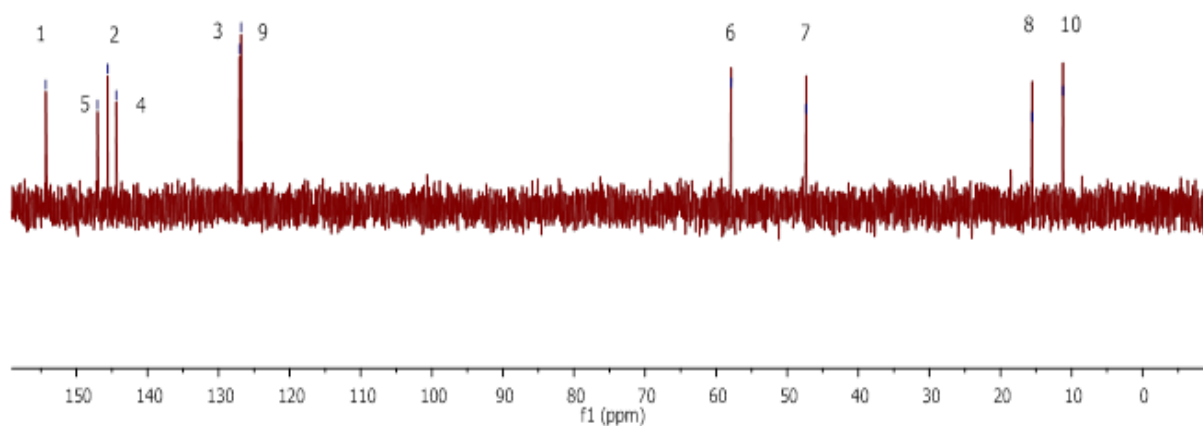
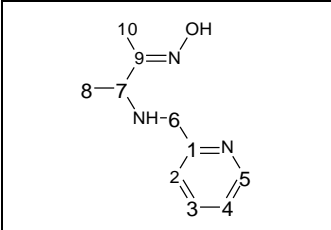


Figura 6.13. Espectro RMN ^{13}C de la HOxAPy en D_2O .

En la tabla 6.5 se resume la asignación de las diez señales para cada uno de los diez carbonos.

Tabla 6.5. Asignación de señales del espectro ^{13}C RMN para cada carbono de la HOxAPy

Estructura	Carbono No.	δ ppm	Carbono No.	δ ppm
	1	154.3	6	57.89
	2	145.6	7	47.33
	3	127.05	8	15.54
	4	144.39	9	126.83
	5	147.03	10	11.21

Espectroscopía de Infrarrojo

Se obtuvieron los espectros IR de la HOxAPy y de la 2,3-butanodionamoxima en pastillas de KCl. Para ambas muestras encontramos las bandas características de las oximas: 1663 cm^{-1} correspondiente al enlace C=N y 962 cm^{-1} al enlace N-O. En las figuras 6.14 A y B y 6.15 se muestran porciones de los espectros IR y se resaltan cada una de las señales características de las oximas.

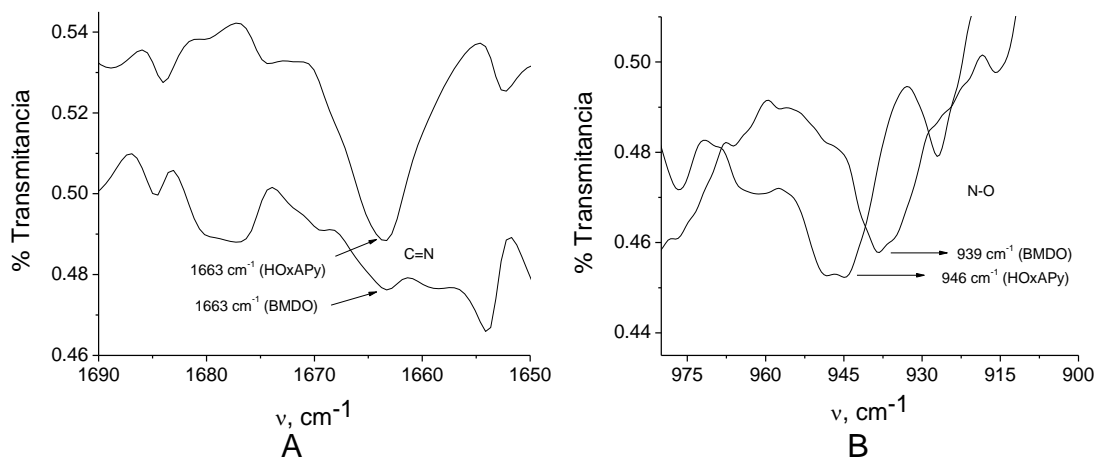


Figura.6.14. Espectros IR para la HBDMO y la HOxAPy. Cada espectro muestra una señal característica de las oximas; C=N $\nu=1663\text{ cm}^{-1}$ (A), N-O $\nu=939\text{-}946\text{ cm}^{-1}$ (B).

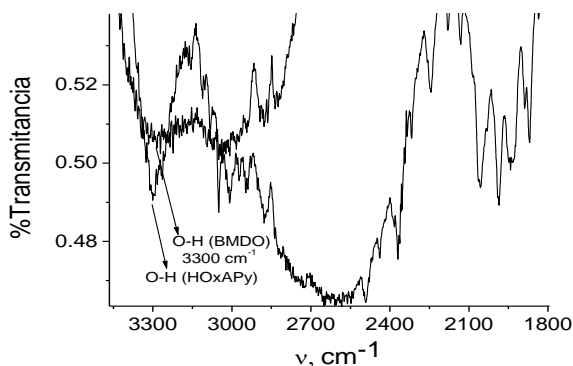


Figura.6.15. Espectros IR para la HBDMO y la HOxAPy mostrando la señal debida al O-H en $\nu=3300\text{ cm}^{-1}$.

De acuerdo a la información obtenida de las distintas espectroscopías se puede concluir que se ha obtenido la oxima **HOxAPy**.

Finalmente, el número de equivalentes de HCl que componen el clorhidrato de la HOxAPy se determinó mediante argentometría: al titular con una disolución estandarizada de Ag^+ se puede saber la concentración y cantidad de cloruros presentes en la muestra y por lo tanto el número de equivalentes con el compuesto. Para ello se utilizó un electrodo de Ag^0 como electrodo de trabajo y AgNO_3 como titulante, figura 6.16. Los resultados de la argentometría muestran que la muestra tiene tres equivalentes de Cl^- , por lo tanto se propone que el clorhidrato se compone como $\text{HOxAPy}\cdot 3\text{HCl}$.

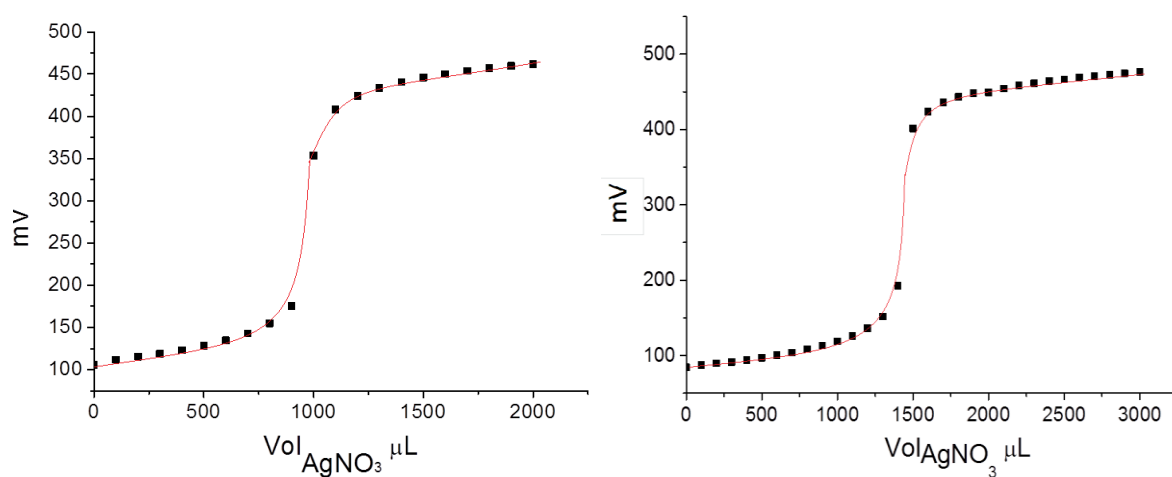


Figura 6.16. Curva de estandarización del AgNO_3 frente a una disolución 20 mM de NaCl (izquierda) y curva de titulación de la disolución de HOxAPy 20 mM con AgNO_3 previamente estandarizado (derecha). Se utilizó electrodo de plata como electrodo de trabajo y fuerza iónica 0.1 M de NaNO_3 en disolución y en el electrodo de referencia.

7. Determinación de los valores de pK_a del ligante HOxAPy

Los valores de pK_a del ligante HOxAPy se determinaron mediante titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas. En potenciometría cada punto consiste en una lectura de pH contra volumen añadido de NaOH previamente estandarizado. La alta solubilidad de la HOxAPy en agua nos permite trabajar en intervalos de concentración 5-10 mM necesarios en potenciometría. En espectrofotometría a cada espectro de UV-Vis medido le corresponde igualmente un volumen añadido de NaOH. Se realizaron varias titulaciones por cada método para luego promediar los valores de pK_a obtenidos para cada grupo protonable y así obtener valores de pK_a promedios.

Inicialmente los datos se analizaron en *Origin* como los perfiles de pH en función del volumen adicionado o bien de la absorbancia a cierta longitud de onda en función del pH. De estos análisis se obtuvieron los valores iniciales para hacer los ajustes en *Hyperquad*.

El programa *Hyperquad* tiene un método numérico que permite calcular varias constantes de manera simultánea y también realizar el ajuste simultáneo de varias curvas de titulación con un mismo modelo, lo cual no es posible hacer en *Origin* ya que es necesario obtener una ecuación con la solución analítica. En el caso de las titulaciones espectrofotométricas la iteración para las constantes se hace de manera simultánea en todas las longitudes de onda de un intervalo determinado. En el programa se usan de manera simultánea: (a) una ventana (parte superior izquierda) con el modelo planteado, la composición de cada especie y los valores de las constantes acumulativas como $\log \beta$; (b) una segunda ventana (parte inferior izquierda) con las condiciones bajo las que se realizó el experimento y los datos experimentales y (c) una tercer ventana (lado derecho) que va mostrando a su vez: los puntos experimentales, la curva teórica dadas las constantes calculadas, el número de punto, el error sobre los puntos (parte inferior) y la distribución de las especies que aparecen al lado derecho.

En la figura 7.0 se muestra cómo se ve el ajuste de una titulación potenciométrica realizado en *Hyperquad*.

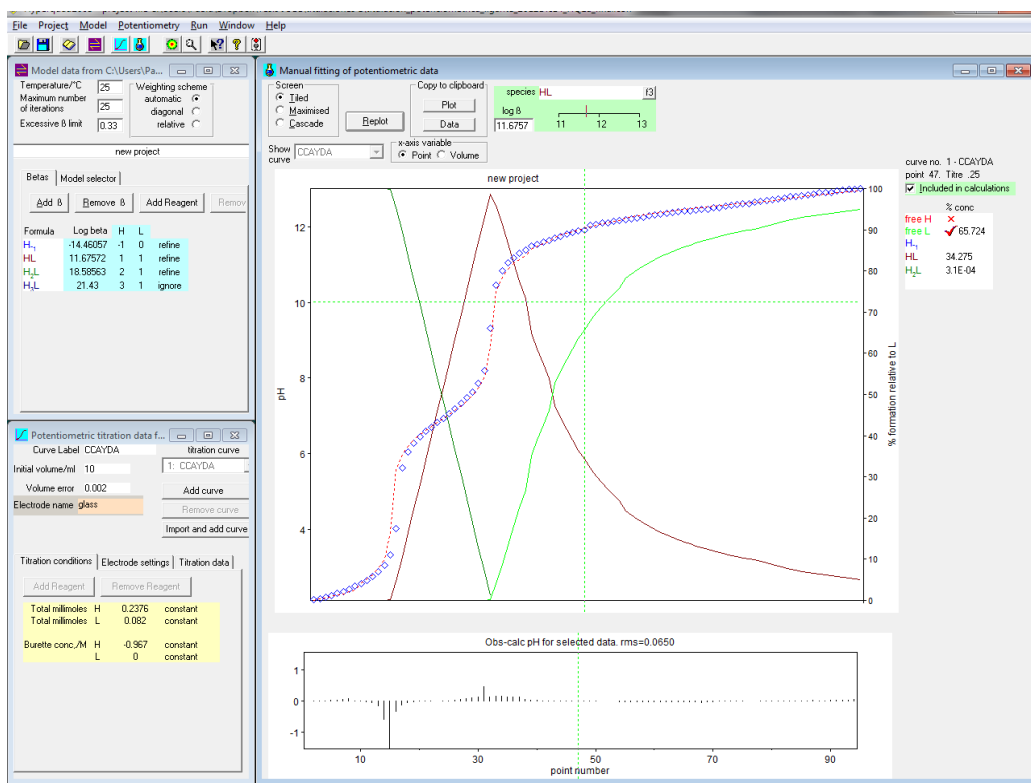


Figura 7.0. Ejemplo de curva de titulación de la disolución acuosa de HOxAPy 8.8 mM, NaCl 0.1 M, 25°C, bajo flujo de N₂. Los datos potenciométricos se ajustaron en Hyperquad de acuerdo a las concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados, obteniéndose también la distribución de especies.

En las titulaciones espectrofotométricas la concentración de la HOxAPy fue 0.2 mM, fuerza iónica 0.1 M y titulante NaOH 100 mM previamente estandarizado. Tras cada adición de NaOH se mide el espectro UV-Vis. Los espectros obtenidos (Absorbancia vs λ , nm) luego son exportados a *Hyperquad* junto con los volúmenes de NaOH añadidos. A continuación se muestra un ejemplo de ajuste realizado para titulación espectrofotométrica, figura 7.1. En este caso, además de las ventanas anteriores, aparecen por separado el ajuste de los puntos y el ajuste de cada espectro: a cada longitud de onda hay una curva que muestra el ajuste. En la figura 7.1 se muestran los datos de absorbancia a 262 nm a la izquierda y a la derecha cómo es el espectro calculado y los espectros teóricos en un punto particular en la titulación, en este caso es el punto 20.

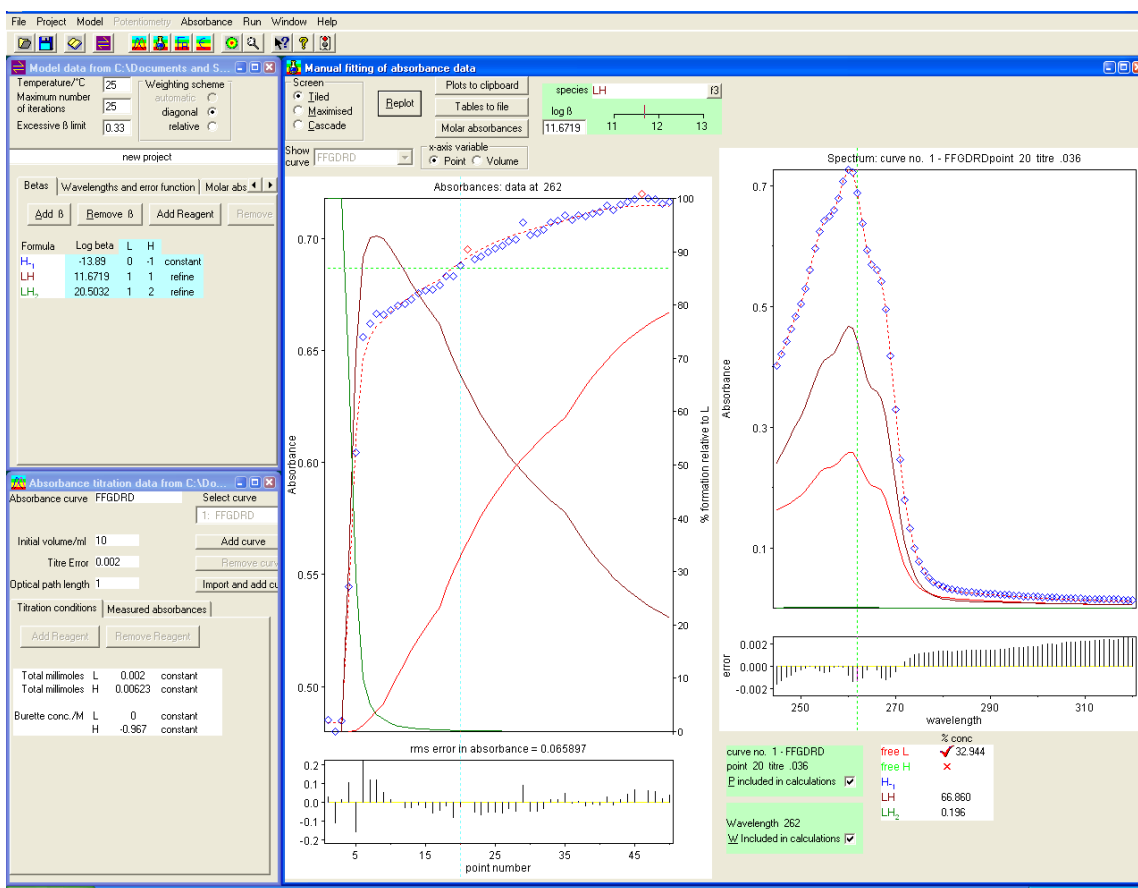
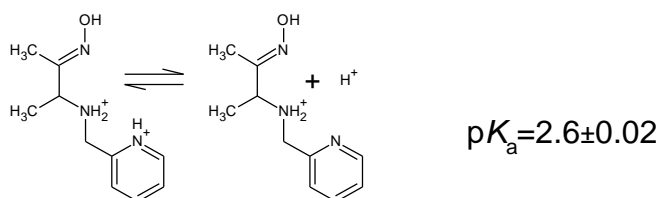


Figura 7.1. Ejemplo de curva de titulación con NaOH estandarizado de la disolución de HOxAPy 0.2 mM, con NaCl 0.1 M, en agua a 25°C, bajo flujo de N₂. Los datos espectrofotométricos se ajustaron en Hyperquad de acuerdo a las concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados.

El valor promedio encontrado para cada uno los tres valores de pK_a son 2.6±0.2, 6.96±0.05 y 11.74±0.09, para la función oxima (figura 7.2).



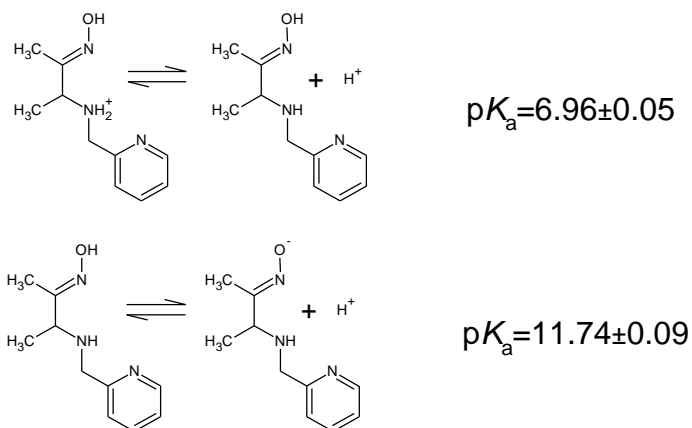


Figura 7.2. Equilibrios ácido base para la HOxAPy y sus valores de $\text{p}K_a$ promedio en disolución acuosa.

8.0. Constantes de formación de los complejos de HOxAPy con Cd(II) y Zn(II).

Espectrofotometría UV-Vis y potenciometría

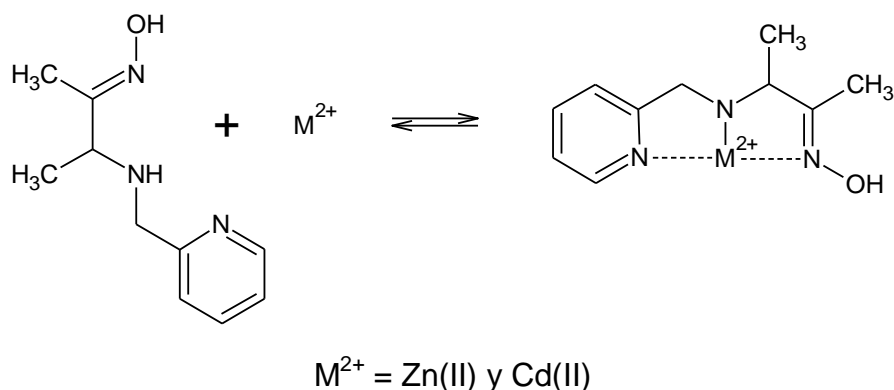
Los cationes Zn(II) y Cd(II) resultaron exhibir los mayores incrementos de la reactividad esterolítica de los sistemas formados (ver sección 10) y por ello resulta interesante investigar las especies presentes en disolución para analizar posteriormente la reactividad observada en función de estas especies.

Para medir las constantes de formación de los complejos de Zn(II) y Cd(II) en disolución acuosa se realizaron titulaciones en diferentes condiciones y mediante tres técnicas diferentes: potenciometría, espectrofotometría y RMN ^1H (ver la siguiente sección).

Para potenciometría se hicieron titulaciones en intervalos de concentración del ligante y catión metálico en el intervalo de 1-10 mM, en condiciones de relación de concentraciones 1:1 entre metal y ligante, y de dos formas diferentes: titulado con NaOH una mezcla del ligante con el catión metálico o bien titulado a pH fijo el ligante con una disolución concentrada del catión metálico. Las titulaciones con NaOH se iniciaron en pH 2.1 y se continuaron hasta donde no aparece ningún precipitado. Para espectrofotometría se hicieron experimentos paralelos, pero la

concentración del ligante fue entre 0.05 y 0.5 mM, siendo 2×10^{-4} M la concentración a la que se hicieron más titulaciones. Para las titulaciones con el catión metálico a concentración de ligante y pH fijos se emplearon amortiguadores biológicos no coordinantes (CAPS, CHES o MOPS, que no forman complejos con Zn(II) o Cd(II)) en concentraciones 40 y 100 mM y las disoluciones se titularon con una disolución concentrada y estandarizada del nitrato o perclorato del catión metálico hasta tener en disolución un exceso del catión, usando un intervalo de longitudes de onda entre 230-600 nm. Para hacer los ajustes de los datos de todas las titulaciones realizadas con metal, se usó el conjunto de constantes de disociación ácido-base previamente determinadas.

De acuerdo a lo observado en cinética, se esperaría la formación de especies que incluyan el ligante neutro HOxAPy unido al catión metálico $M(\text{HOxAPy})^{+2}$ y la posterior desprotonación de este complejo para dar el complejo oximato $M(\text{OxAPy})^+$. El caso más simple es el que se observa a pH ácido, cercano a 5, cuando el ligante en su forma neutra se asocia con el catión metálico; para poder funcionar como ligante tridentado el ligante pierde el protón de la amina (pK_a 6.96), como se ejemplifica en el esquema 8.1; a mayores valores de pH este complejo debería desprotonarse para dar el complejo oximato que debería tener reactividad esterolítica.



Esquema 8.1. Formación de un complejo 1:1 entre el ligante HOxAPy y M(II)

A continuación se describen algunos ejemplos de titulaciones y se hace un resumen de los resultados obtenidos por ambas técnicas y a diferentes condiciones.

Las figuras 8.2 y 8.3 muestran los espectros electrónicos obtenidos de la titulación de HOxAPy a pH 7.0 amortiguado con MOPS 40 mM con disoluciones 81 mM de Cd(II) y 85 mM de Zn(II) respectivamente, a este pH la adición del catión metálico da como resultado un pequeño incremento en las bandas entre 250-275 nm.

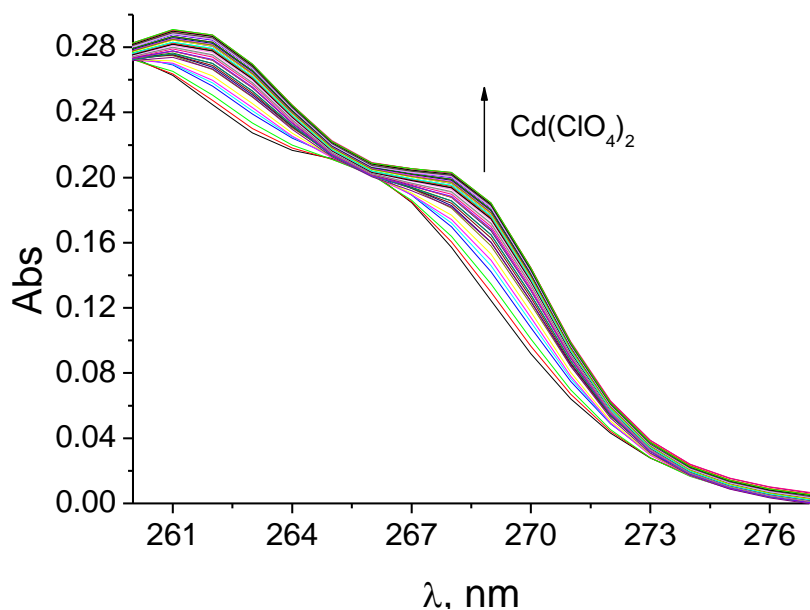


Figura 8.2. Espectros electrónicos de la titulación de HOxAPy 0.2 mM con varias adiciones de Cd(II) en agua con MOPS 40 mM a pH 7.0 y 25°C. Titulante Cd(NO₃)₂ 81 mM en agua a pH 6.5.

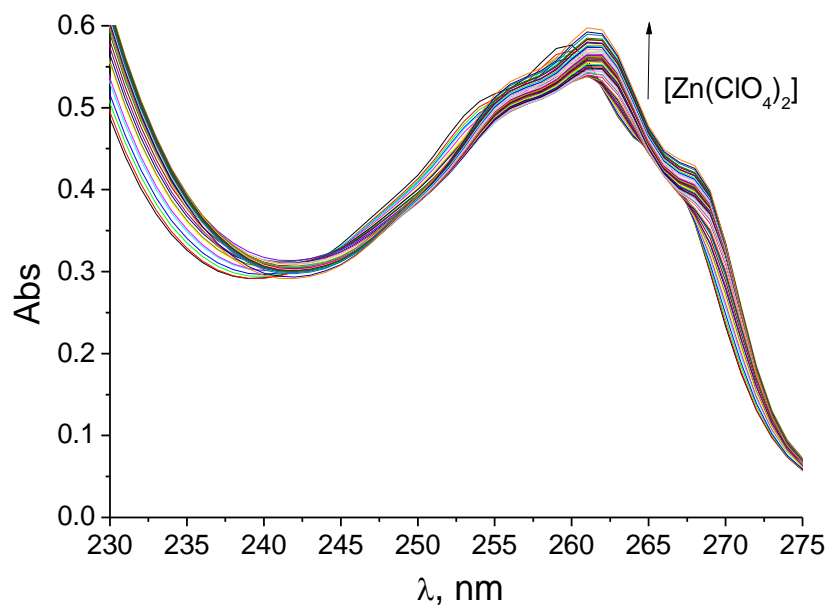
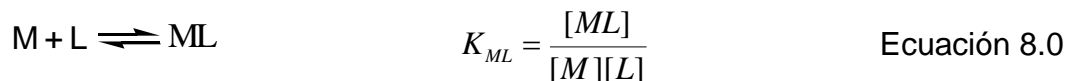


Figura 8.3. Espectros electrónicos de la titulación de HOxAPy 0.2 mM con varias adiciones de Zn(II) en agua con MOPS 40 mM a pH 7.0 y 25°C. Titulante Zn(ClO₄)₂ 85 mM a pH 5.5.

Como primera aproximación para analizar estos datos, se graficaron los valores de absorbancia (a varias longitudes de onda cercanas a los máximos de absorción) en función de la concentración total adicionada del catión metálico y estos datos se ajustaron a un modelo en el que se forma un complejo de estequiometría 1:1. Este equilibrio se puede expresar por medio de la ecuación 8.0 en donde se omiten las cargas para mayor claridad



Aquí la ecuación para el balance del catión metálico es $[M]_t = [M] + [ML]$ y la absorbancia de la disolución (a cierta longitud de onda) es $[Abs]_t = [Abs]_M + [Abs]_L + [Abs]_{ML}$, en donde se puede considerar que a las longitudes de onda analizadas la contribución del catión metálico a la absorbancia es cero. El ajuste de los datos experimentales se realiza con la siguiente expresión en la que se considera el balance de masa para el catión metálico como función de la concentración total del catión metálico [Schneider, Yatsimirsky 2000].

$$Abs = Abs_L + 0.5\Delta\varepsilon_{ML-L} \left\{ [L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} - \sqrt{\left[[L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} \right]^2 - 4[L]_0[M]_0} \right\} \quad \text{Ecuación 8.1}$$

en donde :

Abs_L = absorbancia del ligante a esa longitud de onda

$\Delta\varepsilon_{ML-L}$ = diferencia de absorptividad molar del complejo y el ligante.

$[L]_0$ = concentración del ligante

$[M]$ = concentración del metal,

K_{ML} = constante de equilibrio de formación del complejo.

Con los datos de la concentración total de la sal del catión metálico agregado, $[Zn(ClO_4)_2]_0$ ó $[Cd(NO_3)_2]_0$ en función de ΔAbs , se realizó un ajuste no lineal en *Origin* empleando la ecuación 8.1 obteniéndose como parámetro de ajuste la constante de equilibrio, K_{ML} . En la figura 8.3 se muestra uno de los ajustes

realizados con este modelo para la titulación con Cd(II). De aquí podemos decir que existe un complejo que predomina a estas condiciones porque los datos se ajustan bastante bien a un modelo 1:1 metal:ligante.

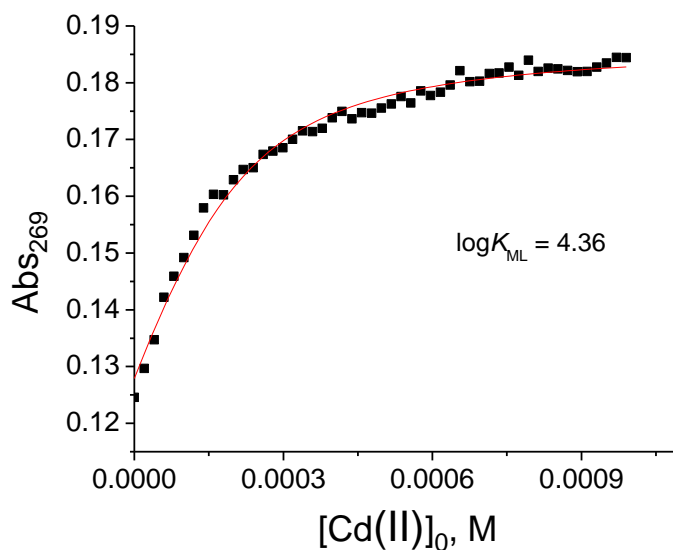


Figura 8.3. Ajuste de los datos de la curva de titulación a 269 nm de HOxAPy 0.2 mM con varias adiciones de Cd(II) en agua con MOPS 40 mM a pH 7.0 y 25°C. Titulante Cd(NO₃)₂ 81 mM en agua a pH 7.0. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 8.1, $\log K_{ML} = 4.36$.

El ajuste de los mismos datos también se realizó en *Hyperquad* (partiendo del valor obtenido en *Origin*) ya que en este programa se hacen iteraciones considerando todas las longitudes en el intervalo 230 - 340, en particular el intervalo entre 250-275 nm (figura 8.4). Aquí se encontró que es necesaria la presencia de dos complejos para lograr el ajuste de los datos, uno con el ligante protonado y otro con el ligante desprotonado.

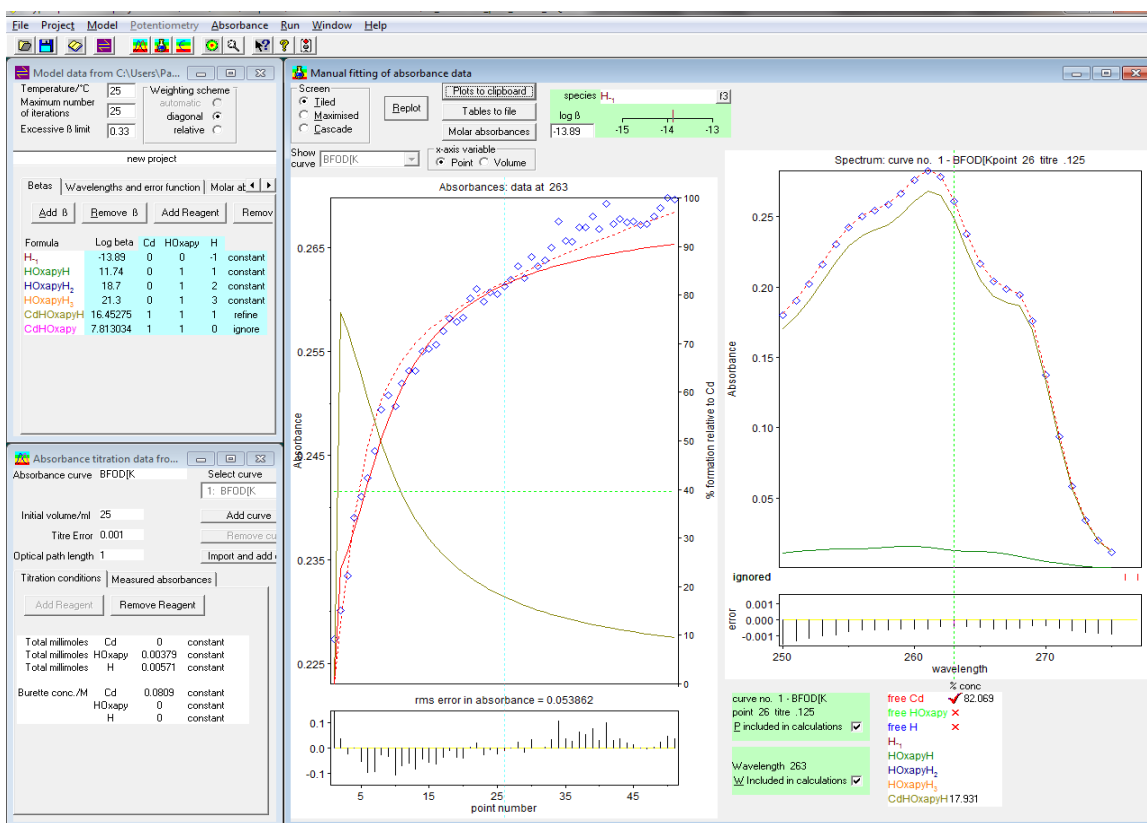


Figura 8.4. Ajuste de los datos de la curva de titulación de HOxAPy 0.2 mM con varias adiciones de Cd(II) en agua con MOPS 100 mM a pH 7.0 y 25°C. Titulante Cd(NO₃)₂ 81 mM en agua a pH 6.5. La curva del lado izquierdo muestra el ajuste de los datos de absorbancia a 263 nm con un modelo que incluye dos complejos para Cd(II) y al lado derecho los espectros teóricos del complejo protonado y desprotonado así como la suma de ambos comparada con los datos experimentales.

En las titulaciones potenciométricas con adiciones de NaOH estándar a una mezcla del ligante HOxAPy con Cd(II) en relaciones equimolares (dentro de un intervalo de 1 a 10 mM) se pudo observar la desprotonación del complejo oximato. En la figura 8.5 se muestra un ejemplo del ajuste para una titulación del complejo entre HOxAPy y Cd(II).

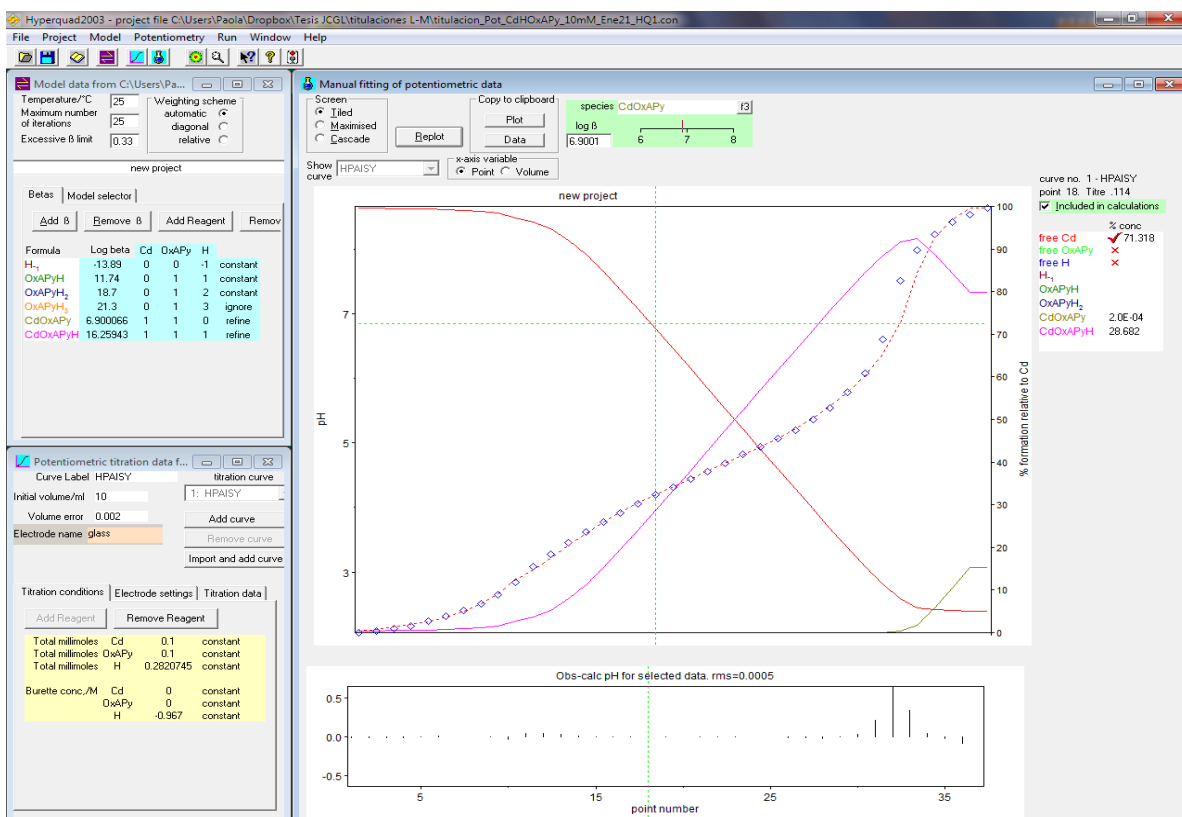
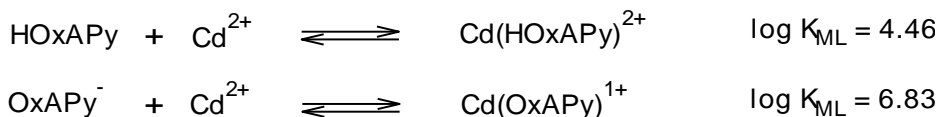


Figura 8.5. Ejemplo de curva de titulación con NaOH de la disolución acuosa de HOxAPy y Cd(II) 10 mM, NaCl 100 mM, 25°C, bajo flujo de N₂. Los datos potenciométricos se ajustaron en *Hyperquad* de acuerdo a un modelo que involucra la formación de dos complejos 1:1 con Cd(II): uno protonado y uno desprotonado.

Con esta forma de analizar los datos de las titulaciones, por potenciometría y por espectrofotometría, a varias condiciones, se obtuvo el valor promedio de los valores de los logaritmos de las constantes acumulativas de formación para la formación del complejo protonado y desprotonado. Entonces, en el caso de Cd(II) podemos decir que se observan únicamente dos complejos (esquema 8.2) y tal como cabe esperar, la constante de formación con el ligante aniónico es mayor que con el ligante neutro.



Esquema 8.2. Equilibrios y constantes de formación para los complejos con Cd(II).

A partir de las constantes de formación obtenidas se puede calcular el valor de la constante de disociación ácida para el complejo $\text{Cd}(\text{HOxAPy})^{2+}$, representado por el siguiente equilibrio:



Este valor de pK_a es importante porque si la especie $\text{Cd}(\text{OxAPy})^+$ es la especie cinéticamente activa, el perfil de pH de los experimentos de cinética debería dar el mismo valor de pK_a .

Para el caso de las titulaciones con $\text{Zn}(\text{II})$, por potenciometría y espectrofotometría, la forma de los perfiles obtenidos indica que se forma más de un complejo. El perfil de las titulaciones espectrofotométricas muestra dos regiones en las que se dan cambios opuestos en la absorbancia: durante las adiciones que van de 0 hasta aproximadamente 0.5 equivalentes de $\text{Zn}(\text{II})$ respecto a la HOxAPy se observa un decremento en la absorbancia a cada longitud de onda, mientras que al pasar los 0.5 equivalentes la absorbancia de la disolución vuelve a aumentar llegando a un valor límite en exceso de $\text{Zn}(\text{II})$ (figuras 8.6 A y B).

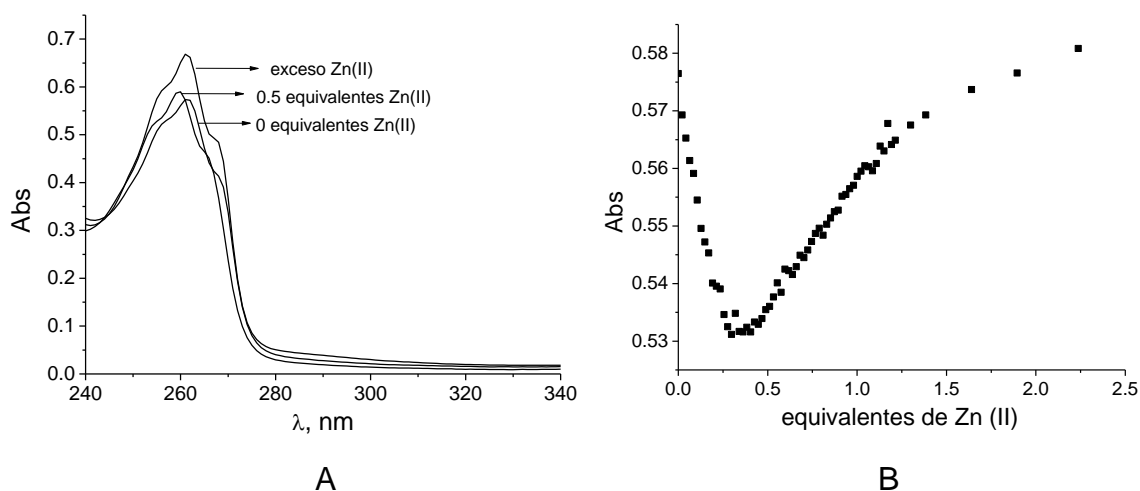


Figura 8.6. A. Se muestran como ejemplo tres espectros de la titulación con $\text{Zn}(\text{II})$, 0 equivalente de $\text{Zn}(\text{II})$, 0.5 equivalentes adicionados y un exceso de $\text{Zn}(\text{II})$. **B.** Gráfico de absorbancia a 265 nm vs equivalentes de $\text{Zn}(\text{II})$, se puede notar que hay al menos dos procesos de complejación distintos que se suceden en función de los equivalentes de $\text{Zn}(\text{II})$ agregados.

Para analizar estos datos, se probó primero el mismo modelo empleado con cadmio suponiendo que se forman dos complejos de Zn(II): uno con el ligante neutro y otro con el ligante desprotonado, pero los ajustes no fueron satisfactorios, seguramente por la presencia de más especies. Para incluir en las especies en disolución otros tipos de estequiometría los datos de las titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas ya no pueden ser ajustados en *Origin*, y el análisis final de los datos sólo se pudo hacer en *Hyperquad*. Después de probar muchos modelos se encontró que, efectivamente, es necesario plantear la presencia de más especies: un complejo con un metal y un ligante que se desprotona dos veces y complejos con un metal y dos ligantes que se desprotona una vez, además de los equilibrios ácido-base del ligante.

En las figuras 8.7 y 8.8 se muestran como ejemplos el ajuste de dos titulaciones, una espectrofotométrica y otra potenciométrica, en *Hyperquad* para la que se incluyen además de las constantes de protonación del ligante, las constantes de formación de cinco complejos con Zn(II): $Zn(H_2O)(HOxAPy)^{2+}$, $Zn(OH^-)(HOxAPy)^+$, $Zn(OH^-)(OxAPy)$, $Zn(HOxAPy)(HOxAPy)^{2+}$ y $Zn(HOxAPy)(OxAPy)^+$.

En este punto, vale la pena aclarar cuáles son los protones que se titulan, ya que el complejo de Zn(II) totalmente protonado puede tener dos alternativas para su primer equilibrio de disociación ácida, una en donde el grupo desprotonado es una molécula de agua unida al Zn(II) y el oximato continua protonado, $[Zn(OH^-)(HOxAPy)]^{1+}$, y otra en donde se desprotona el grupo oximato y la molécula de agua continua protonada, $[Zn(H_2O)(OxAPy)]^{1+}$. El segundo equilibrio de desprotonación produce en ambos casos la misma especie neutra, con ambos grupos desprotonados $[Zn(OH^-)(OxAPy)]$. Estos equilibrios se esquematizan en la figura 8.11. Ahora bien, aunque a partir de las titulaciones potenciométricas no es posible diferenciar cuál de las dos especies se forma en el primer equilibrio, sí es posible asignarlo mediante los datos de espectrofotometría UV-Vis, puesto que el segundo equilibrio genera el anión oximato desprotonado y esta banda es la que aparece entre 290-320 nm. Esto es congruente con el hecho de que en las titulaciones espectrofotométricas en las que se adiciona NaOH, a pH

básico, un ligero tono amarillento en la disolución, similar a lo observado cuando se titula el protón del grupo oximato. Por lo tanto, podemos decir que la primera desprotonación del complejo 1:1 corresponde a la formación de la especie $\text{Zn}(\text{OH}^-)(\text{HOxAPy})^+$ y la segunda desprotonación a la formación de $\text{Zn}(\text{OH}^-)(\text{OxAPy})$. El valor obtenido para el primer $\text{p}K_a$, 7.5, concuerda con los valores que reportan para la desprotonación de esta molécula de agua en otros complejos de $\text{Zn}(\text{II})$ [Yatsimirsky 2005].

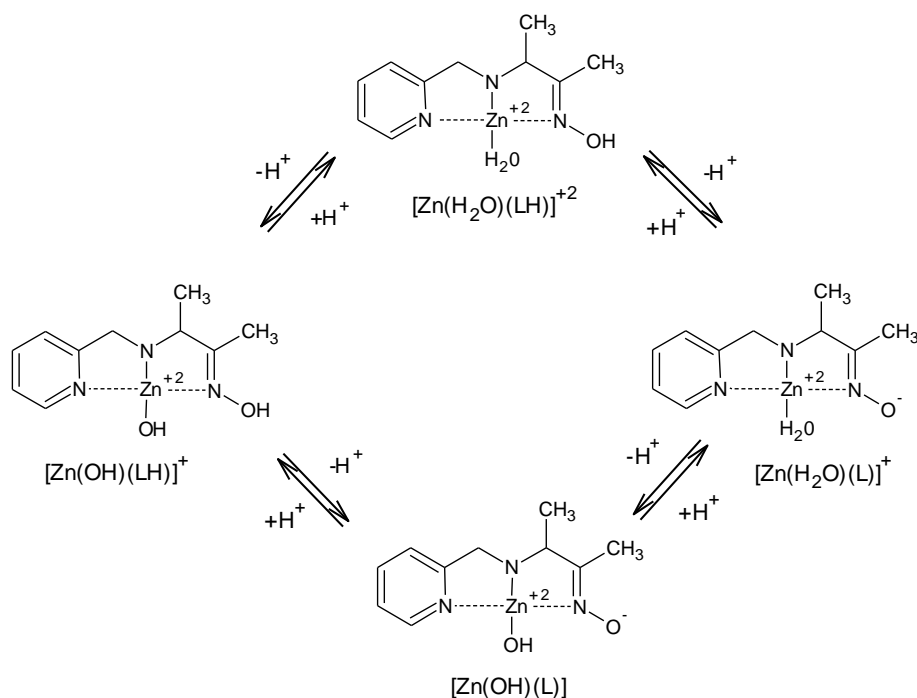


Figura 8.11. Esquema de los posibles equilibrios de acidez del complejo de la HOxAPy con $\text{Zn}(\text{II})$.

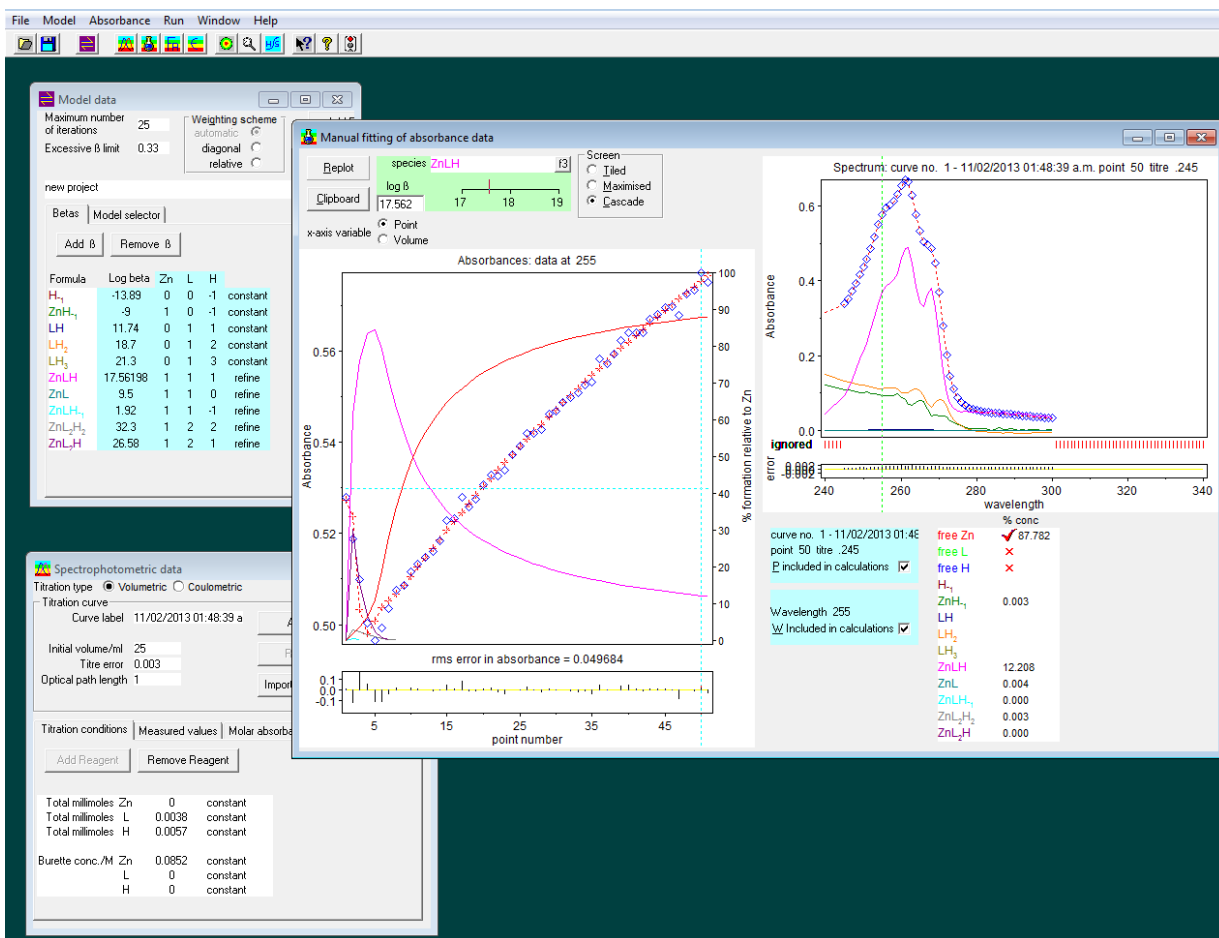


Figura 8.7. Ajuste de los datos de la curva de titulación espectrofotométrica de HOxAPy 0.15 mM con varias adiciones de Zn(II) en agua con MOPS 40 mM a pH 7.0 y 25°C. Titulante Zn(ClO₄)₂ 85.2 mM en agua a pH 6.0. La curva del lado izquierdo muestra el ajuste de los datos de absorbancia a 263 nm con un modelo que incluye dos complejos para Zn(II) y al lado derecho los espectros teóricos del complejo protonado y desprotonado así como la suma de ambos comparada con los datos experimentales.

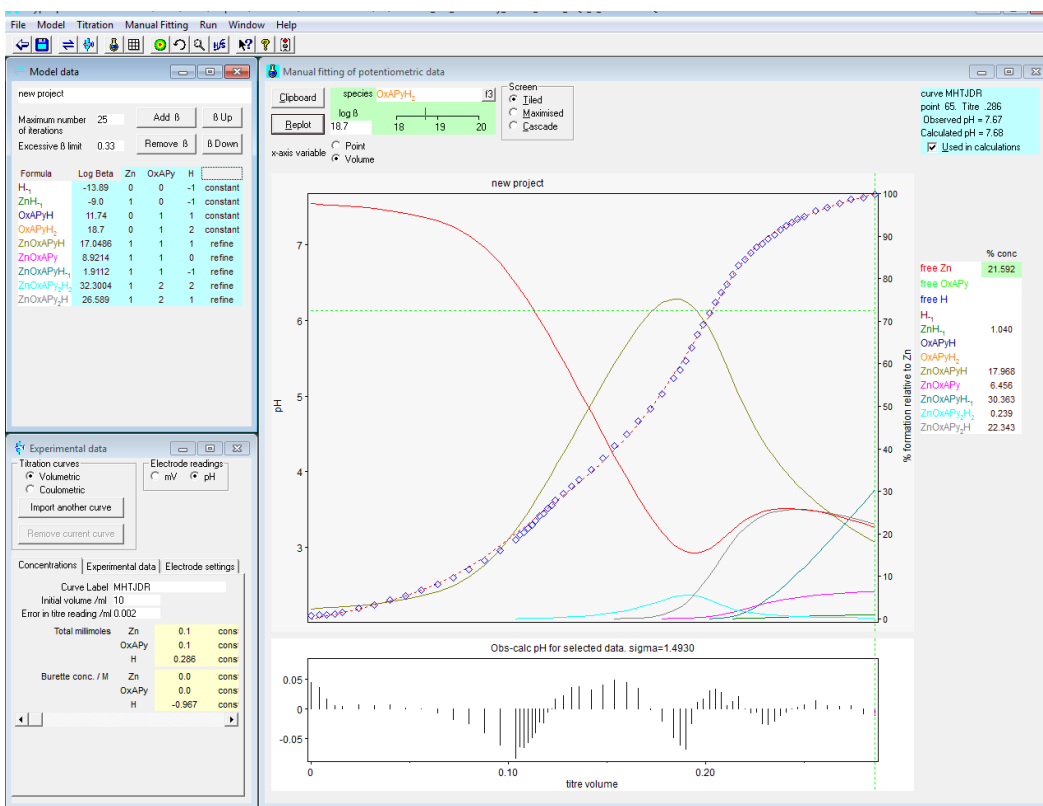
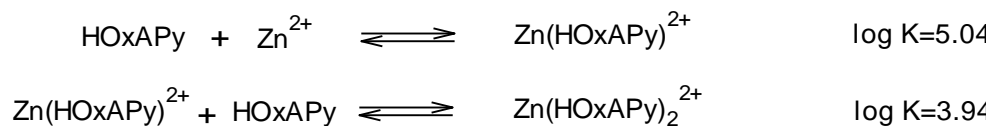
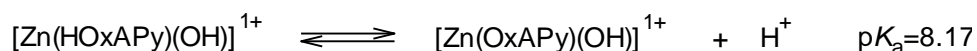
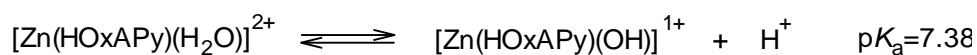


Figura 8.8. Curva de titulación potenciométrica de HOxAPy 10 mM con Zn(II) 10 mM con la adición de NaOH 0.967 M, NaCl 100 mM, 25°C, bajo flujo de N₂ en agua a 25°C.

Al igual que en el caso anterior, después de hacer el análisis de cada una de las titulaciones realizadas a las diferentes concentraciones y relaciones metal:ligante, se obtuvieron los valores promedio de los logaritmos de las constantes acumulativas de formación para la formación de los complejos de Zn(II). Así, para Zn(II) se obtienen los siguiente equilibrios de formación de complejos, esquema 8.3, y constantes de disociación ácida, esquema 8.4.



Esquema 8.3. Equilibrios y constantes de formación para los complejos con Zn(II).



Esquema 8.4. Equilibrios y constantes de disociación ácida para los complejos con Zn(II).

Para resumir los resultados encontrados en los equilibrios en disolución acuosa del ligante libre y sus complejos con Cd(II) y Zn(II), se enlistan a continuación las especies y sus correspondientes logaritmos de las constantes acumulativas de formación, $\log \beta$, tabla 8.0.

Tabla 8.0. Logaritmos de las constantes de formación acumulativas ($\log \beta$) para las especies en disolución acuosa de la HOxAPy libre y de sus complejos con Cd(II) y Zn(II), a 25°C y fuerza iónica 0.1 M.

Especie	$\log \beta$		
	Cd(II)	Zn(II)	H ⁺
H ₃ OxAPy			21.3
H ₂ OxAPy			18.7
HOxAPy			11.74
M(HOxAPy) ²⁺	16.2		
M(OxAPy) ¹⁺	6.83		
MOH ⁺	-10		
M(HOxAPy) ²⁺		16.78	
M[(HOxAPy)(HOxAPy)] ²⁺		32.46	
M[(OxAPy)(HOxAPy)] ²⁺		26.11	
[M(OH)(HOxAPy)] ¹⁺		9.4	
[M(OH)(OxAPy)]		1.23	

Todos los errores en los logaritmos de las constantes son menores a 0.1

De los valores de la tabla anterior se calculan los equilibrios correspondientes a la formación de las especies, como se muestra en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Constantes de formación y acidez para los equilibrios de los complejos con Cd(II) y Zn(II). 25°C y fuerza iónica 0.1 M.

Equilibrios de los complejos con Cd (II) y Zn (II)				log K	pK _a
HOxAPy	+	Cd(II)	\rightleftharpoons	Cd(HOxAPy) ²⁺	4.46
OxAPy ⁻	+	Cd(II)	\rightleftharpoons	Cd(OxAPy) ¹⁺	6.83
Cd(II)	+	OH ⁻	\rightleftharpoons	CdOH ⁺	-10
Cd(HOxAPy) ²⁺	\rightleftharpoons	Cd(OxAPy) ¹⁺ + H ⁺			9.37
Zn(II)	+	HOxAPy	\rightleftharpoons	Zn(HOxAPy) ²⁺	5.04
Zn(HOxAPy) ²⁺	+	HOxAPy	\rightleftharpoons	Zn(HOxAPy) ₂ ²⁺	3.94
Zn[(HOxAPy)(H ₂ O)] ¹⁺	\rightleftharpoons	Zn[(HOxAPy)(OH)] + H ⁺			7.38
Zn[(HOxAPy)(OH)] ¹⁺	\rightleftharpoons	Zn[(OxAPy)(OH)] + H ⁺			8.17

RMN ^1H

Adicionalmente, las titulaciones anteriores también se realizaron para su monitoreo mediante RMN ^1H . Se ajustaron las condiciones a pequeños volúmenes (700 μL) empleando una concentración 10 mM de HOxAPy a $\text{pH} = 7.0$ amortiguado con MOPS y en agua deuterada. Las adiciones de catión metálico se hicieron desde una disolución en 1.0 M en agua deuterada. Un inconveniente encontrado es que los percloratos y nitratos de los cationes metálicos están hexahidratados y eso produce que la señal del agua aumente en intensidad y se ensanche en el transcurso de la titulación. En ambos casos el catión se adiciona hasta alcanzar 2 equivalentes.

En la figura 8.12 y 8.13 se muestran los espectros de la titulación de HOxAPy con Cd(II) para las señales de los protones pertenecientes a los grupos metilos de la HOxAPy y en la figura 8.14 se muestran para los protones del grupo piridina.

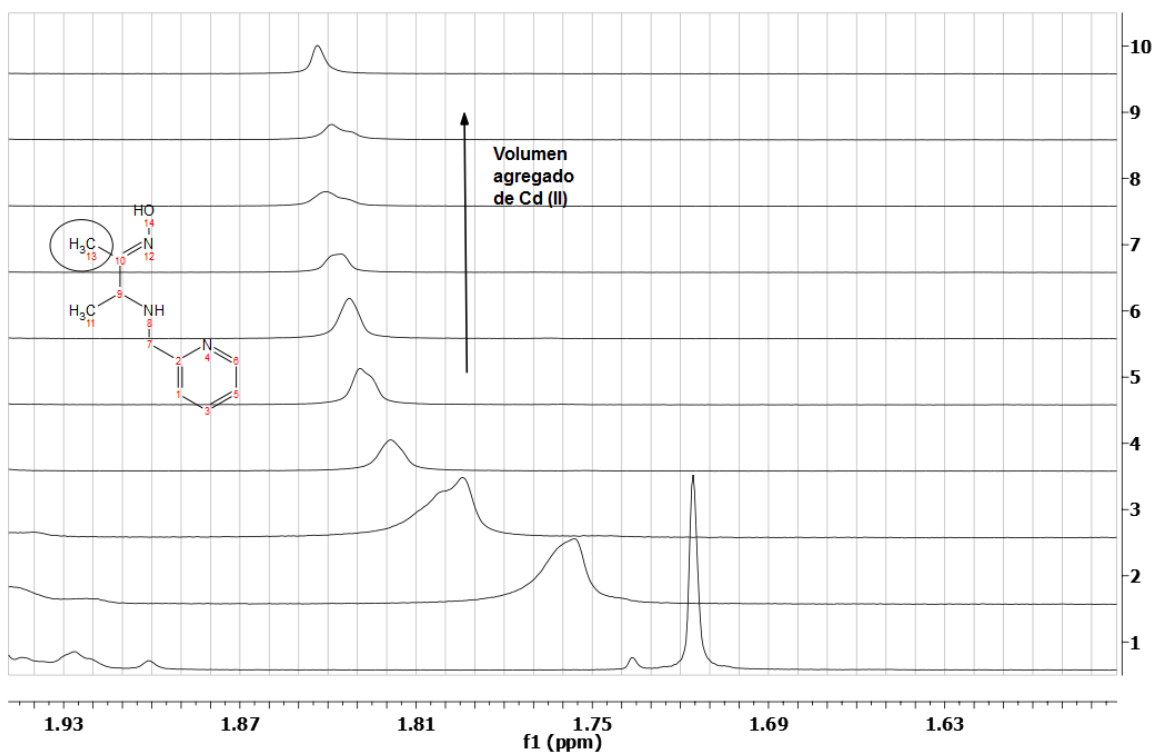


Figura 8.12. Cambio en las señales en los espectros ^1H RMN de los protones del metilo singulete durante la titulación con Cd(II).

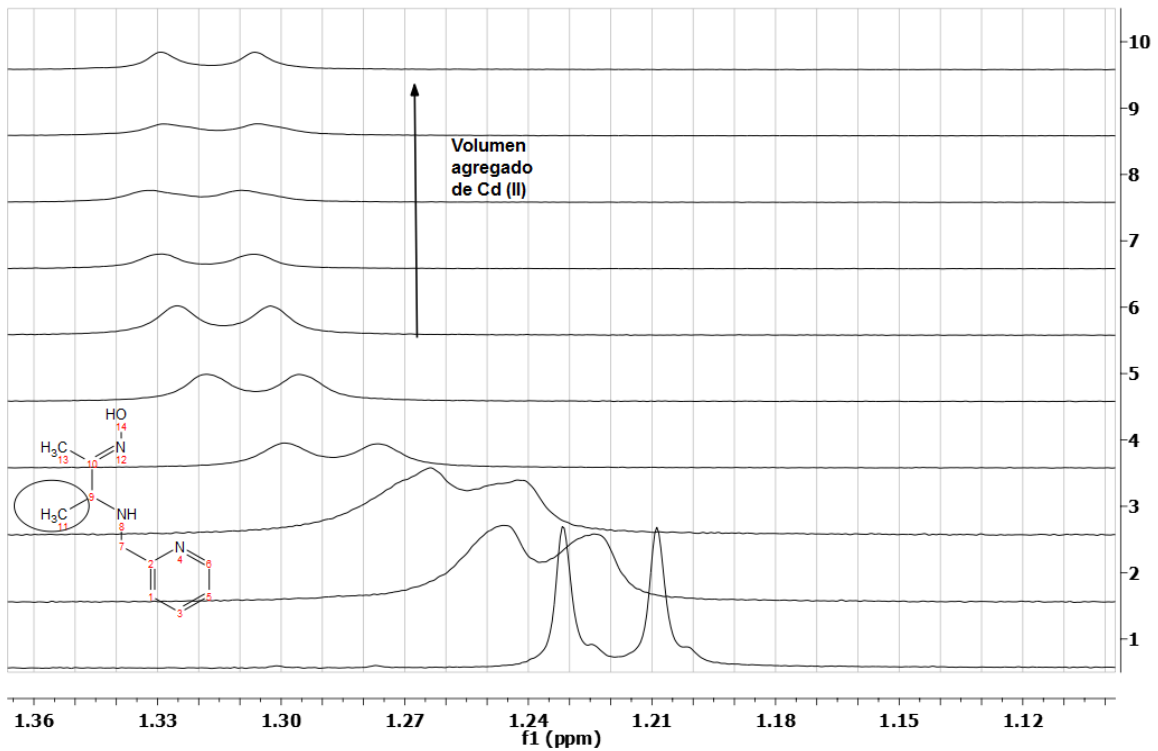


Figura 8.13. Cambio en las señales en los espectros ^1H RMN de los protones de los metilos doblete durante la titulación con Cd(II).

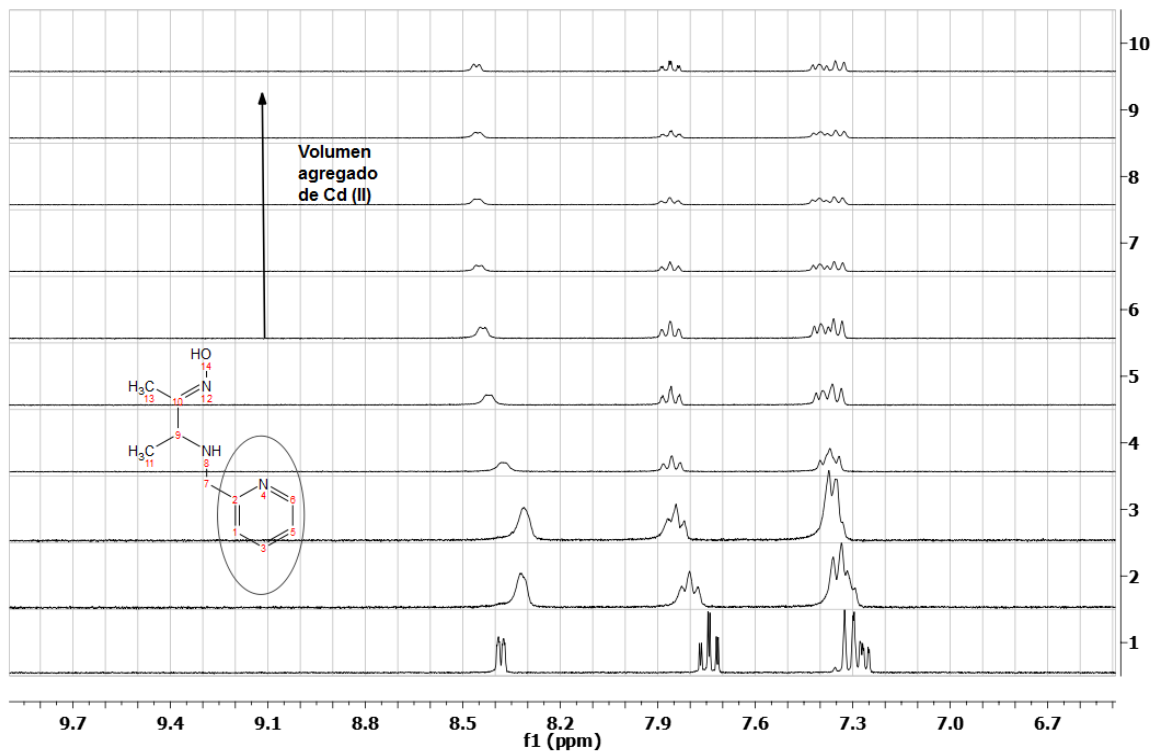


Figura 8.14. Cambios en las señales en los espectros RMN ^1H para los protones del grupo piridina durante la titulación con Cd(II).

Del análisis de los espectros anteriores es posible realizar el cálculo de la constante de formación K_{ML} entre HOxAPy y Cd(II) mediante un modelo de un complejo M:L 1:1. En la figura 8.15 se muestra el ajuste de los desplazamientos químicos (δ , ppm) de la señal del metilo singulete de la HOxAPy en función de $[Cd^{II}]_0$. El resultado es $\log K_{ML} = 4.2 M^{-1}$.

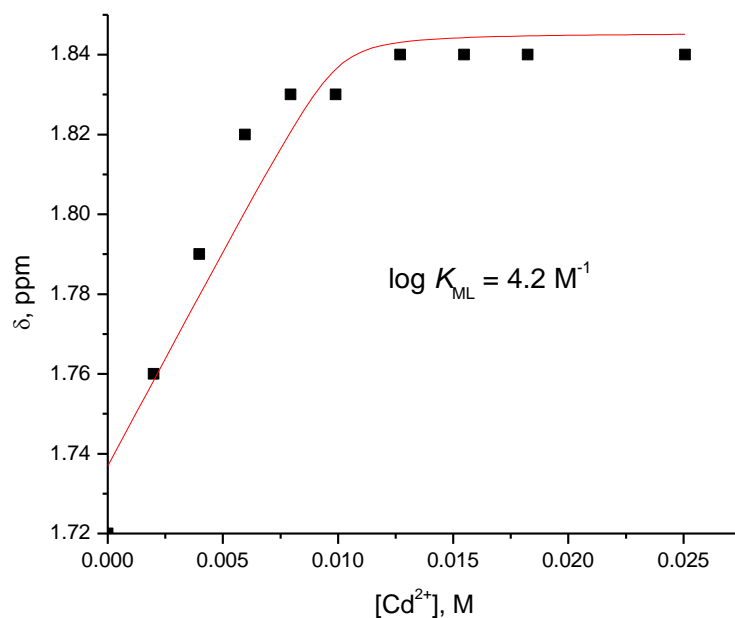


Figura 8.15. Ajuste de la relación entre los desplazamientos químicos (δ , ppm) de los protones del metilo singulete de la HOxAPy en función de $[Cd^{2+}]_0$ a un modelo de un complejo M:L 1:1.

Este resultado ($\log K_{ML} = 4.2$) es razonablemente cercano al obtenido mediante titulaciones espectrofotométricas ($\log K_{ML} = 4.46$).

En el caso de las titulaciones con Zn(II) también es evidente que hay un desplazamiento de las señales durante las sucesivas adiciones de Zn(II), y se analizaron las mismas señales que en el caso de la titulación con Cd(II). Los espectros RMN 1H obtenidos durante las titulaciones con Zn(II) se muestran a continuación (figuras 8.15 y 8.16).

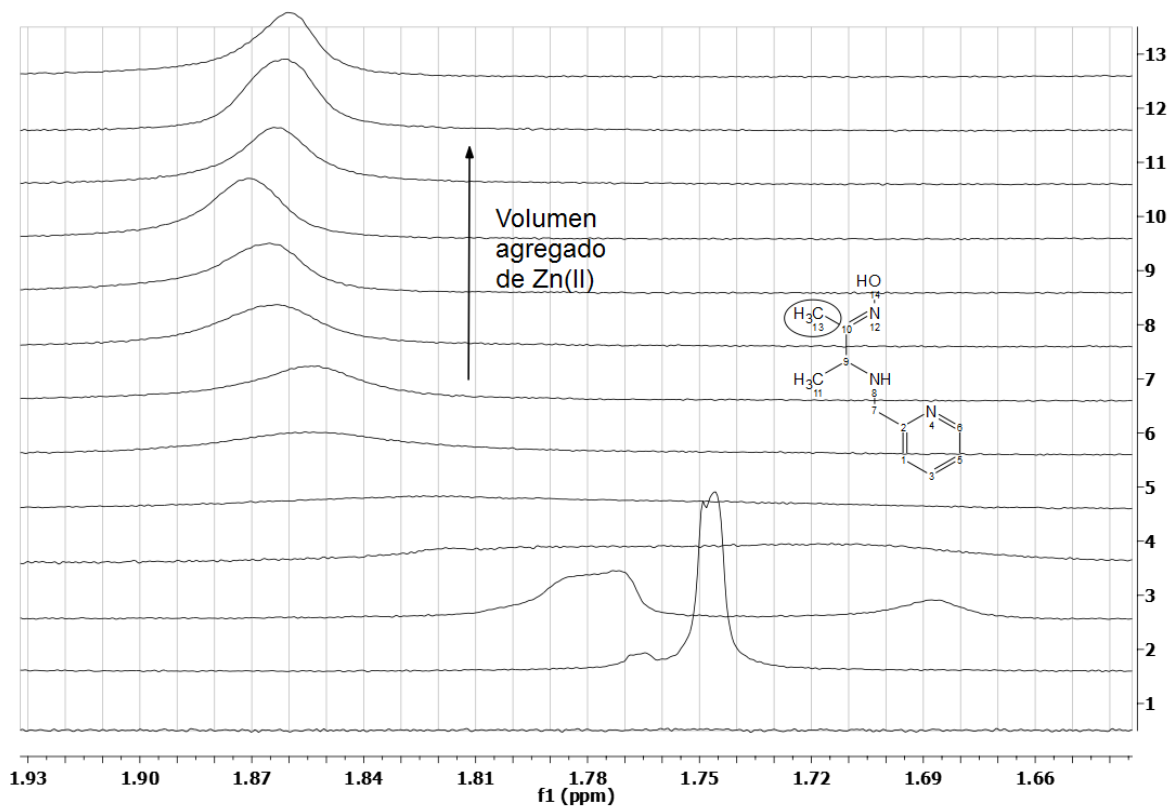
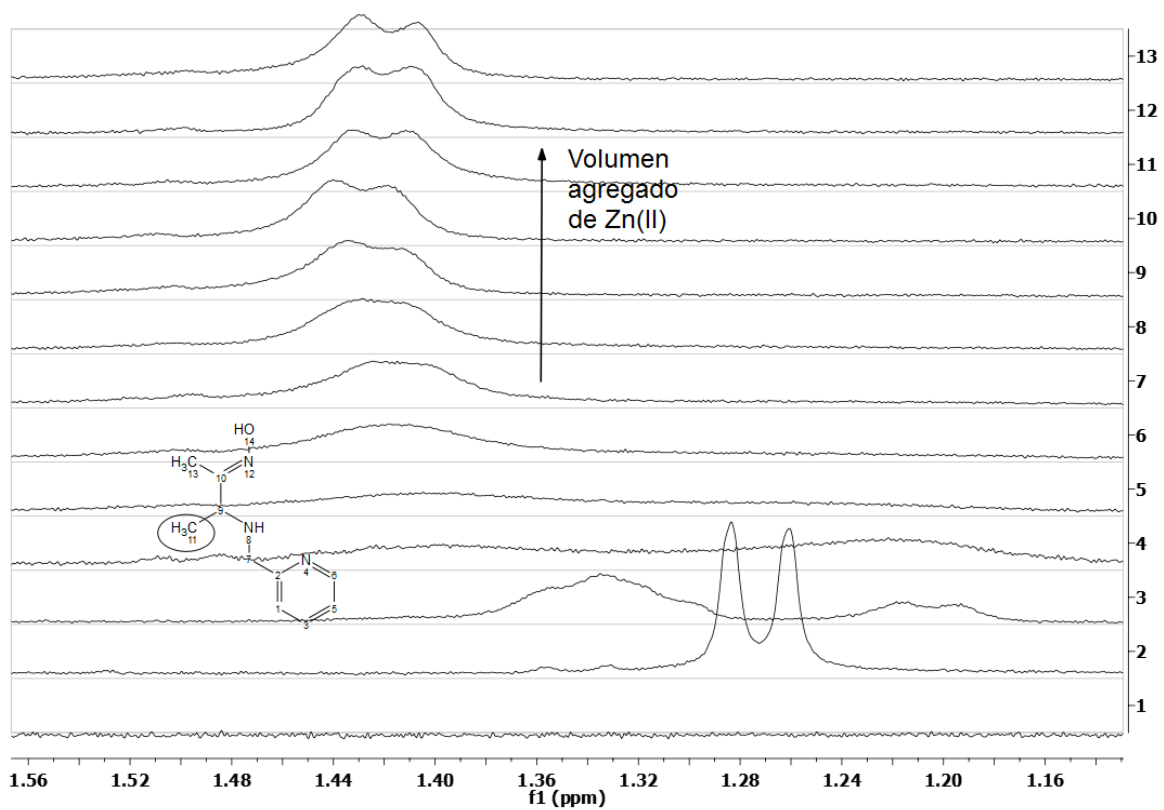


Figura 8.15. Cambio en las señales en los espectros RMN ^1H para los protones de los metilos doblete y singlete durante la titulación con Zn(II) , $\text{pH} = 7.0$, HOxAPy 10 mM y MOPS 10 mM.

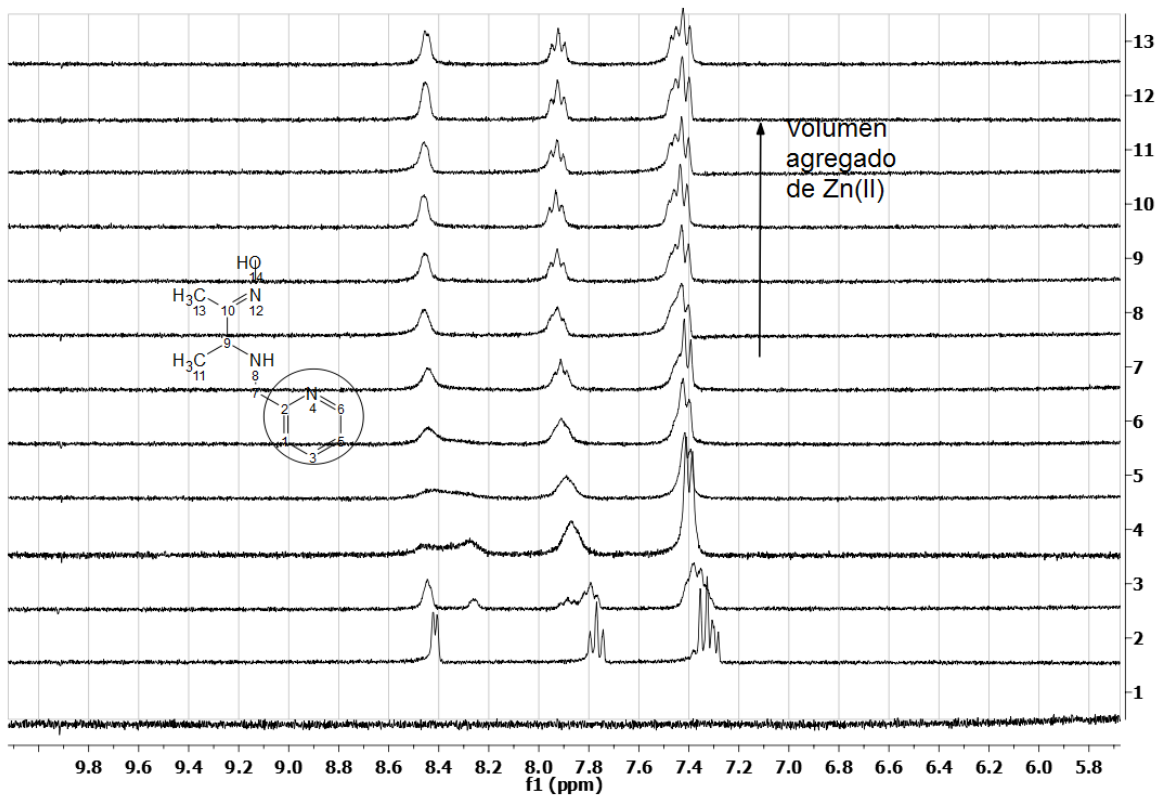


Figura 8.16. Cambio en las señales en los espectros RMN ^1H para los protones del grupo piridina durante la titulación con Zn(II) de abajo hacia arriba en la figura. $\text{pH} = 7.0$, HOxAPy 10 mM.

La adición de Zn(II) según sea el caso, modifica el desplazamiento de las señales debidas a los protones de los metilos (doblete y singulete) y de los protones del grupo piridina ante el cambio de ambiente por coordinación con la HOxAPy . A diferencia del caso de la titulación con Cd(II) en donde se puede apreciar un patrón de saturación que ajusta a un modelo M:L 1:1, el análisis con Zn(II) se dificulta por la presencia de un mayor número de complejos y porque las señales se ensanchan. Por lo tanto, lo único que se puede concluir es que el Zn(II) se compleja con el ligante y forma dos o más complejos diferentes.

9. Reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy

Se estudió la reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy frente al éster *p*-nitrofenilacetato (*p*-NFA) mediante reacciones de esterólisis monitoreadas a través de la detección del *p*-nitrofenolato en espectrofotometría UV-Vis. El sustrato *p*-NFA es un sustrato modelo empleado desde los años 60's en estudios de reactividad nucleofílica (Jencks 1962). Este sustrato es ampliamente utilizado porque su hidrólisis produce el *p*-nitrofenol, el cual se encuentra en equilibrio con su forma desprotonada, el anión *p*-nitrofenolato de color amarillo intenso, del cual se puede monitorear su producción en función del tiempo mediante espectrofotometría UV-visible. Como el pK_a del nitrofenol es 7.04 en agua (Martell 1989) es posible seguir el curso de su ruptura desde valores de pH ligeramente ácidos hasta muy básicos. El objetivo de estos experimentos es calcular la reactividad intrínseca del nucleófilo OxAPy⁻ y establecer comparaciones entre los resultados aquí obtenidos y otros oximatos reportados en la literatura para decidir si la HOxAPy puede definirse como α -nucleófilo. Dicha definición implica que el oximato OxAPy⁻ como base conjugada de la HOxAPy, puede considerarse α -nucleófilo si presenta una reactividad nucleofílica mayor que la de nucleófilos convencionales. Un parámetro de comparación aceptado para catalogar a la oxima como un α -nucleófilo, es que su reactividad debe ser del orden o mayor que la del anión OH⁻ libre, que para el sustrato *p*-NFA en agua a 25°C es de 14.7 M⁻¹s⁻¹. La propiedad que se determina para establecer esta comparación es la k_{Ox} , conocida como *constante de oximinólisis* o *constante de reactividad intrínseca*, en unidades M⁻¹s⁻¹. Se trata de una constante de rapidez de segundo orden que no depende del pH y por consecuencia no depende de la concentración del oximato, de ahí que se le llame "intrínseca". Adicionalmente se espera que exhiba el efecto de nivelación en las coordenadas de Brønsted para oximas de $pK_a \geq 8$.

A continuación se describe la forma en la que se determinó la reactividad del anión oximato de la HOxAPy así como el pK_a de la especie cinéticamente activa y compararlo con el obtenido mediante las titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas.

Dependencia de la rapidez de reacción con respecto a la concentración de HOxAPy.

La concentración del oximato depende del pH del medio y la concentración total $[HOxAPy]_0$. La fracción desprotonada de la oxima será mayor a medida que el pH del medio es más cercano al pK_a de la HOxAPy y también será mayor mientras incrementamos $[HOxAPy]_0$ a un mismo valor de pH. Generalmente la reacción de esterólisis del *p*-NFA a pH constante sigue la siguiente ecuación cinética, ecuación 9.0, una vez que se ha restado la contribución del OH^- del medio [Breslow 1965, Suh 1992, 1984, Yatsimirsky 1992, 1998].

$$\frac{d[p - NF^-]}{dt} = k[p - NFA][OxAPy^-] \quad \text{Ecuación 9.0}$$

A valores ligeramente básicos de pH se espera que la hidrólisis básica del sustrato, esto es con OH^- como nucleófilo, sea pequeña, pero aumenta mucho a medida que el pH es más básico. Por ejemplo, a pH 8.0 se espera una k_{obs} de hidrólisis alcalina de $1.47 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ mientras que a pH 11.0 es 1000 veces mayor, $1.47 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, ($k_{OH} 14.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), por lo tanto fue necesario cuantificar a cada pH la contribución de la hidrólisis alcalina y restarla de la constante de velocidad observada. Por otro lado, trabajando a concentraciones en las que el nucleófilo se encuentre en exceso respecto al sustrato, el cambio en la concentración del nucleófilo (por el que se podría quedar acilado) es despreciable y podemos obtener un perfil cinético ajustable a una ecuación de primer orden de donde se obtiene la constante de velocidad observada k_{obs} , s^{-1} .

Así, para determinar la constante de oximinólisis se realizaron series de cinéticas variando la concentración total de la $[HOxAPy]_0$ a pH fijo (la contribución de OH^- es la misma a cada concentración de oxima), se determinó a cada concentración de oxima la constante de rapidez observada k_{obs} , y posteriormente se analizó el perfil de k_{obs} en función de la $[HOxAPy]_{total}$. Esta misma metodología se aplica a varios valores de pH.

Al variar la concentración de la oxima a un pH fijo, la relación entre la concentración del ion oximato $OxAPy^-$ y la oxima HOxAPy es constante y aumenta

al elevarse el valor de pH, por lo que al ir aumentando el pH se obtienen datos a diferentes relaciones oximato/oxima. Es deseable llegar a valores de pH que estén dos unidades por encima de su pK_a en donde el 99% de la oxima está en su forma aniónica para tener un perfil completo de pH. Sin embargo el valor de pK_a determinado mediante titulaciones potenciométricas nos indica que la oxima tiene un $pK_a = 11.74$ necesitaríamos realizar experimentos a valores de $pH = 13.74$, que por un lado no se puede alcanzar en agua, y por otro, como la rapidez de reacción observada es la suma de las contribuciones de los iones oximato y OH^- presentes, a medida que aumenta el pH, la concentración de OH^- es mayor y por lo tanto la contribución a la hidrólisis del *p*-NFA proveniente de los aniones OH^- es muy grande, por lo que sumada a la contribución a la hidrólisis del anión oximato da como resultado constantes de velocidad observadas demasiado grandes para ser monitoreadas en un espectrofotómetro UV-vis (se requeriría monitorearlas en un stopped-flow). Además, como se espera que la reactividad intrínseca los iones oximato y OH^- presentes sean al menos del mismo orden de acuerdo a lo reportado en la literatura para varias oximas, para ver un cambio en la constante de rapidez observada debido a la contribución del anión oximato, sería necesario que la concentración de éste sea igual o mayor que la de OH^- lo cual se dificulta en la práctica.

Adicionalmente en este procedimiento se va a comprobar cuál es el orden cinético para el anión oximato. Si al variar la concentración total de la oxima $[HOxAPy]_0$ a un valor de pH fijo se observa una dependencia lineal k_{obs} vs $[HOxAPy]_0$ se confirma que la reacción con respecto del anión oximato es de primer orden a las condiciones de trabajo.

Los valores de k_{obs} en función de $[HOxAPy]_0$ se ajustaron mediante regresiones lineales en donde el valor de la pendiente significa el valor de la constante de segundo orden a ese valor de pH, k'_{ox} y la ordenada al origen significa la contribución del OH^- . En la tabla 9.0 como ejemplo se muestran los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de la oxima HOxAPy a pH 10.3, y en la figura 9.0 se muestra el ajuste lineal donde la constante de oximinólisis a este pH, k'_{ox} , tiene un valor de $2.17 \pm 0.15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tabla 9.0. Dependencia de k_{obs} en función de la concentración de la oxima en la esterólisis de *p*-NFA 0.05 mM a pH 10.3, CAPS 100 mM, 25°C.

[HOxAPy] ₀ , M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}, \pm \text{ds}$
0	$0.00196 \pm 4.14 \times 10^{-6}$
0.00129	$0.0091 \pm 7.87 \times 10^{-6}$
0.00259	$0.01226 \pm 4.91 \times 10^{-6}$
0.0038	$0.01536 \pm 3.80 \times 10^{-6}$
0.00518	$0.01826 \pm 4.17 \times 10^{-6}$
0.00637	$0.02079 \pm 1.00 \times 10^{-5}$
0.00777	$0.02495 \pm 9.2 \times 10^{-6}$
0.00863	$0.02742 \pm 5.44 \times 10^{-6}$

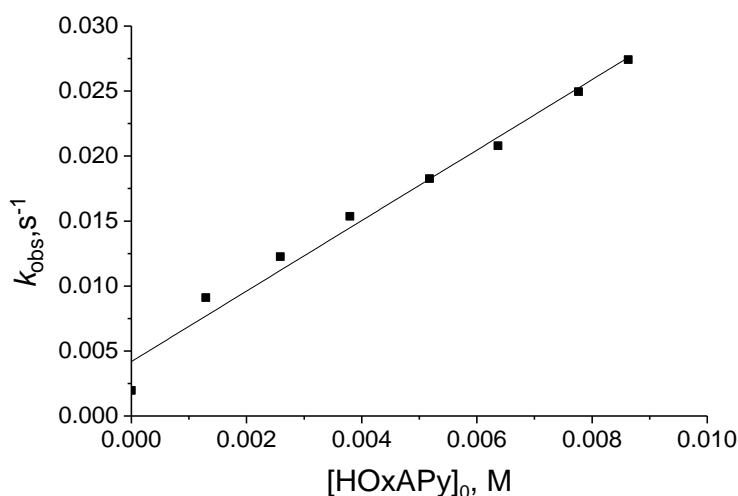


Figura 9.0. Constantes de rapidez observadas en la esterólisis de *p*-NFA en función de la concentración inicial de la oxima HOxAPy, pH 10.3, *p*-NFA 0.05 mM, CAPS 100 mM, 25°C. La línea continua muestra el ajuste lineal. k'_{ox} tiene un valor de $2.17 \pm 0.15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La ordenada al origen significa la contribución del medio a la esterólisis.

Estos experimentos se repitieron a valores de pH 8.6, 9.0, 9.5, 9.8, 10.0, 10.13, 10.6, 11.0, 11.3 y 11.6, en los que se utilizó CHES o CAPS como amortiguadores de pH, 100 mM. La metodología para analizar los datos obtenidos fue igual a la descrita para los experimentos realizados a pH 10.3. Las k_{obs} se calcularon mediante el método integral ajustando los datos a una ecuación de cinética de primer orden y estas constantes se graficaron en función de la concentración de la oxima $[\text{HOxAPy}]_0$ a cada valor de pH. La constante de oximinólisis k'_{ox} para cada

valor de pH se obtuvo como la pendiente del ajuste lineal. Las k_{obs} a cada valor de concentración total de $[HOxAPy]_0$ para una serie de experimentos a diferentes valores de pH se muestran en las tablas 9.1 a 9.3 y sus respectivas gráficas en función de la concentración total de $[HOxAPy]_0$ en las figuras 9.1 a 9.3.

Tabla 9.1. Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de *p*-NFA 0.05 mM a pH 10.6, CAPS 100 mM, 25°C.

$[HOxAPy]_0$, M	k_{obs} s ⁻¹ , ± ds
0	$0.00488 \pm 6.62 \times 10^{-6}$
0.00259	$0.01975 \pm 1.77 \times 10^{-5}$
0.00518	$0.03617 \pm 2.14 \times 10^{-5}$
0.01295	$0.07639 \pm 5.44 \times 10^{-5}$
0.01553	$0.09052 \pm 7.96 \times 10^{-5}$
0.01812	$0.10461 \pm 9.47 \times 10^{-5}$

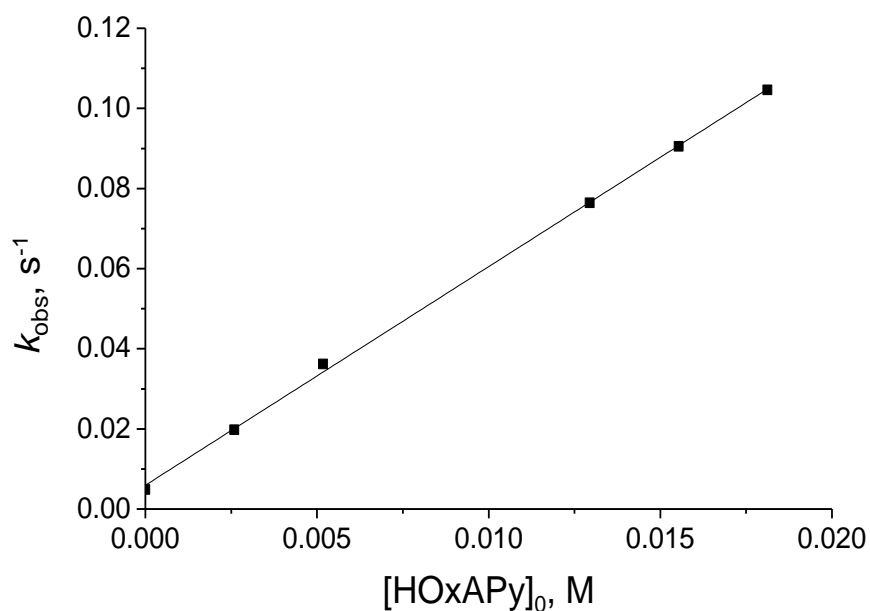


Figura 9.1. Constantes de rapidez observadas en la esterólisis de *p*-NFA en función de la concentración de la oxima HOxAPy, pH 10.6, *p*-NFA 0.05 mM, CAPS 100 mM, 25°C. La línea continúa muestra el ajuste lineal. k'_{ox} tiene un valor de 5.46 ± 0.068

Tabla 9.2. Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de *p*-NFA 0.05 mM a pH 8.6, CHES 100 mM, 25°C.

[HOxAPy], M	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}, \pm \text{ds}$
0.00086	$3.35 \times 10^{-4} \pm 5.04 \times 10^{-7}$
0.00129	$4.04 \times 10^{-4} \pm 7.73 \times 10^{-7}$
0.00173	$5.05 \times 10^{-4} \pm 8.74 \times 10^{-7}$
0.00259	$5.79 \times 10^{-4} \pm 4.26 \times 10^{-7}$
0.00302	$5.85 \times 10^{-4} \pm 4.03 \times 10^{-7}$
0.00345	$6.86 \times 10^{-4} \pm 9.46 \times 10^{-7}$
0.00432	$8.20 \times 10^{-4} \pm 6.31 \times 10^{-7}$

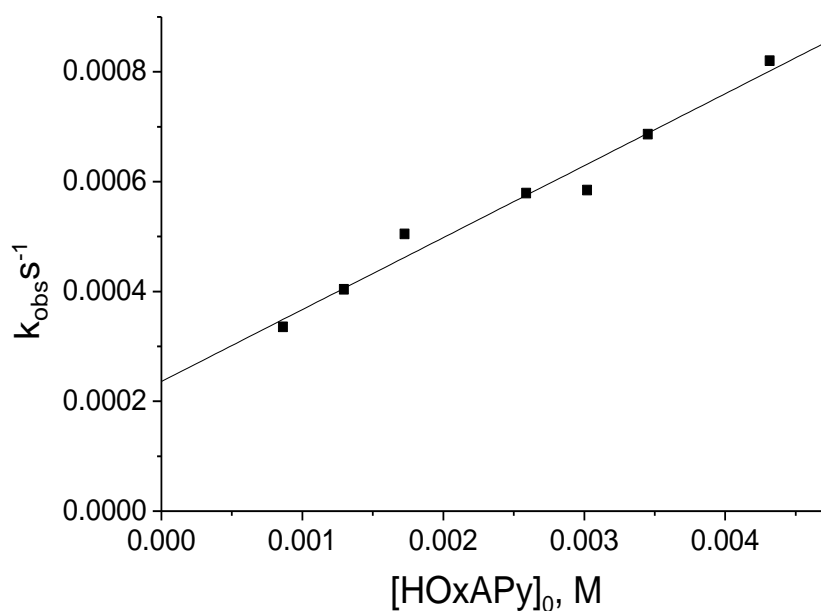


Figura 9.2. Constantes de rapidez observadas en la esterólisis de *p*-NFA en función de la concentración de la oxima HOxAPy, pH 8.6, *p*-NFA 0.05 mM, CHES 100 mM, 25°C. La línea continúa muestra el ajuste lineal. k'_{ox} tiene un valor de $0.120 \pm 0.005 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabla 9.3. Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de *p*-NFA 0.05 mM a pH 9.5, CAPS 100 mM, 25°C.

$[\text{HOxAPy}]_0, \text{M}$	$k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}, \pm \text{ds}$
0	$3.7493 \times 10^{-4} \pm 1.04 \times 10^{-6}$
0.0005	$7.0397 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-6}$
0.001	$7.9325 \times 10^{-4} \pm 9.58 \times 10^{-7}$
0.0015	$9.3462 \times 10^{-4} \pm 9.10 \times 10^{-7}$
0.002	$0.00121 \pm 7.80 \times 10^{-7}$
0.0025	$0.00134 \pm 5.20 \times 10^{-7}$
0.0030	$0.00153 \pm 4.10 \times 10^{-7}$
0.0035	$0.00166 \pm 3.70 \times 10^{-7}$

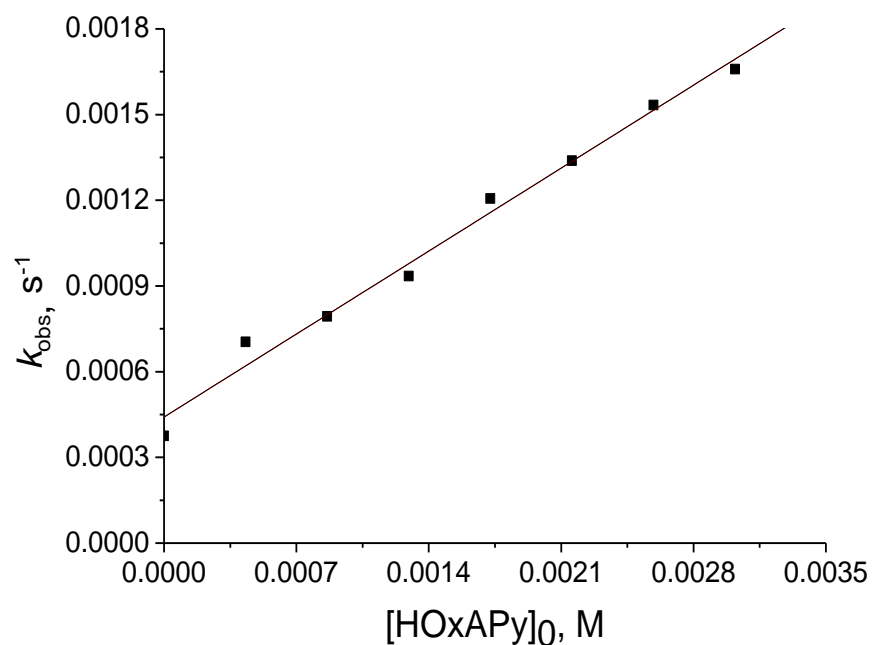


Figura 9.3. Constantes de rapidez observadas en la esterólisis de *p*-NFA en función de la concentración de la oxima HOxAPy, pH 9.5, *p*-NFA 0.05 mM, CAPS 100 mM, 25°C. La línea continúa muestra el ajuste lineal. k'_{ox} tiene un valor de $0.41 \pm 0.02 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En los datos correspondientes a valores de pH por arriba de 11 y con concentraciones totales de la oxima desde 1 mM se observan tiempos de vida media ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}}$) que alcanzan el orden de 20 segundos o menos, las reacciones son muy rápidas por lo que se realiza un promedio de varias repeticiones para cada punto.

La tabla 9.4 reúne las constantes de segundo orden, k'_{Ox} , para cada uno de los valores de pH estudiados. Se observa una dependencia del pH en el sentido de aumento del valor de k'_{Ox} con el aumento de pH. Esto se debe a que la especie nucleofílica es el anión oximato, cuya concentración depende del pK_a de la oxima HOxAPy.

Tabla 9.4. Constantes de oximinólisis, k'_{Ox} , a diferentes valores de pH, en la hidrólisis de *p*-NFA 0.05 mM, CAPS o CHES 100 mM, 25°C.

pH	$k'_{Ox}, M^{-1}s^{-1}$	pH	$k'_{Ox}, M^{-1}s^{-1}$	pH	$k'_{Ox}, M^{-1}s^{-1}$
8.5	0.072	10	1.534	11.3	17.640
9	0.159	10.13	2.517	11.6	24.086
9.2	0.265	10.3	3.150	-	-
9.5	0.526	10.62	6.339	-	-
9.8	1.427	11	11.879	-	-

La determinación de la constante de oximinólisis independiente del pH puede obtenerse relacionando los datos de k'_{Ox} como función del pH. Estos datos cinéticos se espera que sigan una curva sigmoideal similar a la de una curva de titulación de donde es posible obtener el pK_a de la HOxAPy del punto de inflexión de la curva. También podría observarse una tendencia a la “saturación” a medida que la concentración del anión oximato se aproxima a la concentración total inicial de la oxima, lo cual se muestra en la ecuación 9.1 (consultar Apéndice). El ajuste de los datos se muestra en la figura 9.4 de donde el valor de pK_a determinado cinéticamente es de 11.7 ± 0.2 y la constante de oximinólisis independiente del pH tiene un valor de $k_{Ox} = 84 \pm 2 M^{-1}s^{-1}$.

$$\log k_{Ox}' = \log k_{Ox} - \log[1 + (10 - pH)/K_a] \quad \text{Ecuación 9.1}$$

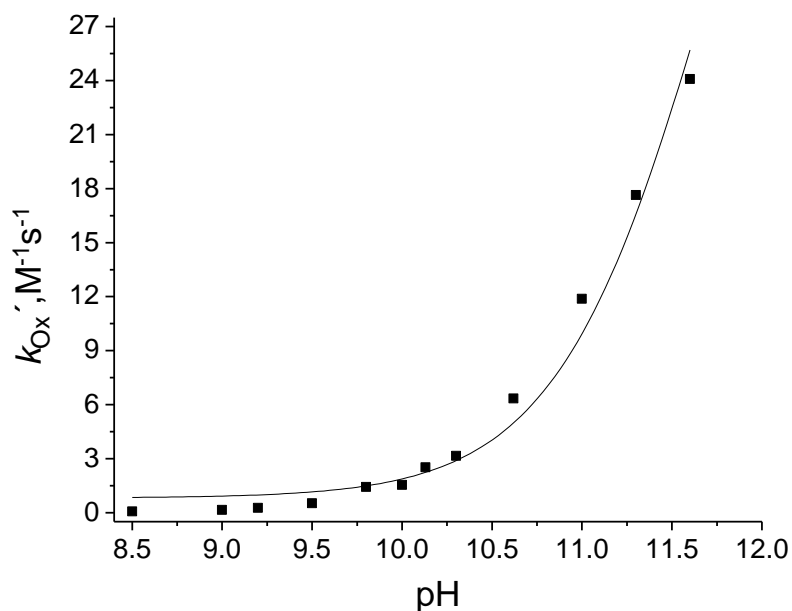


Figura 9.4. Cálculo de constante de oximinólisis k_{Ox} para HOxAPy ante *p*-NFA como sustrato con los datos de la tabla 10.4. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 9.1. Se obtuvo la constante de oximinólisis $k_{Ox} = 84 \pm 2 M^{-1} s^{-1}$ y $pK_a = 11.7 \pm 0.2$.

El valor de pK_a determinado mediante estudios cinéticos de esterólisis es 11.7 ± 0.2 . El cálculo de reactividad intrínseca del oximato OxAPy⁻ es $k_{Ox} = 84 \pm 2 M^{-1} s^{-1}$, este valor comparado con el de otras piridín oximas (ver tabla 3.1) nos permiten decir que el ligante HOxAPy se comporta como un α -nucleófilo en la esterólisis de *p*-NFA.

Este resultado nos indica que hay una especie con pK_a 11.7, que es responsable de la hidrólisis del *p*-NFA. Para confirmar cuál es la especie cinéticamente activa, es necesario analizar de manera conjunta los resultados de cinética y las especies presentes en disolución establecidas mediante titulaciones espectrofotométricas y potenciométricas.

Para ejemplificar este análisis, se tomarán los valores promedio de k_{obs} a concentración fija del ligante, 1 mM, en función del pH (a cada valor de pH se realizaron mediciones por triplicado). Los valores de k_{obs} a cada valor de pH reflejan la suma de todas las contribuciones de los nucleófilos presentes en disolución. En este caso es sencillo imaginar que estas contribuciones nucleofílicas podrían venir del amortiguador empleado, del anión oximato OxAPy⁻

y del anión OH^- , y que estas contribuciones son mayores a medida que incrementa el pH. Por lo tanto, lo primero que hay que hacer es eliminar la contribución de OH^- y del medio de reacción. Esto se hace realizando a cada valor de pH una reacción de esterólisis con $[\text{HOxAPy}]_0 = 0 \text{ mM}$, haciendo una curva para la contribución del medio y finalmente restando el valor de k'_{OH} obtenido al de k_{obs} para obtener así una k_{corr} (corregida) que sólo incluya la contribución de las especies diferentes al medio de reacción, que en este caso debería ser únicamente el anión oximato. En la figura 9.5 se muestran los resultados obtenidos y se puede apreciar que la contribución del OH^- no es despreciable, es incluso del mismo orden que la contribución del oximato, por ello es muy importante restarla.

$$k_{\text{corr}} = k_{\text{obs}} - k'_{\text{OH}} \quad \text{Ecuación 9.2}$$

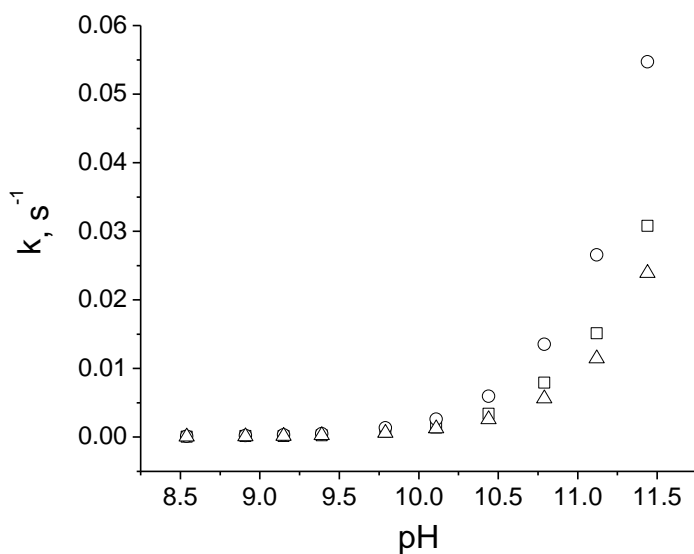


Figura 9.5. Para cada valor de pH se muestran tres series de valores: (\circ) k_{obs} con $[\text{HOxAPy}]_0 = 1 \text{ mM}$, (Δ) k'_{OH} sin HOxAPy, (\square) $k_{\text{corr}} = k_{\text{obs}} - k'_{\text{OH}}$.

Posteriormente, se correlaciona esta constante de velocidad observada y corregida, k_{corr} , con la concentración del oximato libre a las condiciones del experimento en cinética. Estos valores de concentración se obtienen del diagrama de especiación para OxAPy^- calculado con los valores de $\text{p}K_a$ obtenidos a partir de los estudios potenciométricos y espectrofotométricos. La figura 9.6

muestra el gráfico en función del pH de la distribución de la especie OxAPy^- calculada para HOxAPy 1mM en el eje del lado izquierdo y las constantes de rapidez corregidas, k_{corr} en s^{-1} en el eje del lado derecho. En esta gráfica es claro que hay una correlación entre las constantes de velocidad obtenidas y la concentración del anión oximato.

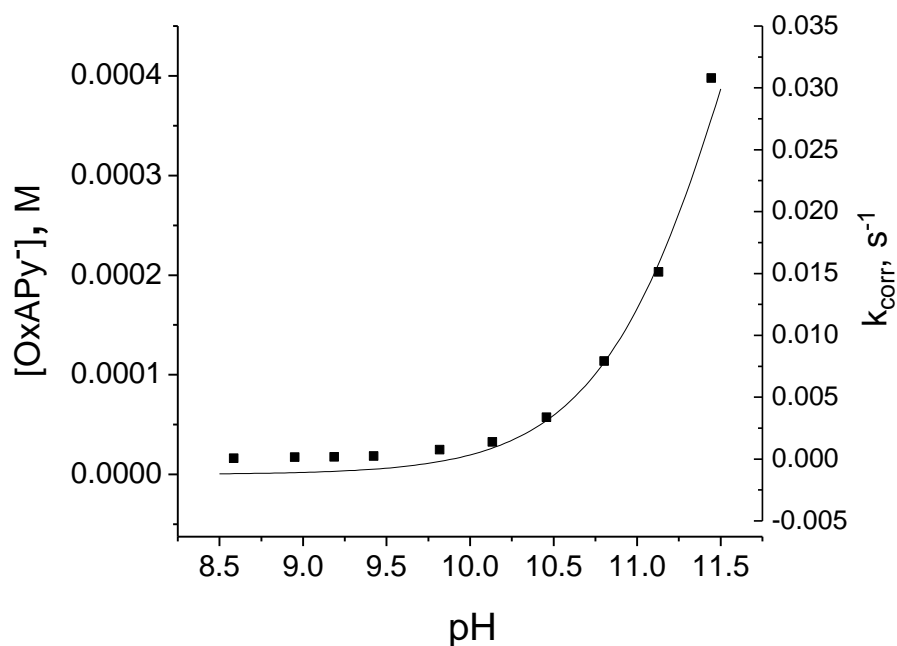


Figura 9.6. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} según la ecuación 9.2. La línea continua representa la distribución de OxAPy^- en mol/L calculada para $[\text{HOxAPy}]_0 = 1 \text{ mM}$ y $\text{p}K_a = 11.74$. La distribución de especies fue obtenida con el programa Hyss 2009.

Otra forma de confirmar la correlación entre las constantes de velocidad obtenidas y la concentración del anión oximato es graficando k_{corr} vs $[\text{OxAPy}^-]$, donde se observa una relación lineal, figura 9.7.

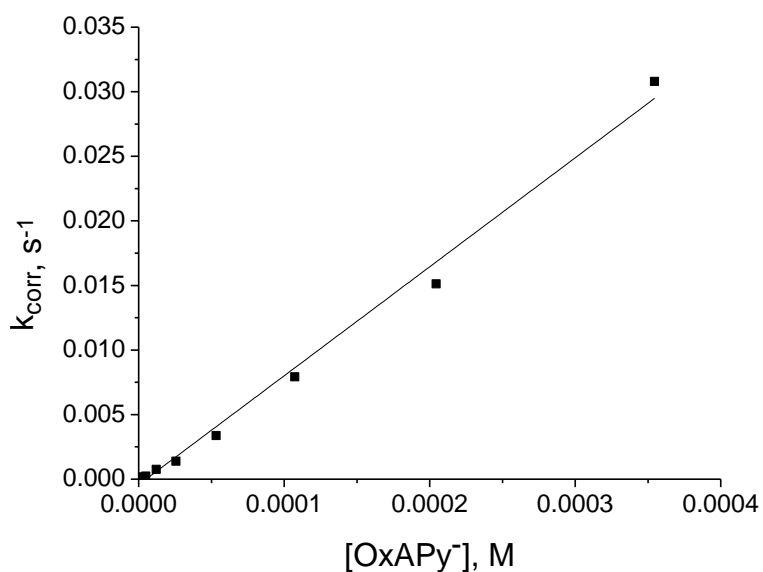


Figura 9.7. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} según la ecuación 9.2. Los valores de $[\text{OxAPy}^-]$ fueron calculados desde la distribución de especies.

Estos resultados son congruentes con el mecanismo de ruptura del *p*-NFA propuesto en la literatura para otras piridín oximas, [Breslow 1965, Suh 1992, 1984, Yatsimirsky 1992, 1998], figura 9.8. En este mecanismo, hay tres etapas principales:

1. La desprotonación de la oxima para dar el anión oximato
2. El ataque nucleofílico del anión oximato al carbono carbonílico éster *p*-NFA, con la consecuente ruptura del éster que da como productos la oxima dapdOMe acetilada y *p*-nitrofenol.
3. La hidrólisis del grupo acilo que se queda unido al oximato

Bajo las condiciones de estos experimentos, en presencia de un exceso de oximato, se observa la liberación de todo el nitrofenol correspondiente a la cantidad utilizada de *p*-NFA (0.05 mM), y un equivalente de oximato puede quedar acilado o no, sin que la concentración inicial de oximato cambie notablemente. Por esto sólo se pueden comprobar así las primeras dos etapas. Para ver la tercera etapa, desacilación del oximato, es necesario hacer experimentos en presencia de

un exceso de sustrato y entonces, las constantes de velocidad observadas dependen de la cantidad de oximato libre y se puede saber si se desacila rápidamente o no.

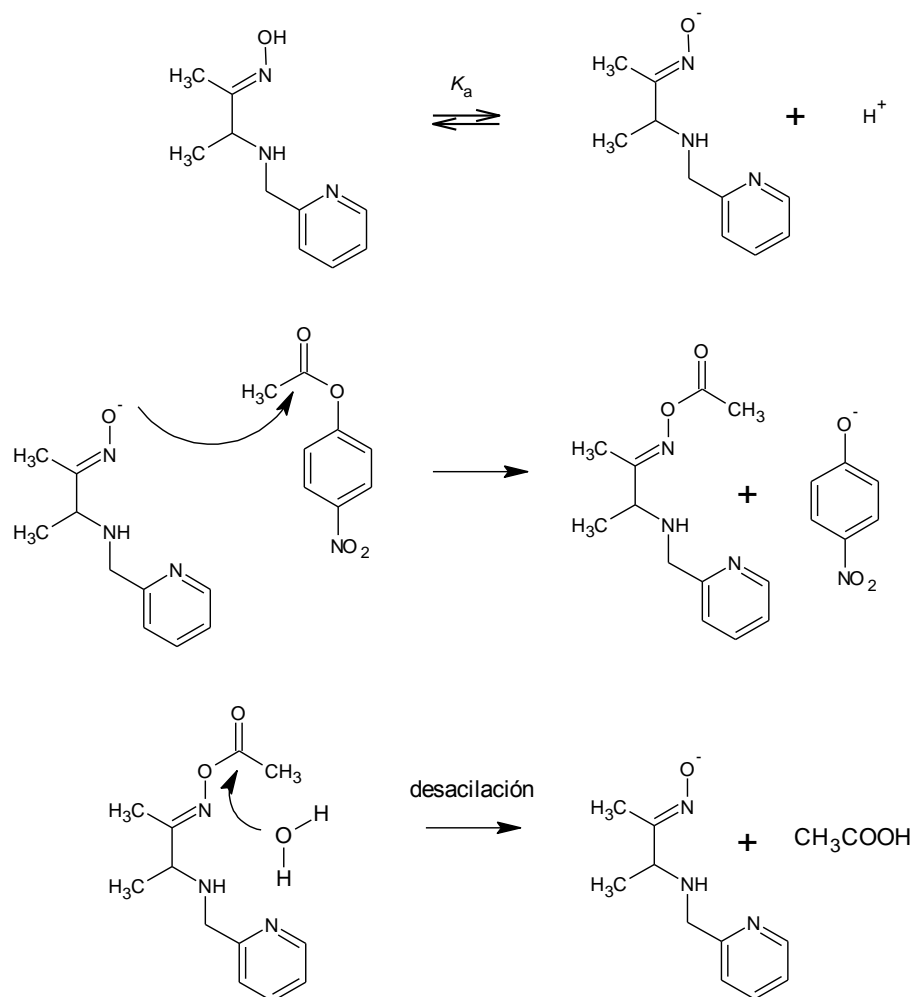


Figura 9.8. Mecanismo de ruptura del *p*-NFA propuesto en la literatura. [Breslow 1965, Suh 1992, 1984, Yatsimirsky 1992, 1998].

Debido a lo anterior como ya se mencionó, el modelo cinético considerado fue el siguiente:

$$\frac{d[p - NF^-]}{dt} = k_{obs}[p - NFA][OxAPy^-]$$

10. Reactividad nucleofílica del ligante HOxAPy en presencia de cationes metálicos.

El efecto de Cd(II)

Se estudió la dependencia de la rapidez de hidrólisis del *p*-NFA con respecto a la concentración de Cd(II) a diferentes valores de pH y concentraciones del metal y ligante, trabajando en agua, a 25 °C y con una concentración de *p*-NFA 0.05 mM. Inicialmente se usaron condiciones en las que la concentración de HOxAPy fue 1.0 mM y el Cd(II) 1.0 mM, a pH 9.0 esperando que el complejo 1:1 desprotonado tuviera una concentración aceptable para ver un efecto catalítico, pero en estas condiciones la reacción sucede instantáneamente. Se disminuyó entonces el valor de pH a 8.0 pero las reacciones seguían siendo demasiado rápidas y finalmente, para poder medirlas se encontró que es necesario usar concentraciones del orden de 0.1 mM para el ligante y el catión metálico. En la figura 10.1 se muestra un ejemplo de curva cinética para la esterólisis del *p*-NFA en presencia de [HOxAPy] 0.1 mM y en ausencia y presencia de Cd(II) 0.25 mM para ilustrar el efecto del catión metálico

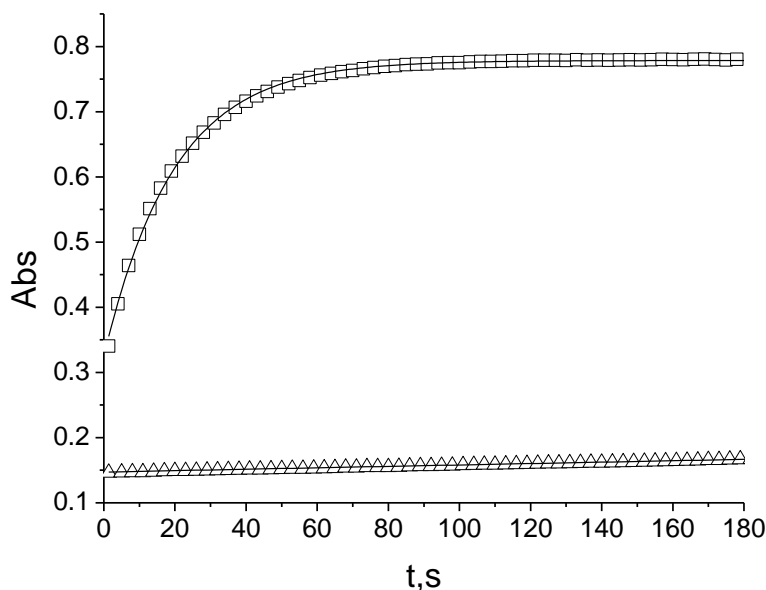


Figura 10.1. Ejemplo de ajuste integral a la ecuación cinética de primer orden para la esterólisis del *p*-NFA 0.05 mM, en presencia de HOxAPy 0.1 mM, a pH = 8.04. (□) curva cinética y su ajuste integral de primer orden en presencia de Cd(II) 0.25 mM, $k_{\text{obs}} = 0.051 \text{ s}^{-1}$. (Δ) curva cinética y su lineal en ausencia de Cd(II), $k_{\text{obs}} = 0.00016 \text{ s}^{-1}$.

A continuación se muestran, como ejemplo, los resultados de la variación de la concentración de Cd(II) a pH = 8.0, amortiguado con MOPS 100 mM., empleando [HOxAPy]₀ 0.1 mM, en un intervalo de concentración de Cd (II) de 0 a 0.3 mM, es decir, de cero a tres equivalentes de Cd(II) respecto a HOxAPy. Estas condiciones nos permiten tener constantes de velocidad observadas que fueran medibles (tiempos de reacción entre 1 minuto y dos horas). Todas las curvas cinéticas obtenidas se ajustaron de forma satisfactoria a ecuaciones de primer orden (pseudo primer orden) con el fin de obtener k_{obs} , s⁻¹ (figura 10.1).

Los resultados de k_{obs} para cada concentración inicial de Cd(II) se resumen en la tabla 10.1. Es de notar el gran incremento en la constante de rapidez que se observa en presencia de Cd(II). Como en los casos anteriores, a cada valor de k_{obs} se le resta el valor de la contribución alcalina a la hidrólisis para obtener una k_{corr} que no incluya la contribución del medio, aunque en este caso es pequeña ($\sim 1.5 \times 10^{-5}$ s⁻¹) comparada con los valores de las constantes observadas.

Tabla 10.1. Valores de k_{corr} obtenidos mediante el ajuste integral para cinéticas de primer orden en la ruptura del p-NFA, HOxAPy 0.1 mM, se varía [Cd (II)]₀.

Cd(II) M	k_{corr}, s⁻¹	Cd(II) M	k_{corr}, s⁻¹
0	1.44×10^{-4}	1.00×10^{-4}	0.03251
1.25×10^{-5}	0.01188	1.20×10^{-4}	0.04049
2.50×10^{-5}	0.01989	1.40×10^{-4}	0.04442
3.75×10^{-5}	0.02021	1.80×10^{-4}	0.04394
5.00×10^{-5}	0.0235	2.00×10^{-4}	0.05014
6.25×10^{-5}	0.02862	2.20×10^{-4}	0.05083
7.50×10^{-5}	0.03053	2.60×10^{-4}	0.04933
8.75×10^{-5}	0.02897		

Los datos de la tabla 10.1 se muestran graficados en la figura 10.2.

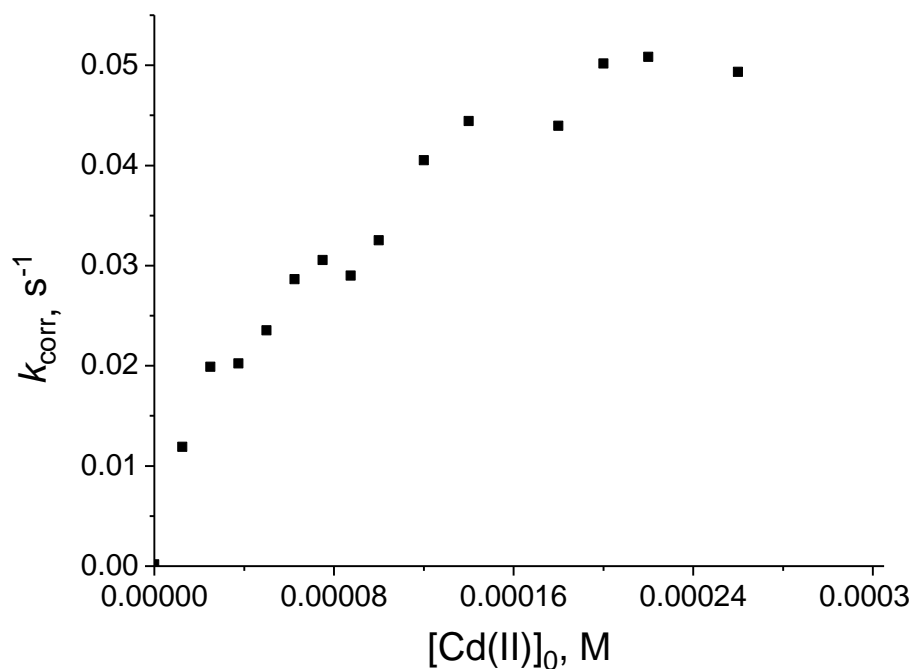


Figura 10.2. Gráfica de k_{corr} en función de la $[Cd(II)]_0$, M, a pH = 8.04, HOxAPy 0.1 mM, MOPS 100 mM, en agua a 25 °C

Del mismo modo que se procedió en los estudios de reactividad esterolítica de la HOxAPy libre, se analiza la reactividad esterolítica observada en presencia de Cd(II) en términos de las especies nucleofílicas presentes en las condiciones cinéticas. Esto se hace mediante el correspondiente diagrama de especiación del sistema en presencia de Cd(II), que se construye con los equilibrios en disolución estudiados. En la figura **10.3.A.** se muestra el diagrama de especiación en función del pH, Cd(II) y HOxAP 0.1 mM. En **10.3.B.** la especiación está en función de Cd(II) total, HOxAPy 0.1 mM y pH 8.04.

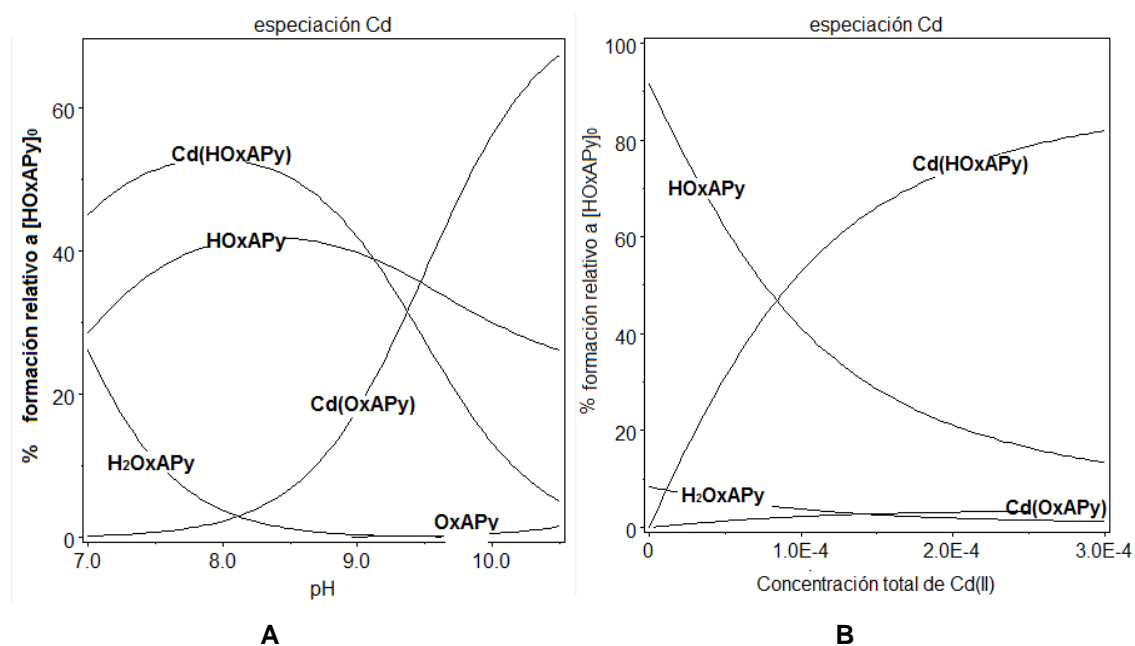


Figura. 10.3.A. Diagrama de especiación en función del pH, calculado para $[HOxAPy]_0$ y $[Cd(II)]_0$ ambos 0.1 mM. **Figura.10.3.B.** Diagrama de especiación en función de Cd(II) total, HOxAPy 0.1 mM y pH = 8.0. HYSS 2009.

De los diagramas de especiación se puede apreciar que a pH 8.0 la especie $Cd(HOxAPy)^{1+}$, es decir el complejo protonado y se ha formado una pequeña fracción de $Cd(OxAPy)^{1+}$, lo cual es razonable porque el pK_a determinado es de 9.4. La figura 10.4 muestra el gráfico en función de $[Cd(II)]_0$ de la distribución de la especie $Cd(OxAPy)^{1+}$ en el eje del lado derecho, y las constantes de rapidez observada corregidas, k_{corr} en s^{-1} en el eje del lado izquierdo. En esta gráfica es claro que hay una correlación entre las constantes de rapidez obtenidas y la concentración del nucleófilo $Cd(OxAPy)^{1+}$. Al graficar las constantes de rapidez observada en función de $[Cd(OxAPy)^{1+}]$ se obtiene una correlación lineal cuya pendiente es la constante de oximinósis, k_{MOx} , intrínseca del complejo. El ajuste lineal permite calcular $k_{MOx} = 12400 \pm 700 M^{-1} s^{-1}$ (figura 10.5).

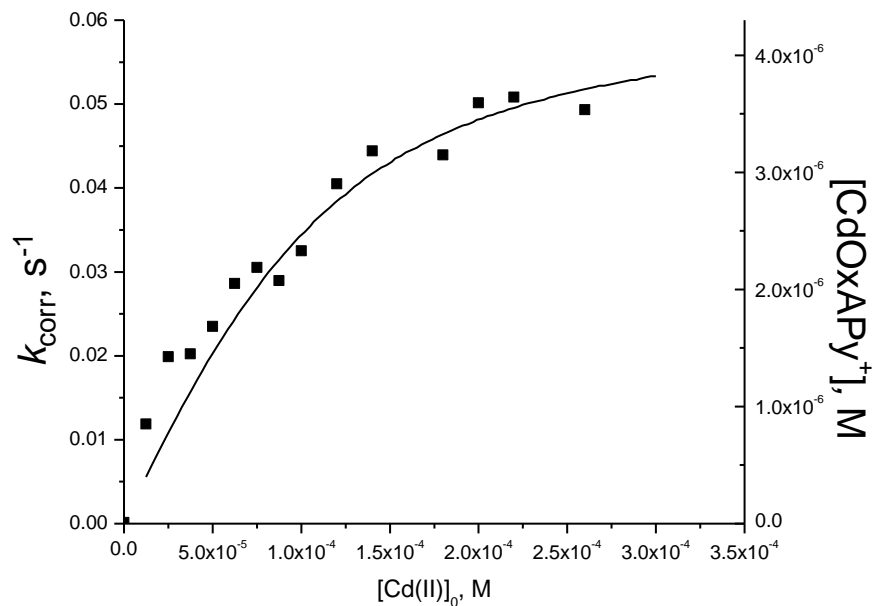


Figura 10.4. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} y la línea continua representa la distribución de la especie $\text{Cd}(\text{OxAPy})^{1+}$.

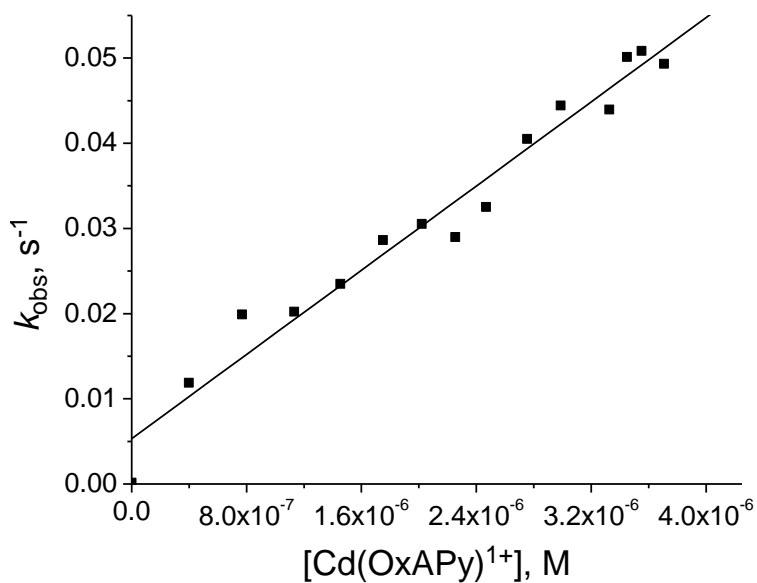


Figura 10.5. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} a $\text{pH} = 8.0$, $[\text{HOxAPy}]_0 = 0.1 \text{ mM}$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La línea continua representa el ajuste lineal de la correlación con la concentración de $\text{Cd}(\text{OxAPy})^{1+}$. $k_{\text{MOx}} = 12400 \pm 700 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La reactividad en presencia de Cd(II) también se estudió en función del pH, concentraciones iniciales de HOxAPy y Cd(II) ambas 0.1 mM, y en exceso de ligante 0.1 mM de Cd(II) y 0.03 mM de Cd(II), repitiendo siempre cada curva cinética por triplicado como mínimo. En la figura 10.6.A se muestra el gráfico de k_{obs} vs pH para todos los valores de k_{obs} obtenidos y la figura 10.6.B comprende los promedios de k_{obs} . Se muestra el ajuste no lineal de las curvas para estimar el punto de inflexión que representa el pK_a de la especie cinéticamente activa. Se obtiene $pK_a = 9.02 \pm 0.06$, que es cercano al obtenido propiamente como constante de disociación ácida para $Cd(HOxAPy)^{2+}$ con valor de 9.4.

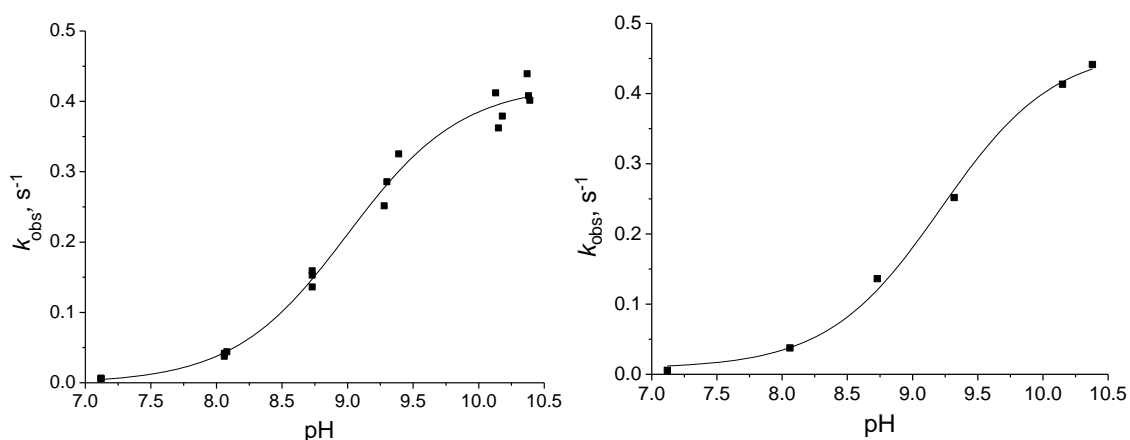


Figura 10.6.A y B. Valores de k_{obs} vs pH con HOxAPy y Cd(II) ambos 0.1 mM a 25 °C. El ajuste no lineal con la ecuación 9.1 permite estimar el pK_a de la especie cinéticamente activa en 9.02 ± 0.06 .

Sin embargo, estos resultados deben ser comparados con la distribución de especies a las condiciones cinéticas. Esta comparación se muestra en la figura 10.7 donde, en función del pH se grafica la concentración de la especie $Cd(OxAPy)^{1+}$ en el eje del lado derecho y las constantes de rapidez corregidas, k_{corr} en s^{-1} en el eje del lado izquierdo.

A simple vista se observa una correlación entre las constantes de velocidad obtenidas y la concentración del nucleófilo $Cd(OxAPy)^{1+}$, por lo que es congruente asociar el valor de pK_a 9.02 obtenido por este método a la especie $Cd(OxAPy)^{1+}$, un valor muy cercano al obtenido en el estudio de los equilibrios en disolución:



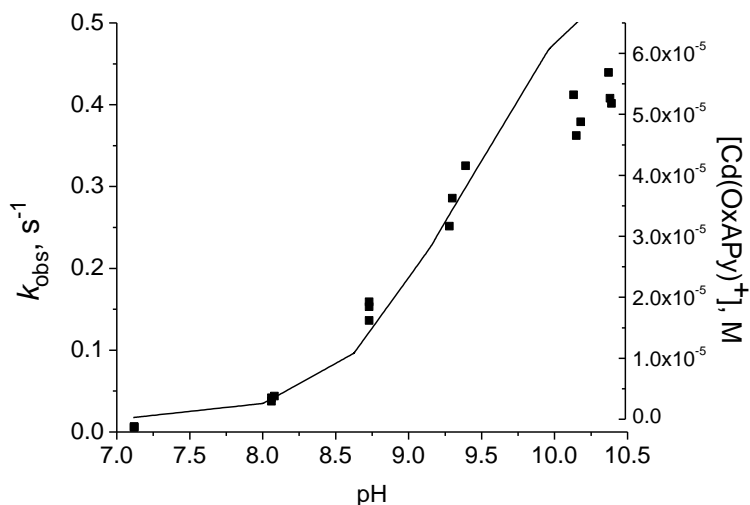


Figura 10.7. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} según la ecuación 10.1. La línea continua representa la distribución de $\text{Cd}(\text{OxAPy})^{1+}$ en las mismas condiciones de las cinéticas.

Sin embargo, al analizar los datos de k_{corr} en función de la concentración, encontramos que los datos a pH más básico tienen valores menores a los esperados. Esto puede ser debido a que a valores de pH mayores a 10 se tienen constantes observadas del orden de 0.4 s^{-1} ($t_{1/2}$ 1.7 s) y su medición (sin la ayuda de un stopped-flow) tiene un error grande. Por lo tanto, para hacer la correlación se usaron valores de pH menores a 10, y se obtiene una constante de segundo orden de $k_{\text{MOx}} = 9500 \pm 500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la especie $\text{Cd}(\text{OxAPy})^{1+}$, figura 10.8.

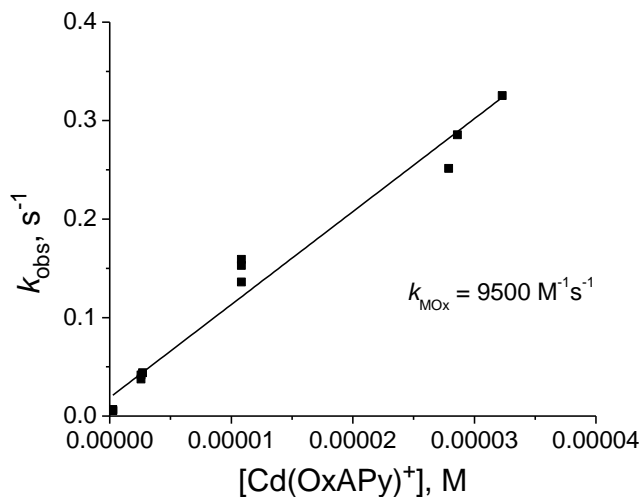


Figura 10.8. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} , ecuación 9.2. La línea continua representa el ajuste lineal y la pendiente la constante de segundo orden para $\text{Cd}(\text{OxAPy})^{1+}$.

Haciendo un promedio de las constantes k_{MOx} para $Cd(OxAPy)^{1+}$, tanto de las dependencias de constante de velocidad observada en función de la concentración del catión metálico a pH fijo y del pH a concentraciones del ligante y metal fija (0.1 mM equimolares y 0.03mM de Cd(II) con 0.1 mM de L) se obtuvo un valor promedio de $k_{MOx} = 10900 \pm 600 M^{-1}s^{-1}$. Este valor de k_{Ox} que atribuimos al complejo $Cd(OxAPy)^{1+}$, resulta realmente enorme comparado con la reactividad esterolítica de la HOxAPy libre ($k_{Ox} = 84 \pm 2 M^{-1}, s^{-1}$) y con la reactividad de otros complejos de cationes divalentes hacia *p*-NFA, y es comparable con los valores enzimáticos reportados para la hidrólisis de *p*-NFA lo cual es un resultado sobresaliente de este estudio.

Si se piensa que el papel del Cd(II) al coordinarse con la HOxAPy para generar el correspondiente complejo oximato es únicamente disminuir el pK_a del ligante por coordinación, la reactividad que cabría esperar es la del anión oximato libre, pero en este caso encontramos que la diferencia (posiblemente subestimada) es de 130 veces. Por lo tanto, estos resultados nos dan evidencia de que el papel del catión metálico no es únicamente la acidificación del nucleófilo y es necesario ahondar en el tema para lograr explicar este efecto de activación en términos que ayuden a entender el comportamiento de los α -nucleófilos coordinados.

El efecto de Zn(II)

Se estudió la dependencia de la rapidez de hidrólisis del *p*-NFA a 25 °C con respecto a la concentración de Zn(II) en varios valores de pH, fijando $[\text{HOxAPy}]_0$ en todas las celdas y variando la concentración total de Zn(II). Para una primera aproximación se hicieron experimentos con HOxAPy 1 mM en todas las celdas y la concentración de Zn(II) variable dentro del intervalo 0 a 2 mM, a pH=7.0, ya que para otros sistemas se ha observado que la reactividad en presencia de Zn(II) es menor que en presencia de Cd(II) y se espera que a pH 7.0 las constantes sean medibles. Sin embargo como se observa en la figura 10.9 no fue posible obtener las curvas cinéticas completas a estas condiciones debido a la rapidez de las mismas: para el tiempo cero que se logra medir, la absorbancia final de la reacción ya correspondía a la esperada para la hidrólisis completa del sustrato.

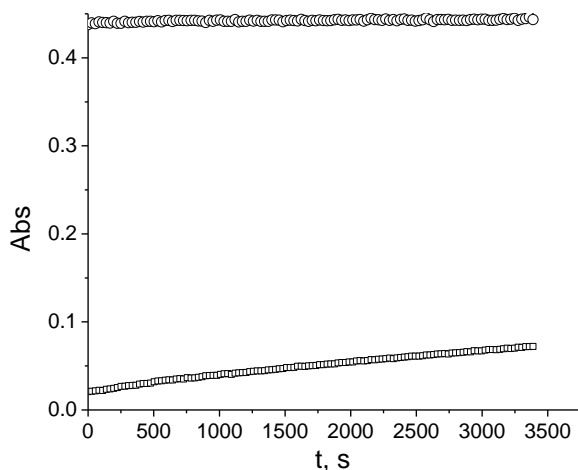


Figura 10.9. Reactividad esterolítica en ausencia de Zn(II) (curva inferior) y en presencia de Zn(II) 1 mM (curva superior). pH=7.0, MOPS=100 mM, $[\text{HOxAPy}]_0 = 1$ mM y 25°C.

Por lo tanto, se decidió disminuir la concentración de la oxima HOxAPy y del Zn(II) de 1 mM a 0.1 mM como en el caso del Cd(II). Para descartar un efecto del catión Zn(II) libre o complejoado con el amortiguador en la hidrólisis del *p*-NFA se realizó la comparación cinética entre la reacciones en ausencia y en presencia del ligante HOxAPy, a pH = 7.0, MOPS = 50 mM y $[\text{Zn(II)}]_0 = 0.2$ mM, figura 10.10. La reacción sin HOxAPy procede a la velocidad esperada para la hidrólisis alcalina a pH 7.0.

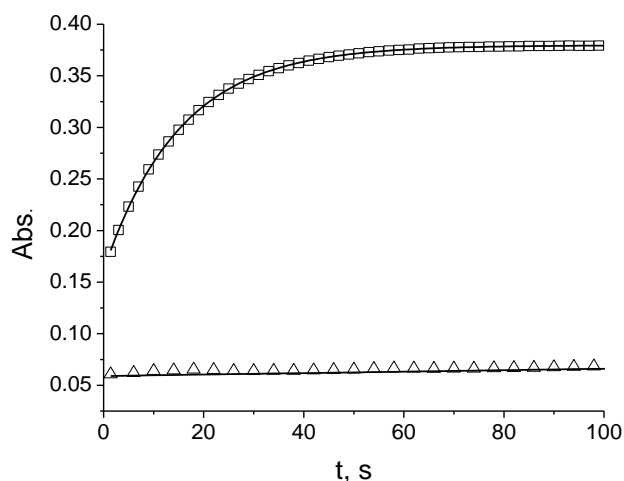


Figura 10.10. Gráfica de comparación de las curvas cinéticas en ausencia (Δ) y en presencia (\square) de Zn(II) 0.1 mM, $k_{\text{obs}} = 0.05378 \text{ s}^{-1}$ (de un ajuste integral de primer orden).

Se midieron, de manera análoga a Cd(II), las constantes de velocidad observadas en función de la variación de concentración de la concentración total de Zn(II) empleando hasta 3 equivalentes respecto a la concentración del ligante para [HOxAPy] 0.1 mM y la dependencia del pH a concentraciones 0.1 mM de HOxAPy con concentraciones de Zn(II) 0.1 y 0.03 mM. En las figuras 10.11 y 10.12 se muestran dos ejemplos.

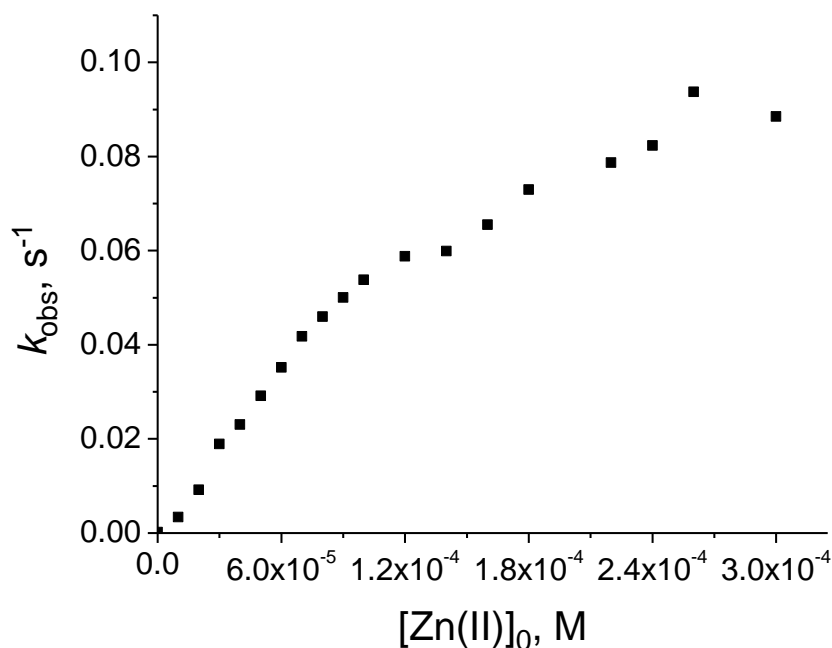


Figura 10.11. Gráfica de k_{corr} en función de la $[\text{Zn(II)}]_0$, M, a pH = 7.05, HOxAPy 0.1 mM, MOPS 100 mM, en agua a 25 °C

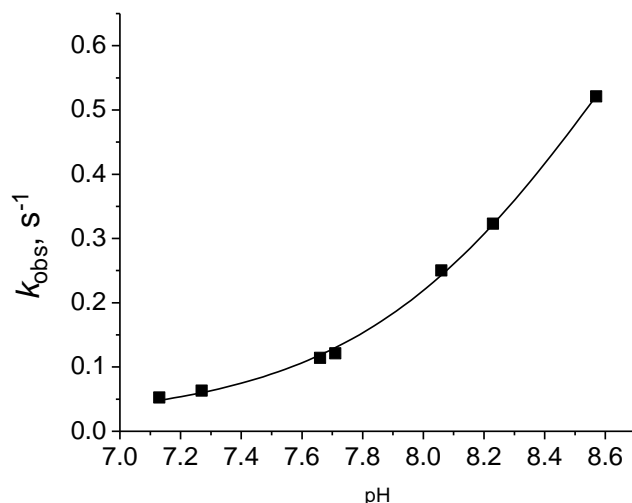


Figura 10.12. Valores de k_{obs} en función del pH con HOxAPy y Zn(II) ambos 0.1 mM en agua a 25 °C. El ajuste no lineal con la ecuación 9.1 permite estimar el pK_a de una especie cinéticamente activa en 8.6 ± 0.1 .

Sin embargo, a pesar de que aparentemente se tenga una especie cinéticamente activa con pK_a 8.6, figura 10.12, en el caso de Zn(II) hay varios complejos presentes a las condiciones de cinética, y es necesario analizar las constantes de velocidad observadas en función de las especies presentes y su concentración. En la figura 10.13 se muestra el diagrama de especiación para el sistema con Zn(II) que servirá para el análisis de los resultados.

Del diagrama de especiación de la figura 10.13 se puede apreciar que en el intervalo de $\text{pH} = 7.0$ a $\text{pH} = 9.0$ hay tres especies potencialmente nucleofílicas que involucran al Zn(II) coordinado con algún ligante desprotonado: $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{HOxAPy})]^{1+}$ y $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})]$ y $[\text{Zn}(\text{HOxAPy})(\text{OxAPy})]^{1+}$.

Se propuso que la especie $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{HOxAPy})]^{1+}$ sea el producto del primer equilibrio de desprotonación (Sección 8, $pK_a = 7.38$), primero porque no da un cambio en el espectro visible para la desprotonación del oximato y segundo debido a que en la literatura se han reportado valores de $pK_a \approx 7.3$ para moléculas de agua coordinadas a Zn(II) complejado por aminas tridentadas. Al desprotonarse la molécula de agua coordinada al Zn(II) forma un nucleófilo cuya reactividad ante

el éster *p*-NFA también ha sido reportada en varios sistemas de este tipo, encontrándose que las constantes de oximinólisis de dichos nucleófilos generalmente no rebasan el valor de $k_{Ox} = 2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Yatsimirsky, 2005], un valor pequeño en comparación con $k_{Ox} = 14.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el OH^- no coordinado, por lo que, dados los valores de las constantes de velocidad observada, su contribución debe ser pequeña. Esto nos deja dos especies a analizar: $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})]$ y $[\text{Zn}(\text{HOxAPy})(\text{OxAPy})]^{1+}$.

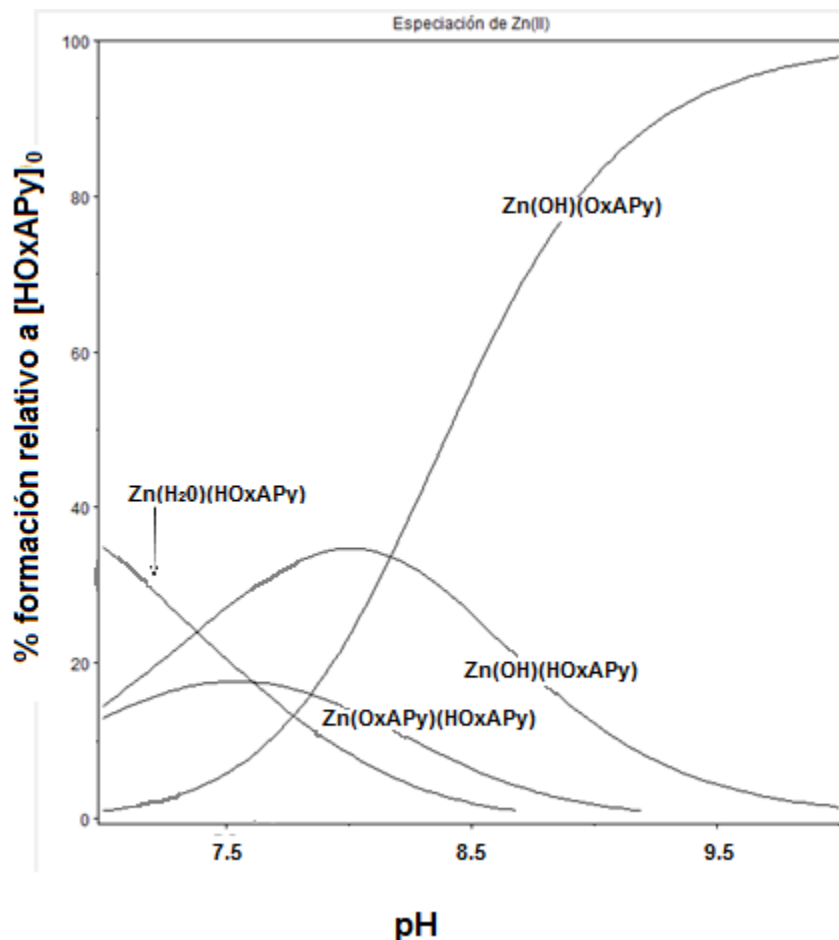


Figura 10.13. Diagrama de especiación en función del pH, construido con el estudio previo de los equilibrios en disolución y calculado para $[\text{HOxAPy}]_0$ y $[\text{Zn}(\text{II})]_0$, ambos 0.1 mM.

En la figura 10.14 se grafica la distribución de las especies Zn-OxAPy ($[\text{Zn}[(\text{OH})(\text{HOxAPy})]^{1+}$, $[\text{Zn}[(\text{OH})(\text{OxAPy})]$ y $[\text{Zn}(\text{HOxAPy})(\text{OxAPy})]^{1+}$) en el eje del lado derecho y las constantes de rapidez corregidas, k_{corr} en s^{-1} en el eje del lado izquierdo.

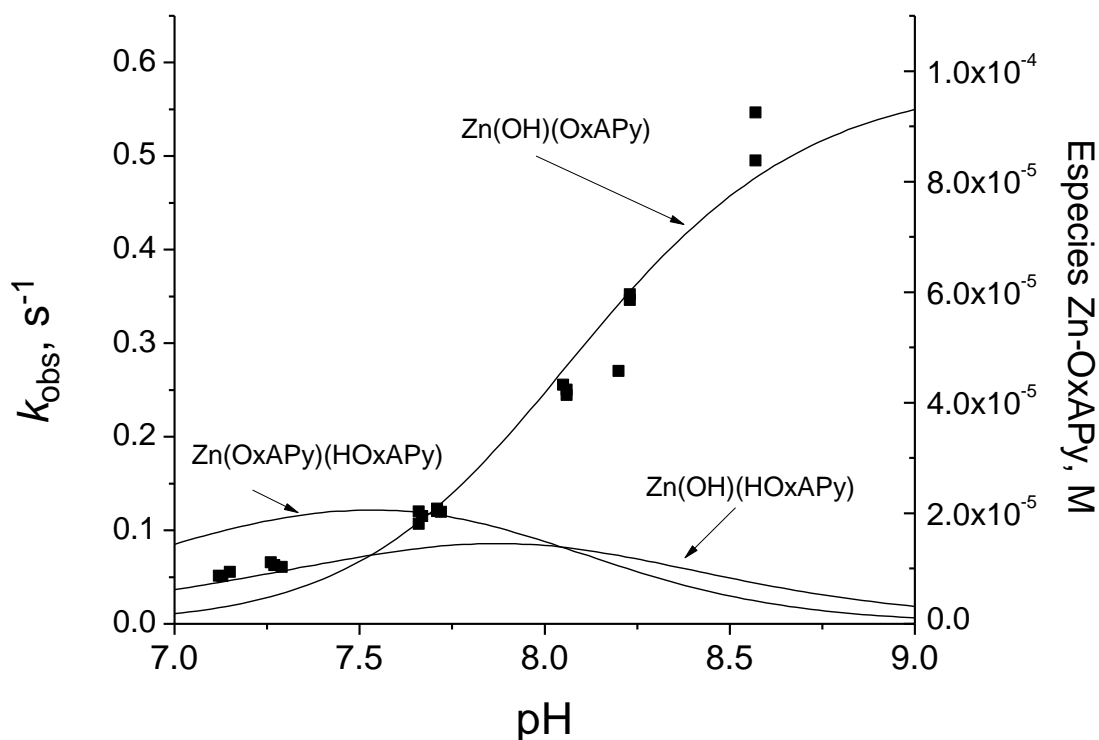


Figura 10.14. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} y las líneas continuas representan la distribución de las especies señaladas en el diagrama. Las reacciones a cada valor de pH se realizaron siempre por triplicados y con concentraciones iniciales 0.1 mM de HOxAPy y Zn(II).

Cualitativamente se puede apreciar en esta gráfica que la contribución más importante a la constante de velocidad observada debe provenir de la especie $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})]$, que tal como se planteó, involucra el oximato desprotonado además de la molécula de agua coordinada al Zn(II).

Para corroborar la participación de las especies $[\text{Zn}[(\text{OH})(\text{HOxAPy})]^{1+}]$ y $[\text{Zn}(\text{HOxAPy})(\text{OxAPy})]^{1+}$ además de la especie $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})]$, se hicieron regresiones lineales múltiples de acuerdo con la ecuación 10.1:

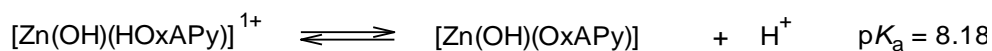
$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})] + k_2 [\text{Zn}[(\text{OH})(\text{HOxAPy})]^{1+}] + k_3 [\text{Zn}(\text{HOxAPy})(\text{OxAPy})]^{1+}$$

Ecuación 10.1

Sin embargo, los coeficientes k_2 y k_3 , en combinación de las tres especies o por pares, siempre dan valores negativos, por lo que la contribución se puede decir que proviene únicamente del complejo $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})]$. De esta forma, la especiación propuesta para este sistema tiene congruencia con los resultados de reactividad esterolítica observada en presencia de $\text{Zn}(\text{II})$.

Los datos de las dependencias de concentración del $\text{Zn}(\text{II})$ se ajustaron de forma similar con los mismos resultados: la especie cinéticamente activa es el complejo $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{OxAPy})]$. Cabe la posibilidad de que las otras especies tengan su propia participación, sin embargo, comparadas con la reactividad del complejo $\text{Zn}(\text{II})$ -oximato, ésta es muy pequeña y no da un valor significativo en las regresiones.

Este valor de $\text{p}K_a$ además es cercano al valor encontrado mediante titulaciones espectrofotométricas y potenciométricas para el equilibrio de disociación ácida de la misma especie, por lo cual podemos decir que los resultados cinéticos son congruentes con los obtenidos para los equilibrios en disolución.



Al graficar las constantes de rapidez observada en función de $\text{Zn}[(\text{OxAPy})(\text{OH})]$ se obtiene una correlación lineal cuya pendiente es la constante de oximinósis, k_{Ox} , intrínseca del complejo. El promedio realizado de este tipo de ajustes permite calcular una constante promedio de segundo orden $k_{\text{MOx}} = 8700 \pm 400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

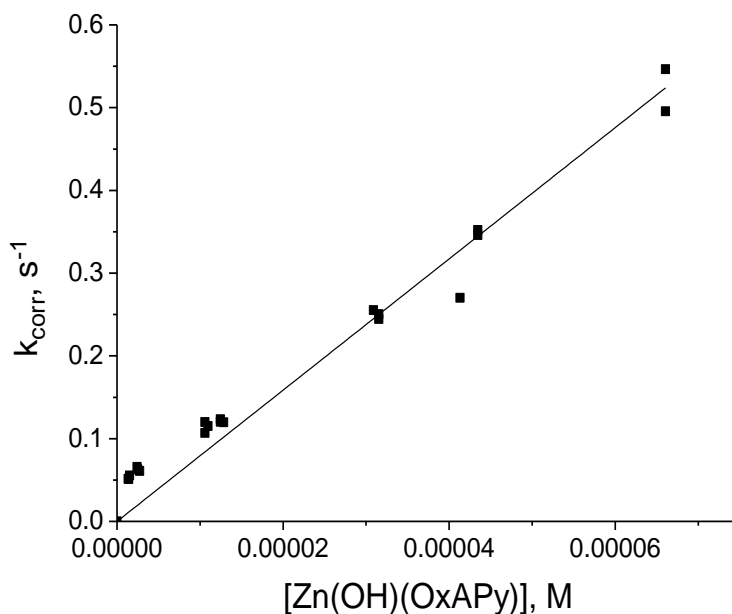


Figura 10.8. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} , $[\text{HOxAPy}]_0$ y $[\text{Zn(II)}]_0 = 0.1 \text{ mM}$ a 25°C . La línea continua representa el ajuste lineal de la correlación con la concentración de $\text{Zn}[(\text{OxAPy})(\text{OH})]$, $k_{\text{Ox}} = 8700 \pm 400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Como resumen de estos estudios las reactividades intrínsecas de interés son las siguientes:

Tabla 10.1. Resumen de las reactividades intrínsecas

Especie	$k_{\text{Ox}}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
OH^-	14.7
OxAPy^-	84 ± 2
$\text{Cd}(\text{OxAPy})^{1+}$	10900 ± 600
$\text{Zn}[(\text{OH})(\text{OxAPy})]$	8700 ± 400

Lo primero que observamos de estos datos es que la reactividad del anión oximato es mucho mayor que la del anión OH^- , y que efectivamente, esta oxima se comporta como un alfa-nucleófilo.

Se puede apreciar que la reactividad esterolítica aumenta considerablemente para los complejos de Cd(II) y Zn(II) . Es importante resaltar que no encontramos precedentes en la literatura de efectos catalíticos tan grandes para alfa-nucleófilos

coordinados. De hecho, los efectos catalíticos son tan grandes que claramente no pueden atribuirse simplemente a la disminución del pK_a y a tener una mayor fracción de nucleófilo desprotonado a menor valor de pH, con la consecuente disminución de la nucleofilia debida a la coordinación del par electrónico alfa al nucleófilo.

Vale la pena remarcar que el efecto catalítico en el caso del Zn(II) es más notorio a pH 7.0 porque las constantes de velocidad observadas son mucho mayores, sin embargo, al comparar las constantes de segundo orden para los complejos encontramos que el efecto catalítico del complejo con Cd(II) es 130 veces mayor que el del anión oximato y el de Zn(II) es 100 veces mayor.

Estudios cinéticos con otros cationes

Se estudió también la reactividad esterolítica en presencia de otros cationes divalentes, como Ni (II) y Mn (II) y de cationes trivalentes como Y (III) y La (III). Las condiciones fueron HOxAPy 1 mM y 0.1 mM, pH = 7.0, MOPS 50 mM y 25 °C, variando la concentración del catión metálico. Ver figura 10.92.

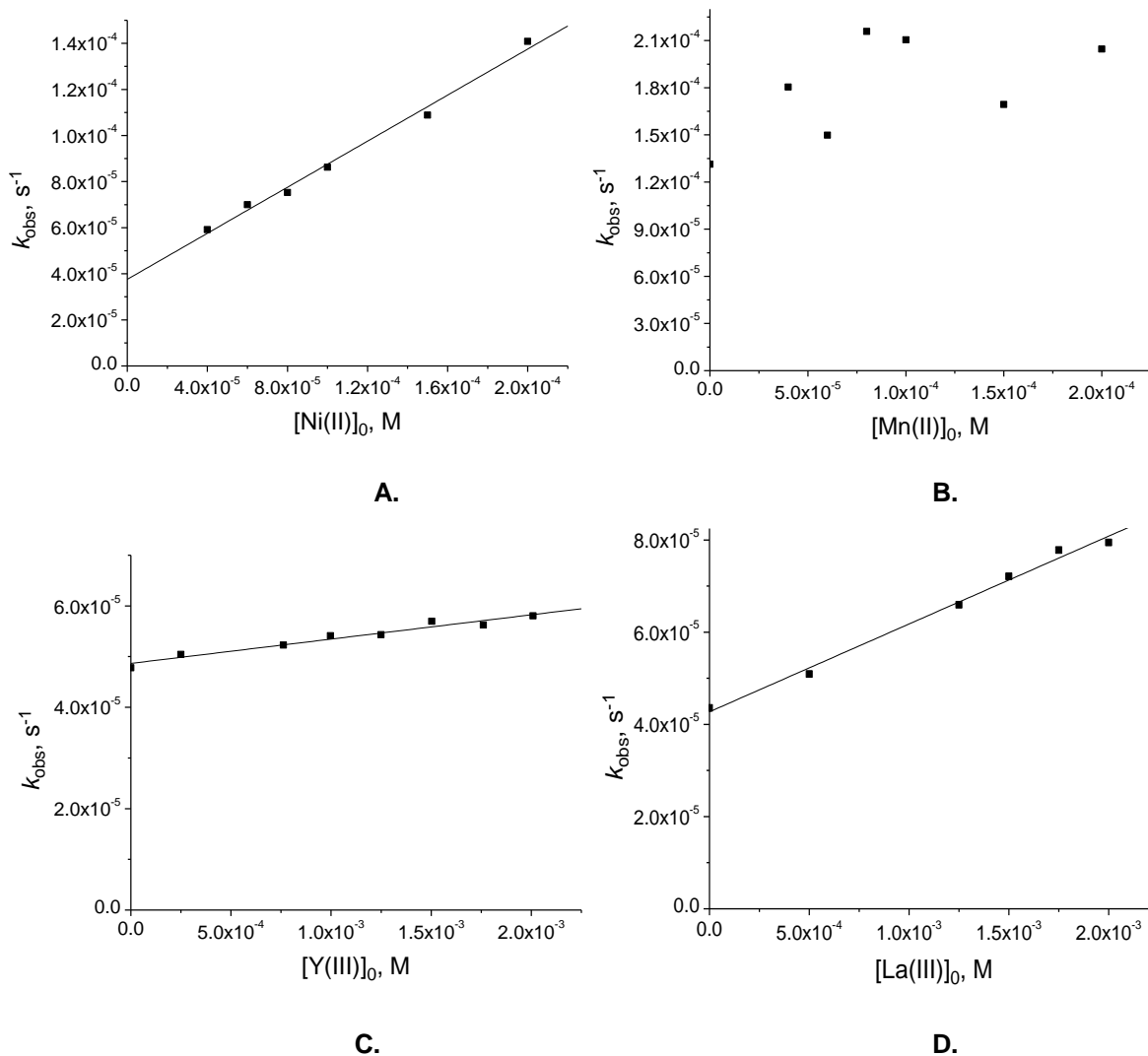
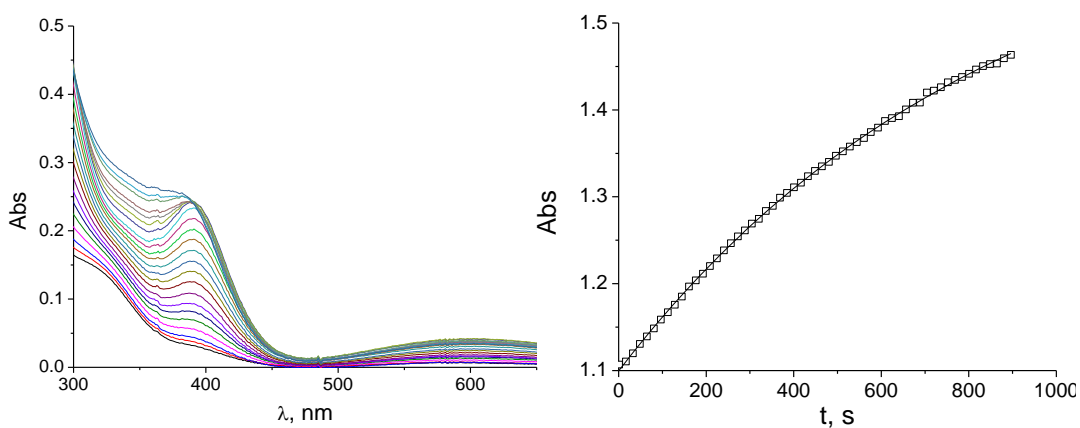


Figura 10.92. k_{obs} vs concentración inicial del catión a pH 7.0, MOPS 50 mM, HOxAPy 0.1 mM y 25°C para cuatro cationes metálicos: **A.** Ni(II), $k_2' = 0.4997 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. **B.** Mn(II). Los valores de k_{obs} no dependen linealmente de $[\text{Mn(II)}]_0$ **C.** Y(III), $k_2' = 5.15 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y **D.** La(III), $k_2' = 0.01905 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

También se realizaron cinéticas para evaluar la actividad esterolítica en presencia de Cu(II) y HOxAPy en las mismas condiciones que para los otros cationes metálicos de la figura 10.92, sin embargo en este caso las especies formadas presentan un color azul en disolución acuosa lo que hace que el espectro de absorción UV-Vis en presencia de Cu(II) interfiera con el monitoreo del ion *p*-nitrofenolato a 400 nm. En la figura 10.93 se muestra a la izquierda una serie de espectros de la HOxAPy 0.1 mM en presencia de cantidades de Cu(II) dentro del intervalo 0 a 1 mM. El gráfico de la izquierda es la curva cinética obtenida para la hidrólisis del *p*-NFA en presencia de Cu(II) y HOxAPy a pH = 7.0, se puede apreciar por los valores de absorbancia mayores a la unidad, que la interferencia del color del complejo formado con Cu(II) interfiere con el monitoreo del producto de la reacción de esterólisis. Adicionalmente, se obtuvo $k_{\text{obs}} = 0.00116 \text{ s}^{-1}$, que está muy por abajo de los valores que resultan de mayor interés cinético como en el caso de Zn(II) y Cd(II).



Estos estudios permiten comparar el efecto que tienen distintos cationes divalentes y trivalentes en la reactividad de la HOxAPy. Mientras que los sistemas con Cd(II) y Zn(II) incrementan la rapidez de reacción a pH = 7.0 de manera considerable, los sistemas con los cationes Ni(II), Mn(II), Y(III) y La (III) a pH = 7.0 presentan una reactividad mucho menor e incluso no muy diferente a la reactividad observada en su ausencia. Esto puede deberse a varias razones: a que no se formen complejos estables, que el ligante se coordine por oxígeno el anión oximato y quede bloqueado el grupo nucleofílico y sólo se observe la reactividad del acuoion, a que no se esté trabajando a un pH óptimo para cada catión metálico, etc. Sin embargo, para el alcance de este trabajo se decidió que era más importante detallar los sistemas con Zn(II) y Cd(II) que tienen una reactividad realmente sobresaliente.

11. Reactividad esterolítica ante los ésteres de fosfato HpNPP y pNPDPP

Los ésteres de fosfato son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en sistemas biológicos como químicos. Son especies cinéticamente muy estables a la hidrólisis alcalina en un orden de reactividad ante la hidrólisis triésteres > monoésteres >> diésteres. Como el mecanismo de reacción para los ésteres fosfato es similar al de los ésteres carboxílicos (en los ésteres fosfato se forma un intermediario con geometría de bipirámide trigonal en lugar del intermediario tetraédrico con el nucleófilo y el grupo saliente en posiciones opuestas), es posible que un buen catalizador para la hidrólisis ésteres de ácidos carboxílicos también sea capaz de hidrolizar ésteres fosfato.

Para probar la reactividad esterolítica de la oxima HOxAPy libre y en presencia de Zn(II) hacia ésteres fosfato, se utilizaron un diéster fosfato modelo (HpNPP) y un triéster fosfato modelo (pNPDPP) (figura 11.0). Se decidió probar únicamente con Zn(II) debido a su buen funcionamiento en presencia de HOxAPy a valores de pH cercanos al fisiológico, como ya se ha analizado en las secciones anteriores.

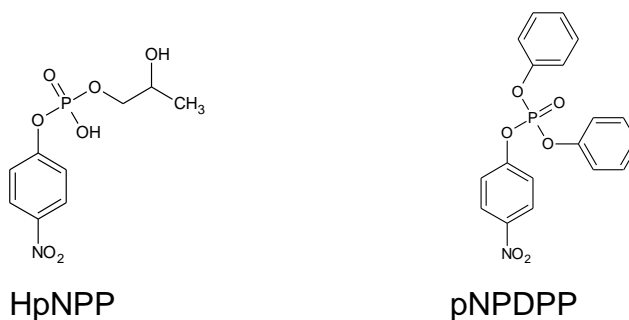


Figura 11.0. HpNPP (2-hidroxipropil-p-nitrofenilfosfato) y pNPDPP (p-nitrofenil difenil fosfato). La hidrólisis de ambos sustratos produce el anión p-nitrofenolato, al igual que en la hidrólisis del p-NFA, esto hace posible el monitoreo de las reacciones por el mismo método descrito para el p-NFA.

Primero se comparó la reactividad de ambos sustratos ante la oxima HOxAPy libre y para ello se usó el ligante en concentración 1 mM, pH 8.0 y 8.5 mantenido constante con MOPS 100 mM, sustrato en concentración 0.05 mM, 25°C. En la figura 11.1 se muestran las curvas cinéticas para ambos sustratos a pH 8 y 8.5.

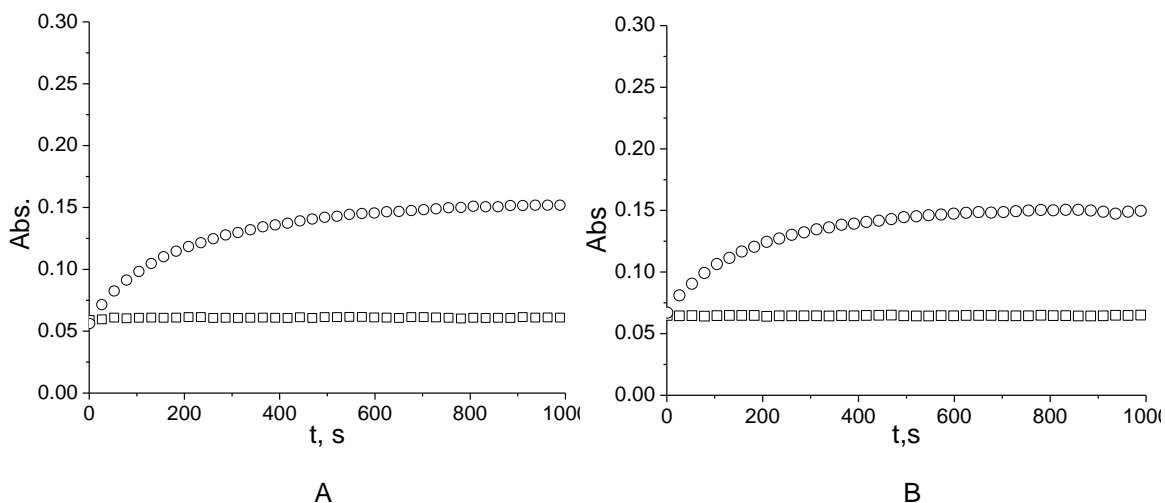


Figura.11.1. A. Curvas cinéticas para la hidrólisis de los sustratos (\square) HpNPP y (\circ) pNPDPP 5×10^{-5} M, MOPS 100 mM, HOxAPy 1 mM y 25 °C. **A, pH = 8.0 y B, pH = 8.5.**

Se puede apreciar en la figura 11.1 A y B que para el diéster HpNPP no se observa hidrólisis a estas condiciones y para el triéster pNPDPP el rendimiento de la reacción es mucho menor del esperado ($A_{inf} = 0.9$), esto puede deberse a que en el caso de este sustrato es necesario el uso de mezclas de disolventes para que su solubilidad sea completa, su solubilidad en agua es muy baja, de cualquier forma se probó la hidrólisis del triéster fósforo pNPDPP en presencia del ligante HOxAPy y de Zn(II). Para ello se realizaron estudios cinéticos a pH 8.0 y 8.5 en relaciones molares 1:1 y 10:1 de HOxAPy y Zn(II). La figura 11.2 muestra las curvas cinéticas obtenidas a pH = 8.0 (A) y pH = 8.5 (B).

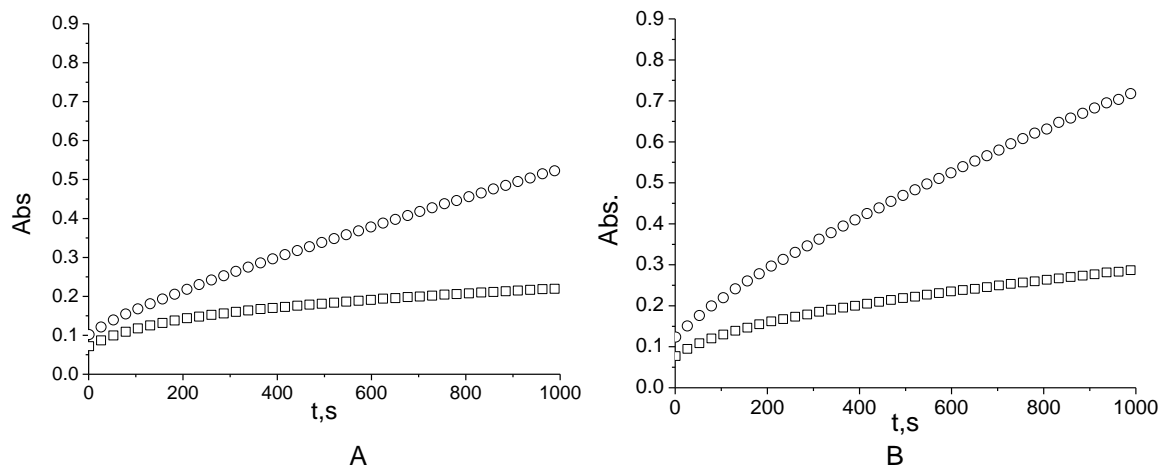


Figura 11.2.A. Curvas cinéticas para la hidrólisis del sustrato pNPDPP 5×10^{-5} M. (□) HOxAPy 0.1mM, Zn(II) 0.1 mM. (○) HOxAPy 1 mM y Zn(II) 0.1 mM. pH 8.0, MOPS 100 mM y 25 °C. A, pH = 8.0 y B, pH = 8.5.

Si se emplea una concentración del ligante 1.0 mM a pH 8.0 y 8.5 ya se observa la hidrólisis del triéster pNPDPP, que es mayor a pH 8.5. Se puede apreciar que la presencia de Zn(II) aumenta la rapidez de reacción aunque de una manera mucho más moderada que en el éster *p*-NFA.

Estos estudios con ésteres fosfato no son detallados, para tener información confiable en el caso del sustrato pNPDPP sería necesario repetir muchas de las titulaciones en presencia de mezclas de disolventes antes de poder concluir algo en términos de las especies cinéticamente activas, lo cual en este caso queda fuera de los límites de este trabajo.

12. Análisis global de resultados

Al inicio de este trabajo se dio la definición en términos funcionales y estructurales de los α -nucleófilos, entre los cuales se encuentra el oximato como base conjugada de las oximas. El aspecto funcional más relevante de dicha definición se relaciona con la reactividad nucleofílica inusualmente grande que exhiben en comparación con nucleófilos comunes de basicidad similar y el efecto de nivelación de la reactividad para oximas de $pK_a \geq 8.0$ en las coordenadas de Brønsted [Edwards 1962, Fina 1973, Grekova 1978, Green 1958]. En este trabajo el primer paso fue obtener la k_{Ox} o constante de reactividad intrínseca de la HOxAPy para establecer si se trata de un α -nucleófilo. Para mayor claridad se muestra en la figura 12.0 las coordenadas de Brønsted ($\log k_{Ox}$ vs pK_a) para varias oximas reportadas en la literatura, se incluye el resultado obtenido en este trabajo para la HOxAPy.

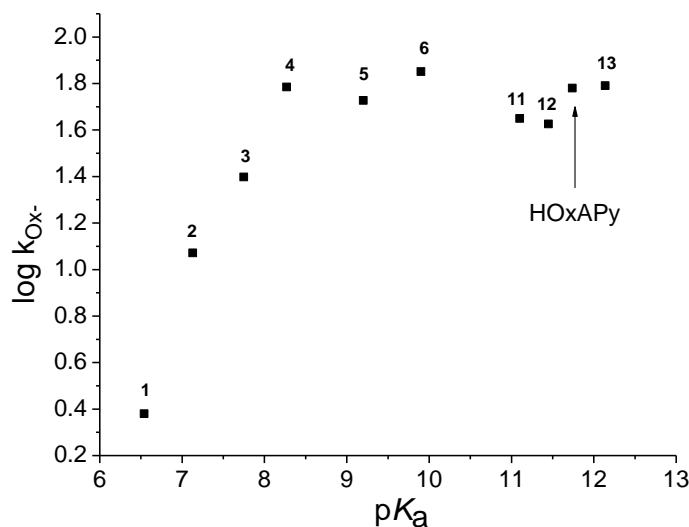


Figura 12.0 Coordenadas de Brønsted ($\log k_{Ox}$ vs pK_a) para oximas de la tabla 2.1. Se incluye el resultado obtenido para la HOxAPy.

Ya que la reactividad intrínseca para OH^- es de $k_{OH} = 14.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Fiordiponti, 1974) y para la HOxAPy $k_{Ox} = 84 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ es evidente que la HOxAPy exhibe una reactividad mayor. Además como puede observarse en la figura 13.0, la HOxAPy exhibe el efecto de nivelación de la reactividad observado para oximas no complejadas $pka \geq 8$. Se trata de propiedades típicas de los α -nucleófilos.

En la figura 12.1 se muestran nuevamente las coordenadas de Brønsted ($\log k_{Ox}$ vs pK_a) incluyendo los resultados de reactividad intrínseca de los complejos.

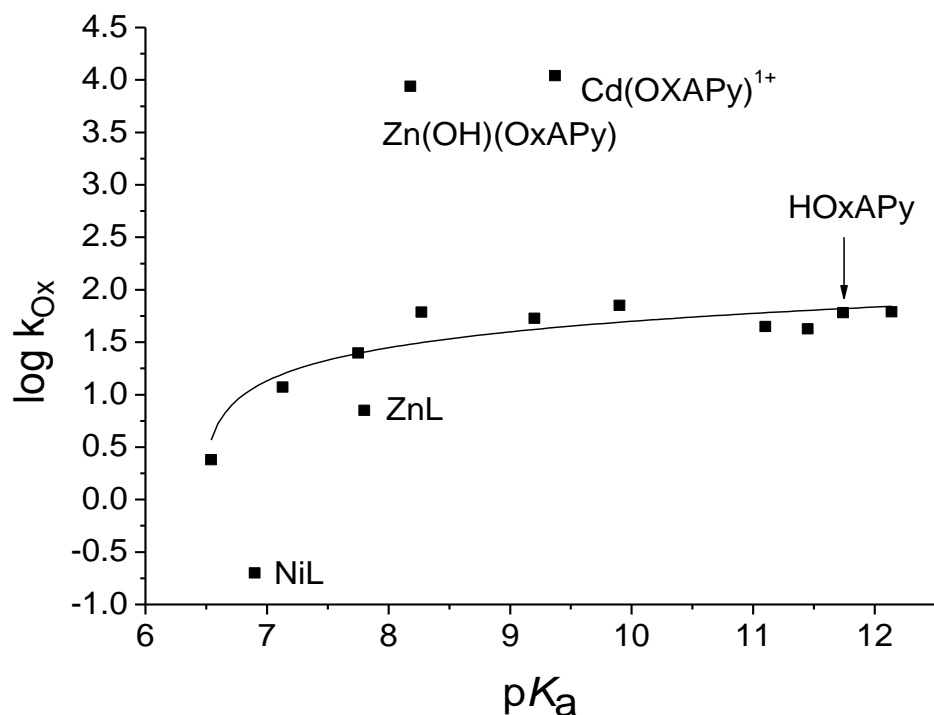


Figura 12.1. Coordenadas de Brønsted para las oximas de la tabla 2.1 y los complejos $Cd(OxAPy)^+$ y $Zn[(OH)(OxAPy)]$. Las coordenadas indicadas como ZnL y NiL corresponden a los respectivos complejos de Zn(II) y Ni(II) con la oxima estudiada por Tonellato y colaboradores [Mancin, 2000], se ahonda en esta comparación en la tabla 12.0.

Se puede apreciar del gráfico anterior el considerable aumento de la reactividad de los complejos. En este caso es evidente que el aumento en la reactividad esterolítica de la HOxAPy en presencia de Cd(II) y Zn(II), no puede atribuirse al incremento de la acidez debido a la formación de los complejos y el consecuente incremento de la fracción desprotonada del nucleófilo a valores menores de pH, ya que el efecto de activación obtenido supera el límite de reactividad observado para los oximatos, específicamente el de la HOxAPy, cuya constante de reactividad intrínseca es $k_{Ox} = 84 \pm 2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Una hipótesis razonable era que la reactividad intrínseca en los complejos disminuyera ya que el par de electrones del heteroátomo en posición alfa está coordinado y no puede aportar densidad electrónica para compensar la pérdida de carga sobre el átomo nucleofílico en el

estado de transición cuando se realiza el ataque nucleofílico, aspecto que ha sido propuesto para explicar la alta reactividad de los alfa nucleófilos.

Para explicar el aumento de la constante de oximinólisis que se ha observado en otros estudios sobre la reactividad de los complejos metálicos con oximas, se ha propuesto la estabilización del estado de transición a través de la coordinación del alcoholato que se forma del grupo carbonil con el catión metálico (Yatsimirky, 1998). En este trabajo podemos pensar que los efectos de activación observados pueden deberse en parte a dicha estabilización, que se esquematiza en la figura 12.2.

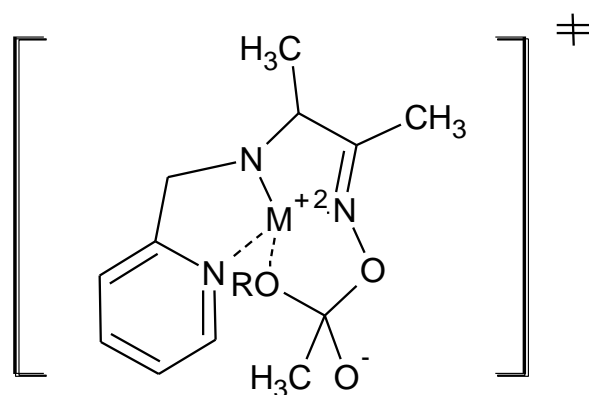


Figura 12.2. Estabilización del estado de transición a través de la coordinación del grupo RO que se forma del grupo carbonil con el catión metálico.

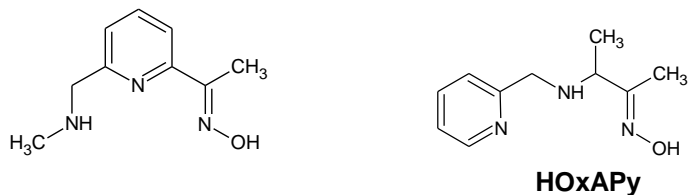
Adicionalmente podemos pensar que también puede existir una contribución debida a la cercanía del catión metálico con el grupo oximato que se reflejaría en mayor facilidad para la pérdida de moléculas que solvatan al nucleófilo y a lo cual se atribuye el efecto de nivelación de reactividad en los oximatos.

Para explicar el hecho de que los complejos de Zn(II) y Cd(II) operan de forma catalítica, regenerando al nucleófilo, se ha sugerido el ataque intramolecular de un OH⁻ coordinado al catión del complejo [Suh, 1984, Yatsimirsky, 1998]. En este trabajo no se preparó el derivado acilado de la HOxAPy que permitiría estudiar la cinética de desacilación de los complejos para poder entender más detalles sobre el efecto del catión metálico en el efecto de activación por lo que las posibles diferencias entre los mecanismos por los cuales suceda la hidrólisis por el

complejo con Cd(II) y con Zn(II) no pueden ser precisadas por el momento sin más estudios cinéticos que involucren por ejemplo cinéticas de desacilación e incluso la valoración de la reactividad ante otros sustratos con diferentes grados de activación.

Un aspecto importante en el estudio de la activación de oximatos que se encuentra en la literatura consultada ha sido entender el papel del ligante y del catión metálico en los efectos de activación observados. Por eso es importante comparar los resultados obtenidos en este trabajo con la HOxAPy y sus complejos y los reportados en la literatura para una de las oximas estudiadas por Tonellato y colaboradores [Mancin, 2000], ya que la variación de la estructura entre estas oximas radica en la diferente conectividad de los grupos presentes, pero los resultados obtenidos en presencia de Zn(II) son radicalmente diferentes aun cuando las condiciones de estudio son similares y se compara ante el mismo sustrato. Para mayor claridad en la tabla 12.0 se muestran los resultados con fines comparativos.

Tabla 12.0. Resultados obtenidos para la reactividad esterolítica de la oxima trabajada por el grupo de Tonellato y la HOxAPy estudiada en este trabajo.



$pK_{a\text{LH}}$	11.1	11.74
k_{L}^-	$45\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$	$84\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$
$\log K_{\text{Zn(L)}^+}$	3.2	9.4
$pK_{a\text{ZnLH}}$	7.8	8.2
k_{ZnL}^+	$7.1\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$	$8700\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$
$pK_{a\text{CuLH}}$	4.4	
$\log K_{\text{Cu(L)}^+}$	> 7	n.d.
$\log K_{\text{Cd(L)}^+}$		6.8
$pK_{a\text{CdLH}}$		9.4
$k_{(\text{CdL})^+}$		$10900\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$

De la tabla 12.0 puede apreciarse que las diferencias en los valores de pK_a de ambas oximas libres no es grande e incluso la reactividad intrínseca del oximato

es del mismo orden, siendo ambos alfa nucleófilos. Lo más llamativo son los resultados obtenidos en la reactividad esterolítica del complejo con Zn(II), ya que la constante de reactividad en la oxima estudiada por el grupo de Tonellato disminuye de $45 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el oximato libre a $3.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el complejo con Zn (II), mientras que en la HOxAPy aquí estudiada el aumento en la constante de reactividad en presencia de Zn(II) es del orden de 10^2 respecto a la oxima libre. La diferencia en la constante de acidez entre ambos complejos es de apenas 0.4 unidades (7.8 vs 8.2) de logaritmo por lo que la diferencia en la reactividad intrínseca difícilmente puede correlacionarse por diferencias en la basicidad de los complejos. Una diferencia mucho más importante es el valor de la constante de formación de los complejos en cuestión, siendo el complejo de la HOxAPy con Zn(II) notablemente más estable, diferencia que sin embargo no se refleja de manera semejante en los valores de pK_a . Este resultado es de importancia debido a que la variación estructural del ligante condujo a resultados muy diferentes en la reactividad del complejo con Zn(II), lo cual pone de relieve la importancia de entender el efecto de la estructura del ligante en los efectos de activación de las oximas, en este sentido cabe señalar que la HOxAPy ya no se considera una oxima aromática y esta diferencia condujo a una mayor estabilidad del complejo reactivo, quizá debido a una mayor movilidad de los enlaces del ligante en la HOxAPy que le permita adoptar conformaciones de mayor estabilidad en el complejo e incluso en los estados de transición de los ataques nucleofílicos al sustrato. El efecto de activación con Cd(II) no podemos compararlo pues en el estudio de Tonellato y colaboradores no fue estudiado pero cabe señalar que el alto incremento en la reactividad en presencia de Cd(II) indica que los complejos aquí estudiados con la HOxAPy guardan una correlación entre reactividad y pK_a , ya que se obtuvo mayor reactividad intrínseca para el complejo con Cd(II) ($k_{Ox} = 10900 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $pK_a = 9.39$) que para el de Zn(II) ($k_{Ox} = 8700 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $pK_a = 8.18$). Esta última diferencia puede atribuirse a la mayor acidez del catión de Zn(II) respecto a Cd(II), que le confiere mayor acidez a su complejo pero no por ello una disminución drástica de su reactividad intrínseca, representando un sistema bastante interesante por sus cualidades.

Dadas las anteriores consideraciones, para el complejo con Zn(II) se puede proponer que el esquema que se muestra en la figura 13.3 puede explicar algunos de los efectos de activación mencionados y la propiedades catalíticas observadas.

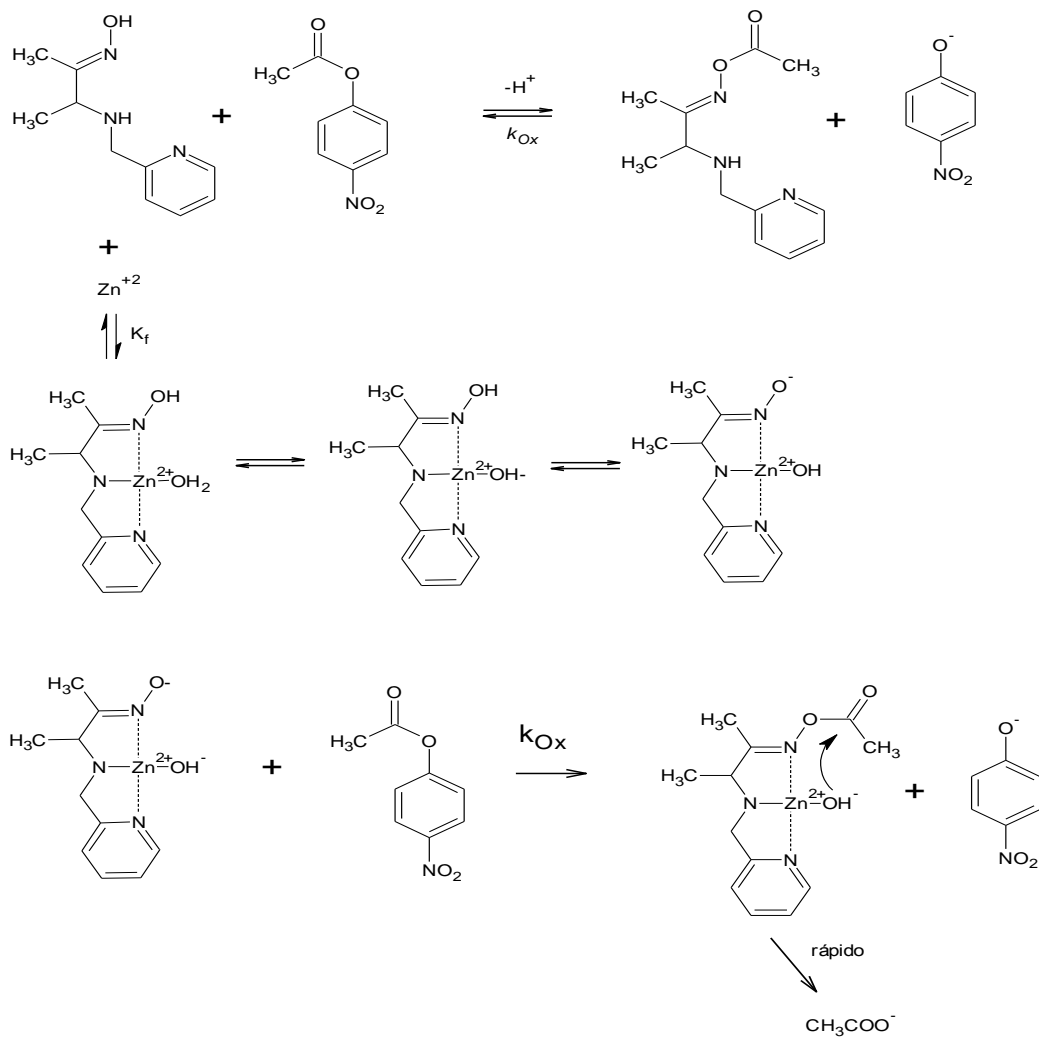


Figura 12.3. Propuesta razonable para el mecanismo de hidrólisis del *p*-NFA y el comportamiento catalítico observado en presencia del complejo Zn[(OH)(OxAPy)].

13. Conclusiones

- A este respecto, el papel desempeñado por el catión metálico también es claramente importante dada la gran diferencia obtenida al usar un mismo ligante y variar el catión metálico. En este caso el Zn(II) y el Cd(II) pertenecen al mismo grupo, sin embargo el Zn(II) es más pequeño y por lo tanto más duro. Esto se refleja en que es un ácido de Lewis más fuerte que el Cd(II) y acidifica más el grupo oximato, pero su reactividad es menor (sin llegar al caso del Cu(II) cuando las constantes de formación de los complejos son muy grandes, pero el oximato se acidifica tanto que pierde casi por completo su reactividad).
- En este trabajo los mejores efectos fueron logrados con Cd(II) y Zn(II). A pH 7.0 el efecto catalítico es más notable para el Zn(II), sin embargo, al comparar las constantes de velocidad de segundo orden para ambos complejos, el complejo de Cd(II) da un efecto catalítico mucho mayor, pero el pK_a de su complejo oximato es una unidad mayor que el del Zn(II).
- La gran reactividad encontrada para el complejo de $[Zn(OH)(OxAPy)]$, 100 veces la reactividad del anión oximato, y el hecho de que hay una fracción desprotonada considerable a pH 7.0 lo hacen un sistema interesante dadas las características biológicas del catión Zn(II), y hace de este complejo un buen sistema biomimético de metaloenzimas.
- El complejo $[Cd(OxAPy)]^+$ es más reactivo que el complejo de Zn(II) pero es más básico. El efecto catalítico es de 130 veces sobre el oximato libre, por lo que es el sistema metal-oximato más reactivo que conocemos
- La especie cinéticamente activa con Cd(II) no incluye un OH- formado por desprotonación de la molécula de agua, probablemente porque el pK_a de esta molécula también es más básico que para el Zn(II).
- Es claro que el papel del catión metálico no es únicamente acidificar al ligante oxima, sino que debe existir una contribución adicional a la desacilación del complejo oximato. Esta contribución depende de la naturaleza del catión metálico y probablemente involucre otros factores más allá de su dureza o blandura en términos de Pearson.

- Los resultados de este trabajo van de acuerdo con el argumento del importante efecto que puede tener la estructura del ligante en el aumento de la reactividad esterolítica de los complejos metálicos de las oximas (la HOxAPy posee variaciones estructurales respecto a otras oximas reportadas en la literatura y observan efectos muy distintos) formando especies cuya reactividad sobrepasa la del anión oximato libre. No es claro cuáles son los efectos estructurales del ligante para promover que se formen complejos cinéticamente activos.
- Se considera importante pensar que un enfoque que se base en las propiedades estructurales y electrónicas de las especies formadas así como de los aspectos mecanísticos, y no sólo de los cationes o ligantes por separado, sea quizá un buen camino para lograr el entendimiento de los efectos observados en la activación de oximatos por coordinación con cationes metálicos, y de esa forma comprender de mejor manera el comportamiento de este tipo de alfa nucleófilos cuando forman sistemas de coordinación.

14. Glosario

Constantes de Equilibrio El valor numérico de la expresión de constante de equilibrio de un sistema en equilibrio

Constante de Formación Para un complejo mononuclear binario, si un átomo central(grupo central) M (metal) y un ligando L han sido definidos, la expresión K_n es la constante de formación por etapas y β_n es la constante de estabilidad (por etapas o acumulativa)

Constante de Estabilidad Es la constante de equilibrio que expresa la tendencia de una sustancia que se forma a partir de sus componentes. Cuanto mayor sea la constante más estable son las especies. La constante de estabilidad (constante de formación) es el recíproco de la constante de inestabilidad (constante de disociación).

Constante de Acidez Constante de equilibrio que expresa el grado en que un ácido transfiere un protón al agua o algún otro medio específico.

Constante de Rapidez Es la constante de proporcionalidad entre la velocidad de la reacción y la concentración del reactivo.

Tiempo de vida media Tiempo que tarda la concentración de un reactivo en bajar a la mitad de su valor inicial; tiempo que tarda en desintegrarse la mitad de una muestra de un radioisótopo dado

15. Apéndice

Cálculo de la constante de rapidez a partir de una cinética de primer orden.

La oximinólisis del *p*-NFA sigue la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{d[p-NF^-]}{dt} = k_{obs}[p-NFA][OxAPy^-] \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde se considera que el orden de reacción respecto a cada especie es uno y $[HOxAPy]$ es la concentración de la oxima libre o complejada con iones metálicos. En presencia de cationes metálicos la oxima funciona en un régimen catalítico y su concentración no cambia en el tiempo, debido a esto, obtenemos una condición de pseudoprimer orden, de forma que la rapidez de formación de *p*-NP⁻ será:

$$\frac{d[p-NF^-]}{dt} = k_{obs}[p-NFA] = -\frac{d[p-NFA]}{dt}$$

$$\frac{d[p-NFA]}{[p-NFA]} = -k_{obs}dt$$

Donde $k_{obs} = k'_{Ox}[OxAPy^-]$. En el caso de un proceso sin catión metálico, este tratamiento puede emplearse en condiciones en un gran exceso de la oxima sobre el ester.

Al integrar la ecuación diferencial, se obtiene de evaluar la constante a $t=0$ que:

$$\int \frac{d[p-NFA]}{[p-NFA]} = -k_{obs} \int_0^t dt$$

$$[p-NFA] = [p-NFA]_0 e^{(-k_{obs}t)} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

A partir del balance de masa del *p*-NFA presente, tenemos:

$$[p-NFA] = [p-NFA]_0 - [p-NF^-]$$

Sustituyendo el resultado anterior en la ecuación 1.1, obtenemos una dependencia respecto a la concentración de p -NFA inicial:

$$[p - NF^-] = [p - NFA]_0 - [p - NFA]_0 e^{(-k_{obs}t)}$$

$$[p - NF^-] = [p - NFA]_0 (1 - e^{(-k_{obs}t)}) \quad (1.2)$$

Si consideramos la Ley de Beer, y debido a que la celda de reacción posee 1 cm de paso óptico:

$$A^{400} = \varepsilon_{p-NF^-}^{400} [p - NF^-]$$

En el máximo de absorción de p -NF⁻ a 400 nm. Considerando lo anterior en la Ecuación 1.2:

$$A^{400} = \varepsilon^{400} [p - NFA]_0 (1 - e^{(-k_{obs}t)})$$

A un tiempo infinito, habrá una conversión completa del p -NFA inicial:

$$A^{400} = A_{\infty}^{400} (1 - e^{(-k_{obs}t)})$$

Pero la lectura se hace tras un lapso de tiempo t_0 , de forma que habrá una concentración inicial del producto, debida al tiempo de transformación no monitoreado igual a A_i :

$$A^{400} = A_i + \Delta A_{\infty}^{400} (1 - e^{(-k_{obs}t)})$$

Donde $\Delta A_{\infty}^{400} = A_{\infty}^{400} - A_i$ y t_i es el tiempo instrumental $t_i = t - t_0$

Determinación de la k_{obs} a partir del método de rapidez inicial

En los tiempos cortos, la rapidez inicial de oximinólisis del p -NFA, sigue la siguiente ecuación cinética :

$$\frac{d[p-NF^-]_{inicial}}{dt} = k [p - NFA]_0 [HOxAPy] \quad \text{Ecuación 2.0}$$

Si cumple la ley de Beer para el cambio en la concentración del p -NF⁻

$$\frac{d[p-NF^-]}{dt} = \frac{dA_{p-NF^-}/\varepsilon_{p-NF^-}}{dt} = \frac{1}{\varepsilon_{p-NF^-}} \frac{dA_{p-NF^-}}{dt} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Si sustituimos en la Ecuación 2.1 y consideramos tiempos de conversión muy cortos obtenemos la Ecuación 2.2

$$\left(\frac{1}{\varepsilon_{p-NF^-}} \frac{dA_{p-NF^-}}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = k_{obs}[p - NFA]_0 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde $k_{obs} = k[\text{HOxAPy}]_0$. La ecuación es una línea recta en tiempos pequeños. Podemos considerar que la rapidez de reacción inicial será:

$$v_0 = \left(\frac{A_{p-NF^-}}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}$$

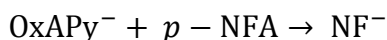
De forma que al sustituir en la Ecuación 2.2

$$\frac{1}{\varepsilon_{p-NF^-}} v_0 = k_{obs}[p - NFA]_0$$

$$k_{obs} = \frac{v_0}{\varepsilon_{p-NF^-}[p - NFA]_0} = \frac{v_0}{\Delta A_\infty}$$

La constante de oximinólisis

A partir del mecanismo de la figura 9.8 para la esterólisis del *p*-NFA en presencia del ligante HOxAPy se observa que la actividad depende de la concentración del ion oximato, y ésta a su vez depende del pH al que se realicen las determinaciones.



La constante de oximinólisis a cada pH, k'_{ox} , depende del valor del pK_a del ligante HOxAPy, por lo tanto la constante de oximinólisis independiente de pH, k_{ox} se puede escribir como:

$$k_{obs} = \frac{k_{Ox}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}} [OxAPy^-]_0$$

Ecuación 1

Si se considera $k_{obs} = k'_{Ox}[OxAPy^-]_0$ y se sustituye en la Ecuación 1 se tiene:

$$k'_{Ox} = \frac{k_{Ox}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}}$$

En forma logarítmica:

$$\log k'_{Ox} = \log k_{Ox} - \log \left(1 + \frac{[10^{-pH}]}{K_a} \right)$$

Ajuste no lineal de las titulaciones espectrofotométricas

Para el ajuste no lineal de las titulaciones espectrofotométricas ligante – metal se consideran el respectivo balance de masa que considera al ligante $[L]_t$ y metal

$[M]_t$:

$$[L]_t = [L] + [ML]$$

$$[M]_t = [M] + [ML]$$

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Se toma en cuenta la interferencia en la absorbancia medida, pues las especies que absorben pueden ser el ligante y el complejo. Debido a ello se incluyen únicamente las absorbancias de las especies que interfieren en el espectro UV-Vis. Cuando las cantidades de ligante y metal llegan a ser semejantes durante la titulación, no puede asumirse que $[M] \gg [L]$ ó $[L] \gg [M]$, siendo en este último caso $[M]_t \approx [M]$ y considerando que $[Abs]_t = [Abs]_M + [Abs]_L + [Abs]_{ML}$ se llega a la siguiente ecuación:

$$Abs = \frac{(\varepsilon_L + \varepsilon_{ML}K_{ML}[M]_T)[L]_T}{(1 + K_{ML}[L]_T)}$$

Sin embargo cuando no puede asumirse un exceso permanente de metal ni del ligante, como ocurre en las titulaciones espectrofotométricas realizadas, se debe considerar el balance de masa sin simplificaciones y obtener una ecuación no lineal de la cual se puede obtener el valor de K_{ML} como uno de los parámetros de ajuste.

$$Abs = Abs_L + 0.5\Delta\epsilon_{ML-L} \left\{ [L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} - \sqrt{\left[[L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} \right]^2 - 4[L]_0[M]_0} \right\}$$

Dicha ecuación puede introducirse en un software con Origin Lab para ser utilizada en el ajuste de datos experimentales.

En este tratamiento de los datos se sigue el desarrollo expuesto en "Principles and Methods in Supramolecular Chemistry", [Schneider, Yatsimirsky 2000].

16. Bibliografía

Abele, E.; Abele, R.; Lukevics, E. [2003] "Pyridine Oximes: Synthesis, reactions, and biological activity (Review)", *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 39 (7), 825-851.

Breslow, R.; Chipman, D. [1965] "Mixed metal complexes as enzyme models. I. Intracomplex nucleophilic catalysis by an oxime anion", *J. Am. Chem. Soc.*, 87 (18), 4195-4196.

Buncel, E.; Cannes, C.; Chatrousse, A.P.; Terrier, F. [2002] "Reactions of solvated α -nucleophiles with esters: evidence from solvation effects for substantial decoupling of desolvation and bond formation", *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 8766-8767.

Catalano, L.; Dreos, R.; Nardin, G.; Randaccio, L.; Tazzer, G.; Vuano, S. [1996] "Synthesis, structure and reactivity of cobalt (III) complexes with tridentate imino -and amino- oxime ligands", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 22, 4269-4273

Chakravorty, A. [1974] "Structural chemistry of transition metal complexes of oximes", *Coord. Chem. Rev.*, 13 (1), 1-46.

Degorre, F.; Kiffer, D.; Terrier, F. [1988] "Sulfur derivatives of 2-oxopropanal oxime as reactivators of organophosphate inhibited acetylcholinesterase in vitro: synthesis and structure-reactivity relationships", *J. Med. Chem.*, 31, 757-763.

Edwards, J.O.; Pearson, R.G. [1962] "The factors determining nucleophilic reactivities", *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 16-24.

Fersht, A.R. [1977] "Enzyme Structure and Mechanism". 2nd ed. W. H. Freeman and Co., Reading and San Francisco.

Fina, N. J.; Edwards, J. O. [1973] "The alpha effect. A review", *Int. J. Chem. Kinet.* 5, (1), 1-26.

Green, A. L.; Sainsbury, G. L.; Saville, B.; Stamsfield, M. J. [1958] "The reactivity of some active nucleophilic reagents with organophosphorus anticholinesterases", *J. Chem. Soc.*, 1583-1587.

Grekova, P.; Veselov, V. [1978] "The α -Effect in the Chemistry of Organic Compounds", *Russ. Chem. Rev.*, 47 (7), 631-648.

Hanania, G. I. ; Irvine, D. H. [1962] "The effect of co-ordination on ionization. Part I. Iron(II) and iron(III) complexes of pyridine-2-aldoxime", *J. Chem. Soc.* 2745-2749

Hoz, S.; Buncl, E. [1985] "An AM1 Study of an α -Nucleophile: Geometries and Interconversion Modes of Oximate Anion Stereoisomers", *Isr. J. Chem.*, 26, 3663-3672.

Hutton, A.T.; McEwan, D.M.; Show, B.L.; Wilkinson, S.W. [1983] "Transition Metal-Carbon Bonds. Part 56. Attack on Allene Complexes of Type *cis*-[PtCl,(PR₃)(C₃H₄)] by the Ambident Nucleophile, Acetoxime : Crystal Structure of [PtCl(PMe,Ph){ON(=CMe₂)CH=CMe}]", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2011-2013.

Ik-Hwan Um.; Buncl, E. [2001] "Ground-State versus Transition-State Effects on the α -Effect as Expressed by Solvent Effects", *J. Am. Chem.*, 123, 11111-11112.

Jencks, W.P.; [1969] "Catalysis in Chemistry and Enzymology", Dover, Nueva York.

Jencks, W.P.; Brant, S.R.; Grandler, J.R.; Fendich, G.; Makamura, Ch. [1982] "Nonlinear Bronsted Correlations: The Roles of Resonance Solvation and Changing Transition-State Structure", *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7045-7051.

Jencks, W.P.; Carriuolo, J. [1960] "Reactivity of nucleophilic reagent toward esters", *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1778-1786.

Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. [2000] "Activation of Oximic Nucleophiles by Coordination of Transition Metal Ions", *J. Org. Chem.* 1045-1050.

Martell, R.M.; Smith, A.E. [1989] "Critical stability Constants (Supplement), Plenum Press, N.Y.", 2,6.

Mehotra, R.C. [1987] "Oximes, guanidines and related species", *Comprehensive Coordination Chemistry*, 6, 1315 – 1319.

Meyer, G.; Viout P. [1981] "Effects micellaires sur la basicité et la réactivité de nucléophiles a aromatiques", *Tetrahedron* 37, 2269-227.

Pinart, J.; Petitfaux, C.; Faucherre, J. [1974] "Etude des cuivriques et cuivreux de la pyridine 2,6 dialdoxime.II. Stabilité en solution aqueuse", *Bull. Soc. Chim. Fr.* 5, 1786-1790.

Sandler, K.S.; Karo W. [1972] "Organic functional group preparations", *Organic Chemistry*, Vol.12-III. Blomquist, A.T. ; Wasserman, H. Academic Press N. Y. 365-405.

Schneider, Jörg.; Yatsimirsky, A.K. [2000] "Principles and Methods in Supramolecular Chemistry", *John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK*, 1.1.2 Spectrometric and other titrations.

Suh, J.; Cheong, M.; Han, H. [1984] "Multifunctional catalysis by metal complexes", *Bioorg. Chem.* 12, 187-196.

Suh, J. [1992] "Model Studies of Metalloenzymes Involving Metal Ions as Lewis Acid Catalysts", *Acc. Chem. Res.* 25, 273-279.

Suh, J.; Han, H. [1984] "Zinc ion catalyzed ester hydrolysis of o-acetyl-2-acetylpyridine ketoxime: bimolecular participation of hydrozinc (II) ion" *Bioorg. Chem.* 12, 177-187.

Suh, J.; Lee, E., Jang, E.S. [1981] "Kinetic study of the zinc ion catalyzed hydrolysis of o-acetyl-2-pyridine carboxaldoxime", *Inorg. Chem.* 20, 1932-1934.

Terrier, F.; Degorre F.; Kiffler D.; Laloi, M. [1988] "The effect of solvation on the reactivity of α -nucleophiles in aqueous solution. 1. Oximate anions", *Bull. Soc. Chem. Fr.*, 415.

Terrier, F.; MacCormack P.; Kizilian E.; Hallé J.C.; Demerseman P.; Guir F.; Lion C.; [1991] "Non-linear Brønsted correlations: evidence for a leveling off in the reactivity of oximate ions in aqueous solution", *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 153-158.

Valle, B.L.; D.S. [1993] "Zinc: Biological functions and coordinations motifs", *Acc. Chem. Res.* 26, 543-551.

Yatsimirsky A.K., [2005] "Metal ion catalysis in acyl and phosphoryl transfer: Transition states as ligands", *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 1997-2011.

Yatsimirsky A.K.; Kazanov, G.M.; Ryabov, A.D. [1992] "Ester Hydrolysis catalyzed by orthopalladated aryl oximes", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1295-1299.

Yatsimirsky A.K.; Gómez-Tagle, P.; Escalante-Tovar, S.; Ruiz-Ramírez, L. [1998] "Kinetics and mechanism of ester hydrolysis by metal complexes of 2,6-diacetylpyridine dioxime", *Inorg. Chim. Acta*, 273, 167.