



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTEROLISIS CATALÍTICA CON COMPLEJOS METÁLICOS DE LA OXIMA
HDAPAM**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA:

Ricardo David Flores Cruz



MÉXICO, D.F. 2014



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: DR. ARMANDO MARIN BECERRA
VOCAL: DRA. NORMA ANGÉLICA MACÍAS RUVALCABA
SECRETARIO: DRA. CLAUDIA PAOLA GÓMEZ TAGLE CHÁVEZ
1er. SUPLENTE: DRA. NURIA ESTURAU ESCOFET
2° SUPLENTE: M. EN C. JORGE LUIS LÓPEZ ZEPEDA

LUGAR 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

Asesora

Dra. Claudia Paola Gómez Tagle Chávez

Sustentante

Ricardo David Flores Cruz

INDICE

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes	9
4. Justificación	22
5. Objetivo general.....	24
Objetivos particulares.....	24
6. Material y Métodos.....	25
6.1 Reactivos	25
6.2. Equipo	28
6.3. Programas	28
6.4 Condiciones generales de trabajo	29
6.5 Determinación de los valores de pK_a del ligante y sus complejos	30
6.6. Determinación de los valores de las constantes de formación de los complejos	32
6.7. Estudios Cinéticos	32
7. Síntesis y caracterización.....	38
Análisis elemental	40
Espectrometría de masas	40
RMN 1H	43
RMN ^{13}C	47
Espectroscopía UV-Vis.	49
Espectroscopía de Infrarrojo	49
8. Determinación de los valores de pK_a del ligante Hdapam	57
Espectrofotometría	57
Potenciometría.....	59
9. Reactividad nucleofílica del ligante Hdapam	62
Dependencia del pH en la hidrólisis del NFA con Hdapam	63
Dependencia de constante de rapidez con respecto de la concentración de Hdapam a diferentes valores de pH.	65
Comparación de la reactividad con el ligante disustituido Dapydam.	77
Estudios cinéticos de la esterólisis de NFA en presencia de Hdapam catalizada con cationes metálicos	78

10. Constantes de formación de los complejos Hdapam con Cd(II) y Zn(II)	82
RMN ¹ H	82
Espectrofotometría	86
11. Determinación del pK_a de los complejos de Hdapam con Cd(II) y Zn(II)	91
Espectrofotometría	91
Potenciometría.....	93
12. Reactividad nucleofílica de Hdapam en presencia de Cd(II) y Zn(II).	97
Efecto de Cadmio	97
Efecto de Zinc.....	105
13. Resumen y análisis global de resultados	110
14. Conclusiones	116
15. Glosario	118
16. Apéndice	119
(A) Modelo para la disociación ácida del grupo oxima.....	119
(B) Determinación de k_{obs} a partir de método integral.....	120
(C) Determinación de la k_{obs} a partir del método de rapidez inicial.....	123
(D) Constante de oximinólisis	124
(E) Ajuste no lineal de las titulaciones espectrofotométricas	125
(F) Determinación de la k_{ox} y pK _a de Hdapam a partir de k_{corr} en función del pH.....	126
17. Bibliografía	128

Símbolos y abreviaturas

Abs	Absorbancia
A_{inf}	Valor límite de la absorbancia al tiempo infinito
H ₂ dapd	2,6-diacetilpiridina dioxima
Hdapam	2,6-diacetilpiridínamida monoxima
Dapydam	Diacetilpiridín diamida
ϵ	Coefficiente de 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_{OH}'	Constante de rapidez de hidrólisis básica a un cierto valor de pH
k_{corr}	$k_{obs} - k_{OH}'$
k_{ML}	Constante de rapidez de hidrólisis debida al complejo ML.
nm	nanómetros
K_a	Constante de disociación ácida
NF ⁻	<i>p</i> -nitrofenolato
NFH	<i>p</i> -nitrofenol
NFA	<i>p</i> -nitrofenilacetato
$t_{1/2}$	tiempo de vida media
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)-etanosulfónico
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-1-etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico

1. Resumen

En el presente trabajo se sintetiza un nuevo ligante tetradentado que presenta un grupo funcional oxima a partir de la 2,6-diacetilpiridíndioxima y 2-bromoacetamida, aquí denominado **Hdapam**; este ligante se caracterizó mediante análisis elemental y técnicas espectroscópicas como ^1H RMN, ^{13}C RMN, IR, UV-Vis, espectrometría de masas. Los estudios cinéticos realizados en disolución acuosa con 10% de metanol indican que el ligante Hdapam se comporta como un α -nucleófilo en la hidrólisis del éster *p*-nitrofenilacetato (NFA).

Este ligante tetradentado forma complejos con varios cationes metálicos divalentes de la primera serie de transición (Mn (II), Ni (II), Cu (II), Co (II)) además de Zn (II) y Cd (II), por lo que se estudió el efecto catalítico de estos cationes hacia NFA en función del pH y concentración de los reactivos. Se encontró que los cationes que tienen mayor efecto catalítico son Zn (II) y Cd (II).

Para hacer un análisis del efecto catalítico con Zn(II) y Cd(II) se determinaron, mediante titulaciones espectrofotométricas y potenciométricas, las constantes de formación de las especies presentes en disolución lo cual involucra tanto las constantes de acidez del nuevo ligante como las constantes de formación de los complejos con las formas protonadas y desprotonada del ligante. Con estas constantes se hizo la especiación del ligante y de sus complejos a las condiciones usadas en cinética, y se lograron separar las contribuciones de las especies cinéticamente activas: OH^- , oximato libre y complejos metal-oximato.

El complejo Cddapam^+ resultó ser el más eficiente en la hidrólisis de NFA con una constante, k_{ox} , de $1050 \pm 40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y tiene efectos importantes a partir de valores de pH cercanos a 9. El complejo de Zndapam^+ tiene una constante, k_{ox} , de $215 \pm 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ con efectos notables a valores de pH cercanos a 8. Las reacciones son de primer orden respecto a estos complejos. En todos los experimentos se observaron curvas cinéticas de primer orden, aunque no siempre se mantuvieron condiciones estrictas de exceso de complejo con respecto al sustrato, por lo que los complejos deben operar de forma catalítica.

2. Introducción

La química biomimética busca imitar la reactividad de estructuras biológicas para poder comprender como funcionan sus mecanismos de acción y plantear un modelo que permita el diseño de nuevos sistemas de funcionalidad biológica pero de menor complejidad e igual o mejor reactividad. Entre estas estructuras biológicas sin duda las enzimas juegan un papel muy importante pues catalizan muchas funciones fisiológicas. Las enzimas se pueden clasificar según su función como nucleofílicas, electrofílicas, de óxido reducción, etc. y muchas de las enzimas suelen tener un catión metálico coordinado en su sitio activo y por ello se les denomina metaloenzimas [Breslow 1972]. Las enzimas de naturaleza protéica son estructuras complicadas como para sintetizarlas en el laboratorio y, dado que son muy específicas, para cada aplicación biotecnológica se requiere producir y aislar una enzima particular. De ahí la importancia en diseñar catalizadores o "enzimas artificiales" que sirvan como punto de partida para entender a estos sistemas más complejos y que a futuro nos permitan lograr aplicaciones prácticas.

Los cationes metálicos coordinados en los sitios activos de las metaloenzimas les confieren propiedades necesarias para su funcionamiento. Las funciones principales de los cationes metálicos están asociadas con el cambio de estructura, ya sea por el cambio de número de coordinación para facilitar la interacción con el sustrato, por la disminución del pK_a de moléculas de agua coordinada, por cambios en la solvatación, por cambios en su estado de oxidación, por cambios en el pK_a de alguna sección de la enzima o bien varias de estas contribuciones. Por ejemplo, el mecanismo propuesto para la enzima carboxipeptidasa A, Figura 2.1, involucra la desprotonación de una la molécula de agua coordinada al zinc a un pH cercano a 7 y un posterior ataque nucleofílico hacia el sustrato previamente asociado en el interior hidrofóbico de la enzima [Bertini 1994]. Este mecanismo implica la activación de un nucleófilo mediante coordinación, generalmente H_2O/OH^- en las enzimas naturales, pero este mismo principio de activación puede usarse en

“enzimas artificiales” empleando una gama más amplia de nucleófilos. También se puede emular la asociación con el sustrato mediante grupos funcionales que faciliten la formación de pares iónicos, la coordinación con cationes metálicos, la coordinación tipo ácido-base de Lewis, la formación de puentes de hidrógeno, etc.

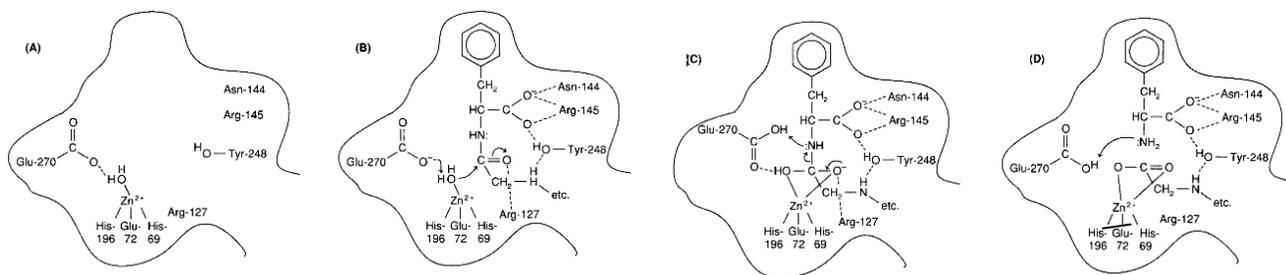


Figura 2.1 Mecanismo propuesto para la enzima carboxipeptidasa A.

En la presente tesis se buscó mimetizar la reactividad de una enzima hidrolítica empleando nucleófilos más reactivos que el OH^- hacia la hidrólisis de ésteres y que pertenecen al grupo denominado α -nucleófilos, en particular con una piridín oxima y sus compuestos de coordinación, con base en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación

3. Antecedentes

Las oximas son el producto de la condensación entre la hidroxilamina y un aldehído o una cetona, dando como resultado una aldoxima o una cetoxima respectivamente. En el caso de las piridín oximas el carbono de la oxima está unido al anillo de piridina (orto, para o meta, Figura 3.1) por un enlace sencillo y con un grupo R que puede ser hidrógeno, dando una piridín aldoxima, o si está unido a un grupo alifático o aromático da una piridín cetoxima.

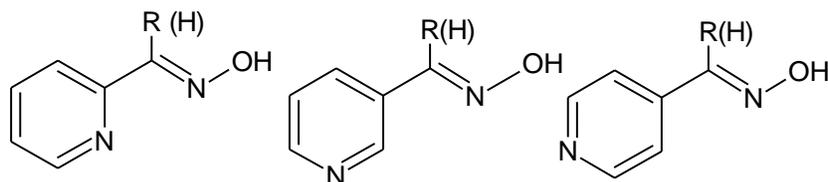


Figura 3.1 Estructuras generales de piridín oximas sustituidas en *orto*-, *meta*- y *para*-respectivamente.

Por sus características estructurales las piridín oximas han sido de interés como ligantes en química de coordinación. Poseen sitios potencialmente donadores de electrones: el átomo de oxígeno o ambos átomos de nitrógeno, por ello son capaces de coordinar una gran variedad de ácidos de Lewis, incluyendo átomos no metálicos, en diferentes posiciones y geometrías [Abele 2003]. En la Figura 3.2 se muestran algunas de las posibles formas de coordinación de la 2-piridínoxima con cationes metálicos [Harris 2000].

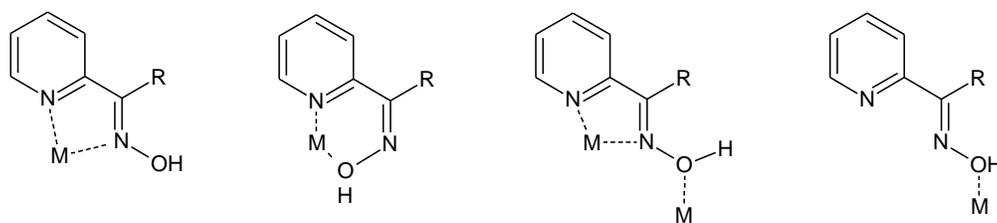


Figura 3.2 Diferentes formas coordinantes de la 2-piridínoxima con cationes metálicos.

Por otra parte la acidez de las piridín oximas cambia al tratarse de una aldoxima o cetoxima y se modifica con los sustituyentes en el anillo de piridina. Las piridín oximas tienen generalmente un valor de pK_a asociado con la protonación del anillo

de la piridina, y uno o más valores de pK_a dependiendo del número de grupos oxima u otros grupos ionogénicos presentes en la molécula. Estos valores de pK_a se ven afectados cuando se forman compuestos de coordinación con cationes metálicos y, dependiendo de qué catión metálico se coordine, generalmente aumenta su acidez [Bertini, 1994].

En general, existe una correlación entre la basicidad de un nucleófilo con su reactividad para nucleófilos de estructura similar. Una reacción nucleofílica involucra la donación del par de electrones del nucleófilo a un sustrato con la formación parcial de un enlace en el estado de transición y la presencia de una carga parcial positiva sobre el nucleófilo. Por su parte, la basicidad es la tendencia a donar un par de electrones a un protón formando un enlace parcial con el desarrollo de una carga positiva sobre la base. Dado que estos dos procesos son muy similares se espera que exista una correlación entre ambos: mientras más básico es un nucleófilo se espera que su nucleofilia sea mayor. Esto se puede observar claramente en una gráfica de Brønsted ($\log k$ en función de pK_a , Figura 3.3) o en forma de ecuación (Ecuación 1).

$$\log k = \beta pK_a + b \qquad \text{Ecuación 1}$$

En esta expresión k es la constante de rapidez para la reacción de sustitución nucleofílica, β es la pendiente (sirve como parámetro cuantitativo de la correlación de la reactividad nucleofílica con su basicidad), pK_a es la constante de acidez del ácido conjugado del nucleófilo y b es la ordenada al origen.

Para nucleófilos del mismo tipo, se observan líneas rectas en las coordenadas de Brønsted; en estas rectas la pendiente se interpreta como una medida de la afinidad relativa del nucleófilo hacia el sustrato en el estado de transición ($\log k_{\text{obs}}$) y la afinidad del nucleófilo hacia el protón del agua está dada por el pK_a . Si se compara la reactividad hacia NFA para diferentes tipos de nucleófilos, se ha observado que siguen líneas paralelas con pendientes cercanas a 1.0 que indica

que la reactividad depende fuertemente de la basicidad [Bruice 1958]. Cuando la pendiente de esta recta es cero, puede ser que la etapa limitante de la rapidez no incluya al nucleófilo o bien, que hay factores que compensan la nucleofilia y la basicidad del nucleófilo [Jencks 1982].

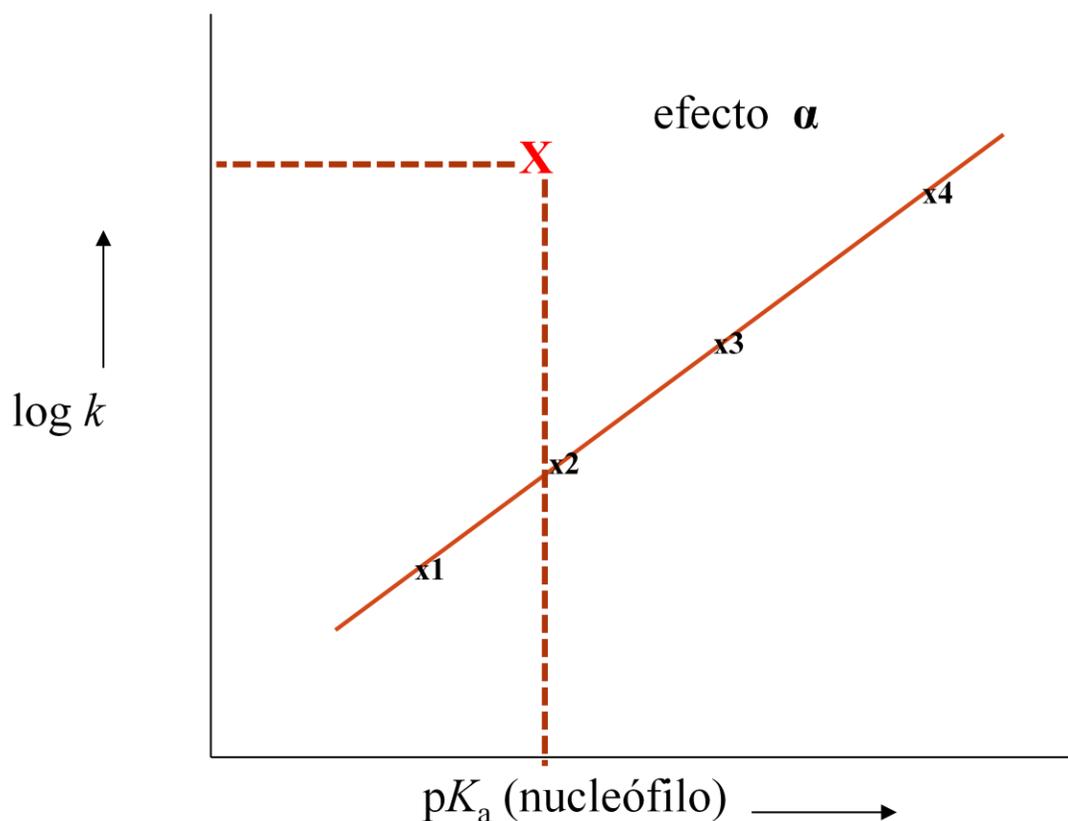


Figura 3.3 Gráfica en coordenadas de Brønsted donde x_1 , x_2 , x_3 , x_4 representan un nucleófilo del mismo tipo y X representa un α -nucleófilo.

Sin embargo, existe un grupo de nucleófilos para los cuales la reactividad observada es mayor que la esperada por su basicidad, Figura 3.4. Algunos ejemplos de α -nucleófilos son la hidrazina, la hidroxilamina, así como aniones de hipoclorito, ácidos hidroxámicos, oximas, hidroperóxidos, nitrito, sulfito, etc.

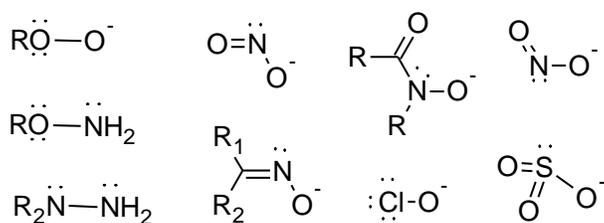


Figura 3.4 Ejemplos de grupos funcionales que se comportan como α -nucleófilos.

Esta característica fue observada para varios tipos de nucleófilos desde hace muchos años por Edwards y Pearson [Edwards 1962], quienes le dieron el nombre de “efecto alfa” pues la adjudicaron a la presencia de un átomo adyacente al átomo nucleofílico capaz de donar un par de electrones. Actualmente se usa una definición alternativa del efecto alfa que es “la desviación positiva que exhibe un α -nucleófilo en una gráfica de nucleofilia tipo Brønsted” [Hoz 1985], ver Figura 3.3.

Posteriormente, en estudios más detallados, se encontró que este efecto no depende de un solo factor sino que hay varios factores involucrados, dependiendo del nucleófilo específico [Dixon 1972]. Las explicaciones que se han dado para el efecto α incluyen principalmente: la desestabilización del estado basal del α -nucleófilo, la estabilización del estado de transición, la estabilización de los productos y la solvatación de los α -nucleófilos. Se han dado explicaciones más detalladas que argumentan que la alta reactividad se debe a un incremento de la densidad electrónica del átomo nucleofílico [Jencks 1969], sin embargo este aumento se muestra sólo en la nucleofilia y no en la basicidad del nucleófilo [Guillot-Edlheit 1978].

A partir de cálculos *ab initio* se ha mostrado que para nucleófilos aniónicos, cuando se consideran tanto efectos de primer orden (electronegatividad) como de segundo orden (perturbacionales), y se hace un análisis de los orbitales frontera, la predicción de la reactividad para α -nucleófilos en fase gas es inversa a la

observada experimentalmente en disolución: su reactividad debería ser menor que para otro tipo de nucleófilos [Wolfe 1982]. Esto sucede porque la desestabilización del estado basal del α -nucleófilo, la estabilización del estado de transición y la estabilización de los productos, están interrelacionados de acuerdo a la teoría de la reactividad de Marcus y porque no se consideran los efectos de solvatación.

Existe además un grupo de α -nucleófilos aniónicos muy básicos (como los aniones de las oximas y de los ácidos hidroxámicos) no siguen esta correlación lineal y además muestran una tendencia a “nivelarse” a partir de valores de pH mayores a 8.0, de manera que un incremento en la basicidad no incrementa la reactividad (ver Figura 3.5). Una de las explicaciones que se ha dado a este efecto de “nivelación” está relacionada con la solvatación del nucleófilo o “*solvation imbalance*”, ver glosario [Terrier 1988, 1991, 2003; Jencks 1982; Um 2001, Buncel 2002].

Este “desbalance en la solvatación” se refiere a que el nucleófilo se debe desolvatar antes de realizar el ataque nucleofílico y formar un enlace para dar el estado de transición. Existe una relación proporcional entre el cambio en la nucleofilia ($\Delta \log k$) y el producto de la pendiente de la gráfica de Brønsted, β_{nuc} , por la constante de equilibrio entre la especie solvatada y no solvatada ($\log K_d$), como se muestra en la Ecuación 2 [Buncel 2002]:

$$\Delta \log k = (1 - \beta_{nuc}) \log K_d \quad \text{Ecuación 2}$$

De esta ecuación es claro que mientras más energía se requiera para desolvatar al nucleófilo (se hace más negativo el valor de $\log K_d$) también se hace más negativo el valor de $\Delta \log k$, y por lo tanto la pendiente en coordenadas de Brønsted es casi cero. En otras palabras, si el nucleófilo es más básico se requiere más energía para desolvatarlo lo que hace más lenta la reacción; este efecto es opuesto al incremento en la velocidad por un aumento en la basicidad del nucleófilo. En el caso de los aniones oximato hacia NFA el efecto desaparece al cambiar de

disolvente, por ejemplo hacia mezclas acuosas ricas en DMSO; aquí, debido a que hay menos interacciones tipo puente de hidrógeno, el nucleófilo está menos solvatado y por lo tanto se reduce la desincronización entre la desolvatación y la formación del enlace.

En particular, se ha observado este efecto de "nivelación" para piridín oximas que se comportan como α -nucleófilos. Para ejemplificar este comportamiento, en la Tabla 3.1 se han reunido algunos valores de pK_a para oximas junto con las constantes de rapidez de segundo orden en la hidrólisis del NFA, k_{ox} ($M^{-1}s^{-1}$) correspondientes a sus aniones oximato; en la Figura 3.5 se presentan estos datos en coordenadas de Brønsted y en la Figura 3.6 están las correspondientes estructuras de las oximas. Como se indica con la línea horizontal en la Figura 3.5 hay un efecto de nivelación para oximas aromáticas a un pK_a aproximadamente mayor a 8.0.

Tabla 3.1 Constantes de segundo orden para la hidrólisis del NFA de aniones oximato (k_{ox}), y sus respectivos valores de pK_a a 25°C.

No.	Oxima	pK_a	$k_{ox} M^{-1} s^{-1}$	Referencia
1	3-dimetilsulfonio-MINA	6.54	2.4	Degorre 1988
2	HI-6	7.13	11.8	Terrier 1991
3	2-PAM	7.75	25	Terrier 1991
4	4-PAM	8.27	61	Terrier 1991
5	Salicilaldoxima	9.2	53.3	Jencks 1960
6	4-piridín aldoxima (4-PAO)	9.98	63.3	Meyer 1981
7	2-piridín-aldoxima (2-PAO)	10.04	77.2	Breslow 1965
8	6-[(Metilamino)metil]-2-[1-hidroximino)etil]piridina	11.1	45	Mancin 2000
9	Acetofenona oxima	11.45	42.3	Yatsimirsky 1992
10	HOxAPy	11.74	84	Yatsimirsky 2013
11	Acetoxima	12.4	61.7	Jenck 1960

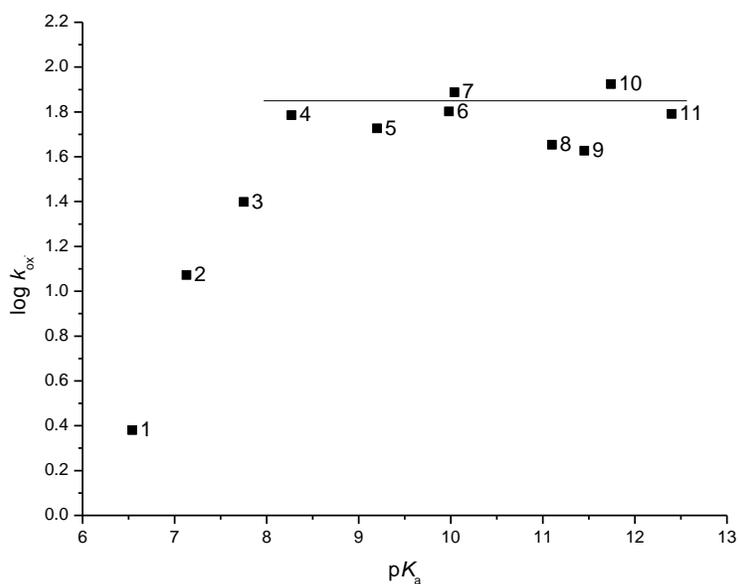


Figura 3.5 Gráfica de $\log k_{ox}$ en función del pK_a para los iones oximato de la Tabla 3.1. Donde la línea horizontal indica la nivelación en la reactividad respecto al pK_a .

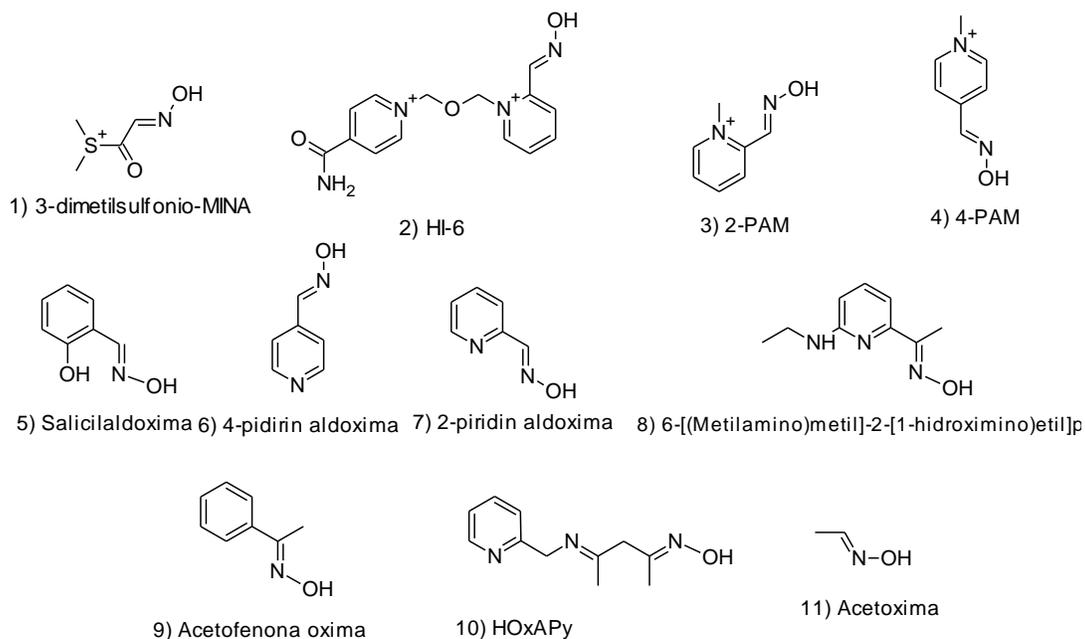


Figura 3.6 Estructuras de las oximas de la Tabla 3.1 y representados en la gráfica de la Figura 3.5 por números.

Por otro lado, las oximas con valores de pK_a entre 10 y 13 exhiben una baja reactividad nucleofílica a valores de pH cercanos al fisiológico, debido a que la

fracción desprotonada a valores de pH cercanos a 7 es baja y por lo tanto la concentración de la especie nucleofílica también lo es.

Dado que las piridín oximas son buenos ligantes, se comportan como α -nucleófilos y tienen este efecto de nivelación en su reactividad, es posible lograr un efecto catalítico mediante coordinación con cationes metálicos. Es altamente probable que al coordinarse el nitrógeno de estas piridín oximas disminuya su valor de pK_a (siempre y cuando este decremento esté dentro de la zona de nivelación) sin que su reactividad disminuya, simplemente por generar una mayor cantidad del anión oximato (nucleófilo) a un valor menor de pH. Sin embargo, si el factor más importante para el efecto α es la presencia de uno o más pares de electrones libres en posición α al átomo nucleofílico, la reactividad de las oximas debería desaparecer al coordinarse el átomo de nitrógeno, puesto que estos electrones ya no están disponibles para compensar la deficiencia electrónica en el estado de transición. Por otro lado, si el factor más importante es el desbalance en la solvatación del nucleófilo, éste debe modificarse notablemente al estar coordinado a un catión metálico y tener una consecuencia en la reactividad.

Existen poca información respecto a la reactividad de oximas coordinadas, sin embargo, hay algunos aspectos que han sido aclarados. El primer ejemplo de activación del ion oximato por coordinación con iones metálicos fue reportado por Breslow y Chipman [Breslow 1965], usando Zn(II) y Ni(II) para activar 2-piridínoximas y ésteres aromáticos del ácido acético como sustratos. La coordinación de la 2-piridinaldoxima con el ión metálico acidifica el grupo oxima disminuyendo su pK_a de 10.04 a 6.5, lo que incrementa 1000 veces la concentración del anión oximato, y aunque la reactividad intrínseca del anión oximato coordinado es menor por un orden de magnitud que la reactividad del anión libre (debido a la menor basicidad del nucleófilo al coordinarse), el primer efecto predomina y el resultado global es un aumento de 100 veces de la reactividad en disolución neutra.

El mecanismo general para la esterólisis de ésteres de ácidos carboxílicos con oximas coordinadas ocurre mediante el ataque nucleofílico del grupo oximato sobre el carbonilo del éster, con la formación de un intermediario O-acilado, y una hidrólisis sucesiva del acilo, Figura 3.7. Inicialmente se reportó que no era catalítico [Breslow 1965] pero posteriormente el grupo de Suh [Suh 1992, Suh 1981] demostró que 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, pero completan un proceso catalítico.

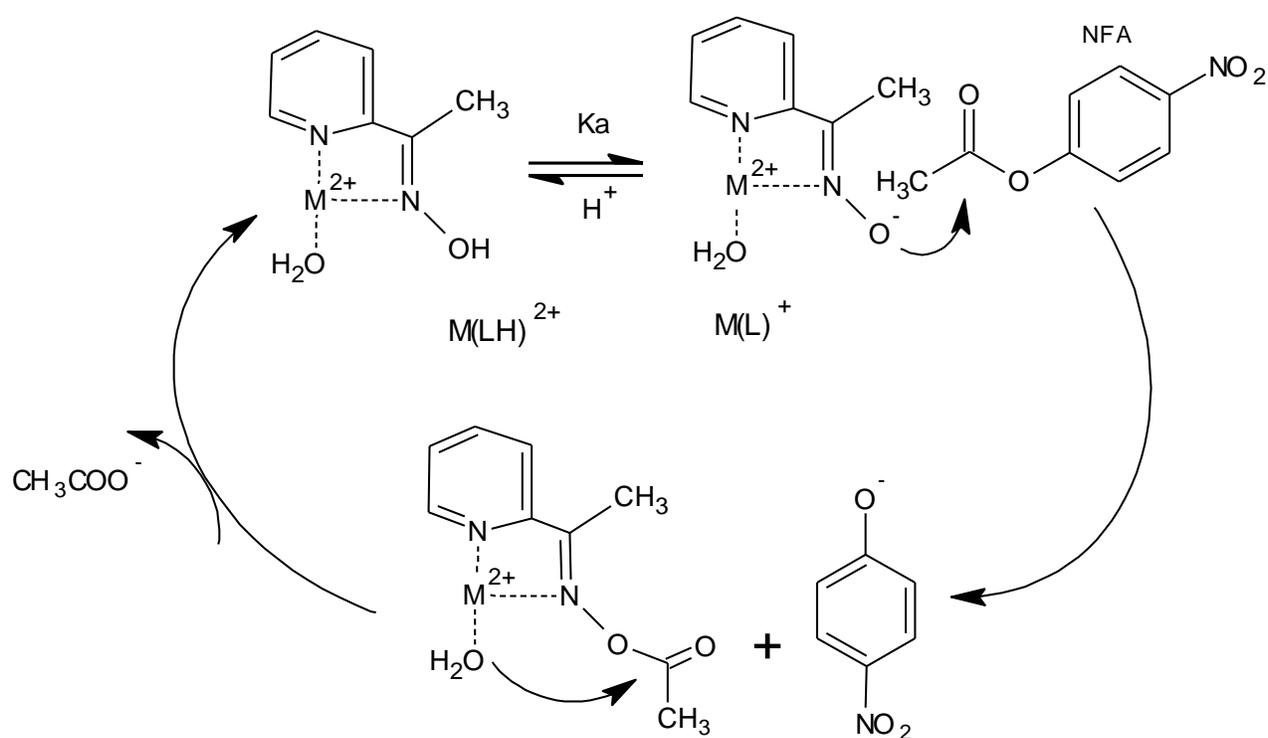


Figura 3.7 Esquema del mecanismo de la esterólisis del NFA con complejos metálicos de la 2-acetilpiridínoxima en donde $M(LH)^{2+}$ es el complejo protonado y $M(L)^+$ es el complejo desprotonado.

Tabla 3.2 Logaritmo de las constantes de acidez (pK_a) y constantes de segundo orden para la esterólisis de NFA (k_{ox} y k_{ML}) y los complejos de Zn(II) con 2-piridínaldoxima y 2-acetilpiridínaldoxima [Breslow 1965, Suh 1984]

 2-acetilpiridínaldoxima	 2-piridínaldoxima
$pK_{a\ LH} = 10.8$	$pK_{a\ LH} = 10.04$
$pK_{a\ ZnLH} = 7.0$	$pK_{a\ ZnLH} = 6.5$
$K_{Zn(LH)}^{2+} = 420\ M^{-1}$	$K_{Zn(LH)}^{2+} = 150\ M^{-1}$
$k_{ML} = 400\ M^{-1}s^{-1}$	$k_{ML} = 10\ M^{-1}s^{-1}$
	$k_{ox} = 77.2\ M^{-1}s^{-1}$

Otro aspecto importante es la diferencia en reactividad de los complejos de las aldoximas y de las cetoximas. Por ejemplo, comparando los complejos con Zn(II) de la 2-acetilpiridínaldoxima y la 2-piridínaldoxima [Suh 1984] observamos la constante de estabilidad es mayor para la cetoxima que para la aldoxima (420 vs. $150\ M^{-1}$) sin que esto refleje grandes cambios en el pK_a del complejo (7.0 vs. 6.5), pero sí en la constante de rapidez de la esterólisis (400 vs. $10\ M^{-1}s^{-1}$). De estos resultados es claro, primero, que los complejos con la cetoxima son más estables que con la aldoxima, segundo, que esta diferencia en reactividad no puede atribuirse a una diferencia en el valor de pK_a de los complejos, y tercero, que 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 es evidente que en el caso de la aldoxima la reactividad del complejo de Zn(II) es casi 8 veces menor que la del anión oximato.

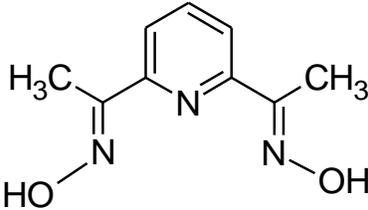
Un aspecto más, es el efecto sobre el pK_a en función de la naturaleza del catión metálico. Los estudios reportados muestran que si las ariloximas, piridínaldoximas

y piridínacetoximas se acidifican demasiado por coordinación, por ejemplo con Fe(II) [Breslow 1965], Cu(II) [Breslow 1965, Suh 1981, 1982, 1984 y 1992], Cu(II), Ni(II), Zn(II) [Mancin 2000] pierden su alta reactividad. En principio, esto puede explicarse en las coordenadas de Brønsted: el pK_a de la oxima coordinada ya no está en la parte de nivelación, sino en la porción lineal donde la reactividad es directamente proporcional a su basicidad. Como estos cationes están en la frontera entre los cationes duros y los cationes blandos en términos de Pearson [Pearson 1997], podría pensarse que los cationes relativamente blandos darán mejores efectos catalíticos.

Un avance que se dio dentro de nuestro grupo de trabajo, en el tema de reactividad de oximas coordinadas, fueron los estudios que se hicieron de la reactividad de los complejos de la dioxima derivada de la 2,6-diacetilpiridina (H_2dapd) con metales divalentes (Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb) [Yatsimirsky 1998]. Entre las características importantes de este ligante es que, al ser tridentado, los complejos que forma son bastante estables, previniendo la precipitación de hidróxidos metálicos y la reactividad observada para los complejos de Zn(II), Pb(II), Mn(II) y Cd(II) es muy buena (ver Tabla 3.3) y además, presenta una similitud en los complejos donde la cuarta posición está ocupada por una molécula de disolvente o contraion, y por lo tanto reproduce una característica observada en muchas metaloenzimas de Zn(II) [Vallee 1993]. Sin embargo estos complejos tienen algunas limitaciones: son poco solubles en agua, tienden a formar especies diméricas inactivas (lo cual limita el intervalo de concentración en el que pueden ser estudiados) y además tienen dos grupos oximato en su estructura, por lo que no se puede descartar del todo la participación de un segundo grupo oximato como nucleófilo en la esterólisis. Un aspecto muy importante es que para los complejos de Pb(II), Mn(II) y Cd(II) la reactividad del complejo es notablemente mayor que la del anión oximato, por lo que la coordinación del par electrónico del

átomo en posición α no disminuye la reactividad del nucleófilo como se observó en el caso de la 2-piridinaldoxima y su complejo de Zn(II).

Tabla 3.3 Logaritmo de las constantes de acidez (pK_a) y constantes de segundo orden para la esterólisis del NFA (k_{ox} y k_{ML}) [Yatsimirsky 1998].

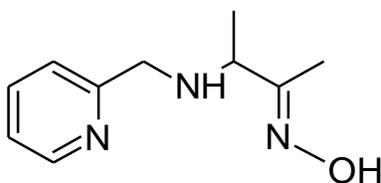


H ₂ dapd	
$pK_{a\ LH} = 11.3$	$k_{ox} = 130\ M^{-1}\ s^{-1}$
$pK_{a\ ZnLH} = 6.0$	$k_{ZnL} = 53.5\ M^{-1}\ s^{-1}$
$pK_{a\ PbLH} = 6.4$	$k_{PbL} = 207\ M^{-1}\ s^{-1}$
$pK_{a\ MnLH} = 7.0$	$k_{MnL} = 283\ M^{-1}\ s^{-1}$
$pK_{a\ CdLH} = 7.1$	$k_{CdL} = 518\ M^{-1}\ s^{-1}$

Recientemente se ha publicado por parte de nuestro grupo de trabajo una reactividad sobresaliente de los complejos de Zn(II) y Cd(II) con la oxima HOxAPy (Tabla 3.4) que, aunque no es estrictamente aromática, la reactividad intrínseca de estos complejos sobrepasa por 2 órdenes de magnitud la del anión oximato frente a NFA y son los complejos más activos reportados hasta la fecha [Gómez-Tagle 2013]. De hecho, la reactividad de estos complejos metálicos con HOxAPy tiene valores de la misma magnitud que algunas enzimas naturales frente al mismo sustrato tales como α -quimitripsina, la anhidrasa carbónica humana o la seroalbúmina humana, por lo tanto verdaderamente funciona como una "enzima artificial", además de que esta reactividad se observa en agua, a 25°C y a pH ligeramente básico. Cabe señalar que el anión de esta oxima es un α -nucleófilo, también es un ligante tridentado derivado de piridina que se coordina vía N (piridina, amina, oxima) y por su estructura es mucho más flexible lo cual le ayuda

a adaptarse a la geometría de coordinación de diferentes cationes, además es muy soluble en agua.

Tabla 3.4 Logaritmo de las constantes de acidez (pK_a) y constantes de segundo orden para la oxima HOxAPy y sus complejos de Zn(II) y Cd(II) en la esterólisis del NFA (k_{ox} y k_{ML}) [Gómez-Tagle, 2013].



HOxAPy	
$pK_{a\ LH} = 11.74$	$k_{ox} = 84\ M^{-1}s^{-1}$
$pK_{a\ ZnLH} = 8.2$	$k_{ZnL} = 8700\ M^{-1}s^{-1}$
$pK_{a\ CdLH} = 9.4$	$k_{CdL} = 10900\ M^{-1}s^{-1}$

4. Justificación

Con base en los estudios anteriores, en este trabajo se propuso sintetizar un ligante derivado de la H₂dapd que fuera tetradentado con átomos donadores de N y que tuviera un solo grupo oxima en su estructura, con la finalidad de lograr complejos oximato (con los cationes metálicos ya probados) con igual o mayor reactividad en la esterólisis del NFA, pero cuya reactividad pueda adjudicarse a la contribución de un solo grupo oximato. También se espera que, al ser tetradentado, la probabilidad de que se formen especies diméricas de sus complejos metálicos sea muy baja y se puedan hacer estudios cinéticos y de equilibrio de sus especies en disolución en un intervalo de concentraciones más amplio. Además se propuso que este ligante tuviera un grupo funcional polar para tratar de mejorar la solubilidad de su precursor. El ligante propuesto **Hdapam**, involucra la O-sustitución en uno de los grupos oxima de la H₂dapd con 2-bromoacetamida. En la Figura 4.1 se presenta Hdapam y el modo de coordinación propuesta que se espera para la Hdapam.

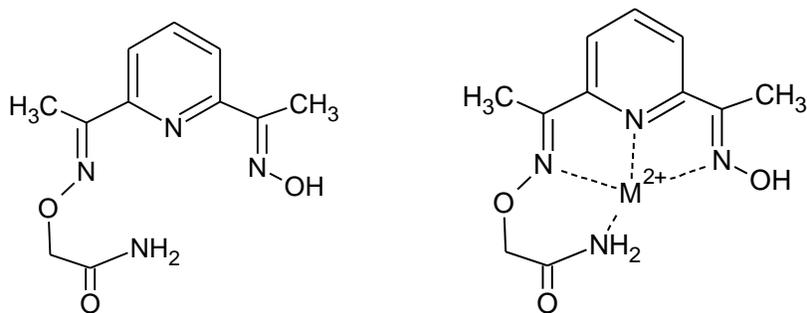


Figura 4.1 Hdapam y un modo de coordinación propuesto con metales divalentes (M²⁺)

Por otro lado, también resulta de nuestro interés generar el ligante disustituido (Figura 4.2) ya que se debería formar complejos similares a los que forme Hdapam por ser un ligante pentadentado, pero no debería observarse la reactividad nucleofílica del grupo oximato. En este caso, la única reactividad nucleofílica que podía esperarse sería por la desprotonación de una molécula de agua de coordinación que complete la esfera de coordinación del catión metálico,

pero generalmente las constantes de segundo orden hacia NFA son muy pequeñas comparadas con las de los aniones oximato. Por ejemplo, se ha observado que para diversos complejos de Zn(II) estas constantes son del orden de $1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Yatsimirsky 2005].

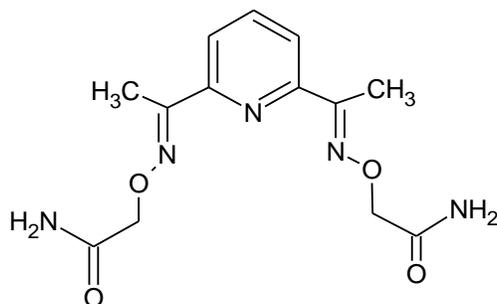


Figura 4.2 Producto esperado para la doble sustitución de la H₂dapd con 2-bromoacetamida (Dapydam).

Finalmente, debido a que, en la síntesis de Hdapam se busca la mono-O-sustitución en uno de los grupos oximato y la molécula es simétrica, se buscarán las condiciones de reacción en las que se pueda obtener mayoritariamente el producto de interés.

5. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue sintetizar un nuevo ligante tetradentado, con átomos donadores de nitrógeno, que tuviera la funcionalidad piridín oximato y que permitiera la formación de complejos estables con diversos cationes metálicos para estudiar la reactividad esterolítica tanto del ligante como de sus complejos y asignar esta reactividad esterolítica a las especies presentes en disolución. Con este estudio se pretende principalmente contribuir en la comprensión del efecto α , además de aportar nuevos ligantes, Hdapam y Dapydam, los cuales al ser polidentados, pueden ser de interés en química de coordinación.

Objetivos particulares

1. Sintetizar, aislar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas los nuevos ligantes Hdapam y Dapydam.
2. Estudiar la reactividad esterolítica del ligante Hdapam en función de la concentración del ligante y del pH para determinar la constante de oximinólisis hacia el sustrato NFA.
3. Estudiar la reactividad esterolítica del ligante Hdapam en presencia de varios cationes metálicos divalentes para los cuales se han observado efectos catalíticos con otras oximas (Mn(II), Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II) y Cd(II)) variando tanto la concentración del catión metálico como el pH y seleccionar los de mayor reactividad.
4. Para los iones metálicos que presenten mayor reactividad en presencia de la Hdapam en la esterólisis del NFA, determinar las constantes de formación de sus complejos con el ligante así como los valores de pK_a de estos complejos mediante titulaciones potenciométricas, espectrofotométricas y por RMN ^1H .
5. Con las constantes de formación de los complejos y los valores de pK_a determinados hacer la especiación del anión oximato libre y de sus complejos.
6. Usando la distribución de las especies, analizar la reactividad observada en función de las especies presentes en disolución para 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.

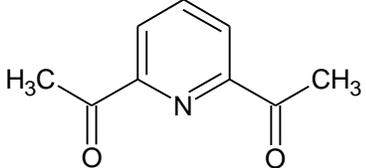
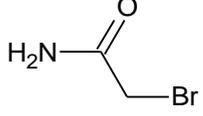
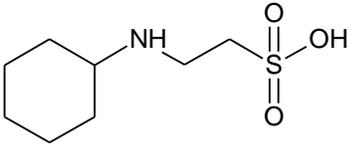
7. Comparar la reactividad nucleofílica del ligante libre y de las especies que forme con los diferentes cationes metálicos.

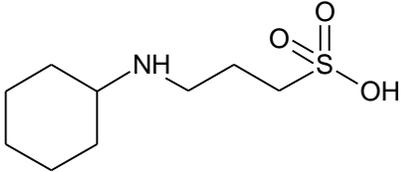
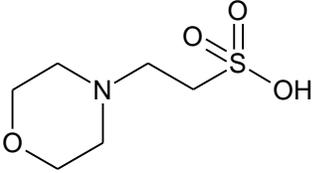
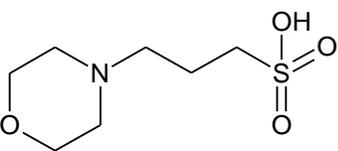
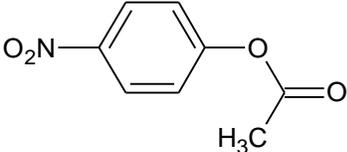
6. Material y Métodos

6.1 Reactivos

Para todas las disoluciones se utilizó agua desionizada con resistividad de 18 ± 0.1 M Ω ·cm destilada con el equipo *Nanopure Barnstead*. A continuación se presentan en la Tabla 6.1 los reactivos usados en el desarrollo del de síntesis de complejación anexando algunos datos característicos relevantes.

Tabla 6.1 Estructuras y características principales de los reactivos utilizados.

Estructura	Nombre y características.
	<p>2,6-diacetilpiridina Aldrich ($\geq 99.9\%$) Masa molar 163.17 g/mol</p>
<p>NH₂OH</p>	<p>Hidroxilamina Aldrich ($\geq 98\%$) Masa molar 33.02 g/mol</p>
	<p>2-bromacetamida Aldrich (98%) Masa molar 137.96 g/mol</p>
	<p>Ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfónico, CHES 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</p>

	<p>Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico, CAPS Sigma (>98%) Masa molar = 221.32 g/mol $pK_a = 10.40$ en medio acuoso a 25°C CAPS Intervalo de pH: 9.7 a 11.1</p>
	<p>Ácido 2-(N-morfolino)-1-etanosulfónico, MES Sigma (>99.5%) Masa molar = 195.2 g/mol $pK_a = 6.1$ en medio acuoso a 25°C Intervalo de pH: 5.15 a 7.06</p>
	<p>Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico, MOPS 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</p>
	<p><i>p</i>-Nitrofenil acetato (NFA) Fluka ($\geq 99.0\%$) Masa molar = 181.14 g/mol</p>
<p>$Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$</p>	<p>Perclorato de cadmio(II) hexahidratado Alfa Aesa ($\geq 97.0\%$) Masa molar = 311.31 g/mol</p>
<p>$Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$</p>	<p>Perclorato de zinc(II) hexahidratado Alfa Aesar ($\geq 97.0\%$) Masa molar = 372.38 g/mol</p>
<p>$Mn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$</p>	<p>Perclorato de manganeso(II) hexahidratado Alfa Aesar ($\geq 97.0\%$) Masa molar = 419.11 g/mol</p>
<p>$Ni(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$</p>	<p>Perclorato de níquel(II) hexahidratado Alfa Aesar ($\geq 97.0\%$) Masa molar = 365.69 g/mol</p>
<p>$Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$</p>	<p>Perclorato de cobre(II) hexahidratado Alfa Aesar ($\geq 97.0\%$) Masa molar = 241.60 g/mol</p>
<p>$Co(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$</p>	<p>Perclorato de cobalto(II) hexahidratado Alfa Aesar ($\geq 97.0\%$) Masa molar = 365.93g/mol</p>
<p>$NH_2OH \cdot HCl$</p>	<p>Clorhidrato de hidroxilamina Aldrich ($\geq 99\%$) Masa molar 69.50 g/mol</p>

continua Tabla 6.1

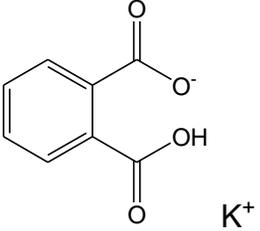
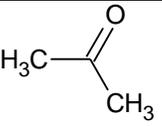
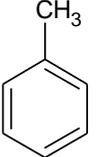
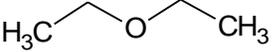
NaOH	Hidróxido de Sodio MEYER ($\geq 98\%$) Masa molar 39.99 g/mol
HCl	Ácido Clorhídrico J. T. BAKER (36.5-38%) Masa molar 36.46 g/mol
	Biftalato de Potasio Aldrich ($\geq 99\%$) Masa molar 224.22 g/mol
SiO ₂	Silica gel para columna MERK (0.2-0.5 mm)

Tabla 6.2 Estructuras y características principales de los disolventes utilizados.

Estructura	Nombre y características.
	Acetona J. T. BAKER (99%) Masa molar: 58.07 g/mol
CH ₃ OH	Metanol J. T. BAKER (99%) Masa molar: 32.04 g/mol
CH ₃ CN	Acetonitrilo J. T. BAKER (99%) Masa molar: 41.05 g/mol
CHCl ₃	Cloroformo J. T. BAKER (99%) Masa molar: 119,38
	Tetrahidrofurano J. T. BAKER (99%) Masa molar: 72.11 g/mol
	Tolueno J. T. BAKER (99%) Masa molar: 92.14 g/mol
	Eter Etílico J. T. BAKER (99%) Masa molar 74.12 g/mol

6.2. Equipo

Para adiciones volumétricas se utilizaron micropipetas *Eppendorf Research* de diferentes volúmenes según se requería. El pH se midió utilizando un electrodo de vidrio *Orion 8103BN* con un potenciómetro *Orion* modelo 710A con una precisión de ± 0.005 unidades de pH, en una celda termostataada, con agitación y flujo de N_2 constante. Para la calibración del potenciómetro se usó amortiguadores estándar de referencia de pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión de ± 0.01 a $25^\circ C$).

Para los estudios espectrofotométricos de UV-vis se utilizó un equipo *Hewlett Packard 8453* (ventana espectral de 190-1100 nm, resolución de 1 nm, precisión de longitud de onda $< 1 \pm 0.5$), transportador multicelda con temperatura regulada con un recirculador marca *Fischer Scientifics Isotemp 1016S* ($\pm 0.1^\circ C$), y se utilizaron celdas de cuarzo con una longitud de paso de 1 cm y un volumen de 3 mL.

Los espectros de 1H -RMN, ^{13}C -RMN, IR, y rayos X se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas se realizaron tanto en la USAI, Facultad de Química, como en el Instituto de Química de la UNAM.

6.3. Programas

El análisis de los datos, gráficas y ajustes (regresión lineal y no lineal mediante el método de mínimos cuadrados), se hicieron en el programa *OriginPro 8.5.0*. El ajuste de los datos para obtener las constantes de formación a partir de titulaciones espectrofotométricas y potenciométricas también se hizo utilizando el programa *Hyperquad 2003* versión 3.1.48. Para la especiación química se utilizó el programa gratuito *HySS 2009*. La visualización y análisis de los espectros de resonancia se hizo con el programa *MestReNova 2009*.

6.4 Condiciones generales de trabajo

Disoluciones

Se prepararon disoluciones estándar del ligante Hdapam 10-100 mM en metanol y de los percloratos de los diferentes cationes metálicos 100 mM en agua desionizada. Las disoluciones de los cationes metálicos se estandarizaron mediante titulaciones complejométricas con EDTA y se corroboraron las concentraciones mediante su análisis por absorción atómica.

Las disoluciones stock del sustrato NFA (10 mM y 2 mM) se hicieron en acetonitrilo. El sustrato se adicionó en volúmenes pequeños justo antes de iniciar la monitorización de las reacciones, de forma que la cantidad de acetonitrilo en la disolución fuera pequeña y constante (2% del volumen de la celda de reacción).

Al hacer las titulaciones potenciométricas fue necesario trabajar en una mezcla de 20% metanol/agua, debido a que se requieren mayores concentraciones del ligante que en los experimentos de cinética y éste es poco soluble en agua. En las titulaciones espectrofotométricas se trabajó en una mezcla 10% v/v de metanol en agua al igual que en todos los estudios cinéticos.

pH

Para los estudios fue necesario trabajar con amortiguadores de tipo biológico (MES, CHES, MOPS, CAPS) para evitar la formación de especies con los cationes metálicos debido a que son muy poco coordinantes, además de que sus intervalos de pH de amortiguación eran adecuados y que no presentarán bandas de absorción en la región de 250 a 850 nm. La concentración del amortiguador fue de 100 veces mayor a la de los reactivos.

Temperatura

Los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25.0 ± 0.2 °C regulada mediante un baño recirculador con error en la temperatura de ± 0.1 °C.

6.5 Determinación de los valores de pK_a del ligante y sus complejos

Determinación del pK_w del agua en el medio de trabajo

Debido a que se requieren hacer estudios de equilibrios en disolución, es necesario conocer con el pK_w del agua en el medio a emplear. Por esta razón se hicieron titulaciones potenciométricas por triplicado de HCl con NaOH estandarizados (típicamente 10 mM de HCl con NaOH 0.2 M), en disoluciones que contenían 10% y 20% de metanol y NaCl 100 mM, a 25°C y burbujeando nitrógeno en la disolución durante toda la titulación. A partir de los datos de volumen y pH de la titulación y mediante un ajuste no lineal a la Ecuación 3 [Johannsson 1978], se determinaron como parámetros el logaritmo del producto iónico del agua, pK_w , y el factor de corrección para el electrodo, f , que depende del coeficiente de actividad y del potencial de unión líquida. Esto nos permite además trabajar en términos de la $[H^+]$ lo cual resulta más conveniente para el balance de masas.

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH - pK_w)} - f 10^{-pH})}{C_B + f 10^{-pH} - 10^{(pH - pK_w)}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para calcular el pH corregido se resta el logaritmo de los factores de corrección obtenidos a los valores de pH medidos ($pH_{\text{corr}} = pH_{\text{medido}} - \log f$). El promedio de pK_w en la mezcla de 10% de metanol en agua a 25°C fue de 14.6 ± 0.1 , el cual es un valor muy cercano al reportado en la literatura (14.70 ± 0.02) para un medio acuoso con 10% de metanol [Fiordiponti 1974]. El factor de corrección promedio, f , fue de 0.12 unidades de pH que se restaron al valor medido de pH para que las titulaciones quedaran en términos de la concentración molar de H^+ . En la Figura

6.5.1 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas y ajustadas con la Ecuación 3.

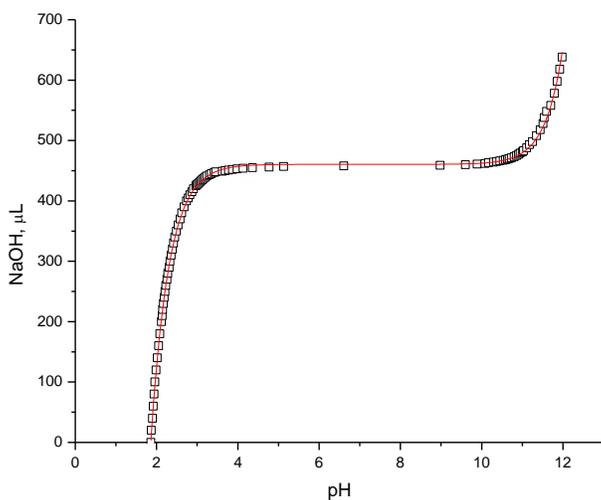


Figura 6.5.1 Gráfica del volumen de base añadida en función de pH corregido de la titulación de HCl 10 mM con una fuerza iónica 100 mM de NaCl en 10% MeOH a 25°C. La línea es el ajuste teórico realizado con la Ecuación 3.

La determinación de los valores de pK_a , del ligante Hdapam se hizo mediante titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas. Para potenciometría se hicieron disoluciones 2.5 mM de Hdapam con fuerza iónica 100 mM empleando como electrolito soporte NaCl y se titularon con NaOH estandarizada 1.0 M. En el caso de las titulaciones espectrofotométricas se usaron concentraciones de Hdapam entre 0.01-0.1 mM y se titularon con NaOH 100-500 mM. En el caso de las titulaciones espectrofotométricas se registraron, después de cada adición de NaOH, tanto el valor de pH de la disolución y como el espectro UV-Vis.

Las constantes de equilibrio se obtuvieron haciendo primero un análisis de los datos en *Origin*, y posteriormente ajustando los datos de pH vs. volumen del titulante, los datos de absorbancia vs. volumen de titulante, en el programa *Hyperquad*.

Para determinar los valores de pK_a de los complejos de Cd(II) y Zn(II) con Hdapam, es necesario titular una mezcla equimolar. Se puede monitorizarse mediante espectrofotometría, registrando el espectro de UV-vis a cada valor de pH o bien mediante potenciometría, registrando el valor de pH a cada adición de NaOH.

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

Las constantes de formación de los complejos se determinaron mediante espectrofotometría UV-vis y potenciometría. Las titulaciones espectrofotométricas se hicieron midiendo la absorbancia de una disolución del ligante y titulando con una disolución stock del metal; las curvas de la absorbancia en función de la concentración del metal añadido se ajustaron satisfactoriamente a un modelo 1:1 metal-ligante (ver Apéndice). Las titulaciones potenciométricas del ligante con los cationes metálicos, se hicieron con mezclas equimolares de metal-ligante a una concentración 2.5mM y se titularon con pequeños volúmenes de NaOH 1.0 M hasta observar precipitación.

También se determinan las constantes de formación de los complejos del ligante con Zn(II) y Cd(II) (estos cationes son paramagnéticos), mediante resonancia magnética de protón, en donde se registró el cambio en el desplazamiento químico para varias señales en función de la contracción de metal añadida; los datos se ajustaron razonablemente bien a un modelo 1:1 metal-ligante.

6.7. Estudios Cinéticos

Primero fue necesario calcular la constante de hidrólisis alcalina, k_{OH} , en 10 y 20% de MeOH ya que se realizaron mediciones cinéticas en esos medios. Aunque para 10% de metanol se obtuvo una k_{OH} muy cercana a la reportada en la literatura para un medio totalmente acuoso (k_{OH} 14.7 $M^{-1}s^{-1}$, Fiordiponti 1974), en las determinaciones realizadas en 20% de MeOH se obtuvo un valor mayor (k_{OH} 24.7 $M^{-1}s^{-1}$). Dado que la mayor parte de los datos cinéticos se obtuvieron en un medio

con 10% de MeOH, el hecho de que este valor fuera un poco mayor que el esperado no afecta las conclusiones que del estudio se derivan.

Los estudios cinéticos se realizaron utilizando disoluciones stock 10-100 mM, del ligante y de los cationes metálicos, para el sustrato NFA en acetonitrilo disoluciones stock 2-10 mM. A partir de estas disoluciones se preparan directamente en las celdas de reacción mezclando los volúmenes apropiados para obtener la concentración deseada de cada reactivo en las celdas de cuarzo. Las celdas se mantuvieron termostatadas a 25°C con un recirculador. Los estudios para del ligante en ausencia de cationes se realizaron en un intervalo de pH de 9.5 a 11.5. En el caso del estudio con cationes metálicos se realizaron en un intervalo de pH de 6.5 a 9.5.

Se siguió el progreso de la reacción de esterólisis del NFA mediante la formación de su anión, *p*-nitrofenolato (NF⁻) que es de color amarillo, tiene un coeficiente de absorptividad molar grande (del orden de 18000 M⁻¹cm⁻¹) y presenta un máximo de absorción a 400 nm. Al romperse el éster se forma el *p*-nitrofenol (NFH) que tiene un pK_a reportado de 7.2 en agua, y que dependiendo del pH de la reacción, puede existir predominantemente como su forma protonada e incolora o como su forma desprotonada de color amarillo. Por lo tanto, para poder cuantificar la cantidad de producto obtenida a las condiciones de reacción se determinó el pK_a del NFH y su coeficiente de absorptividad molar a 400 nm en un medio con 10% de metanol a 25°C. En la figura 6.7.1 se muestran espectros de NFH 0.05 mM en función del pH entre 2 y 12. En la figura 6.7.2 se muestra la curva de absorbancia a 400 nm en función del pH de donde se calculó el valor de pK_a del NPH 7.18±0.01 utilizando la Ecuación 4, en donde A_∞ es la absorbancia al infinito, A₀ es la absorbancia al tiempo inicial y x es el pH. El valor del pK_a se obtiene como parámetro de ajuste.

$$Abs = \frac{A_{L^-} + A_0 * 10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{Ecuación 4}$$

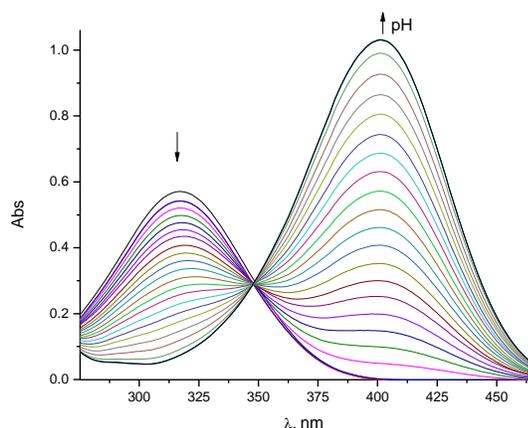


Figura 6.7.1 Espectros UV-vis de *p*-nitrofenol 0.05 mM al variar el pH entre 2 y 12, con adiciones de NaOH 560 mM. El pH se amortiguó con MOPS 10 mM, 25°C.

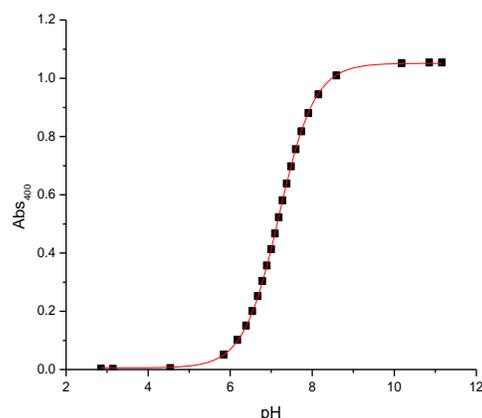


Figura 6.7.2 Determinación del pK_a de *p*-nitrofenol a 400 nm. La línea continúa muestra el ajuste de los datos a la ecuación 4. pK_a 7.18 ± 0.01 .

La curva de la Figura 6.7.2 se modificó (graficando el coeficiente de absortividad molar, ϵ , en función del pH) para tener los coeficientes de absortividad molar a cada valor de pH al que se trabajó. Con los coeficientes de absortividad molar del producto, NF^- , podemos verificar la extensión de la reacción y obtener valores de absorbancia esperados para una hidrólisis completa (calculando o verificando las absorbancias esperadas a cada pH para una concentración dada de sustrato. Adicionalmente, a algunos valores de pH fijo, se hicieron curvas de calibración de la absorbancia en función de la concentración de *p*-nitrofenol.

El estudio de la esterólisis del NFA con la Hdapam se llevó a cabo a concentraciones 0.04 mM del sustrato y concentraciones entre 0.01 y 0.1 mM de la oxima, a diferentes valores de pH. Para las reacciones en presencia de los cationes metálicos se usaron concentraciones del catión metálico y del ligante equimolares entre 0.01 y 0.1 mM. Antes de iniciar cada reacción, se uso como blanco de la disolución una mezcla de 10% MeOH/ agua, con su respectivo buffer para cada valor de pH, para eliminar la contribución del medio a la absorbancia de

la disolución. Sin embargo, existen fluctuaciones de la absorbancia en función del tiempo que son relevantes cuando se miden valores pequeños de absorbancia (a valores de pH cercanos a 7.0 para NFH); esto se corrigió restando en la curva cinética los valores de absorbancia a 550 nm, Abs^{550} a los valores de absorbancia a 400 nm, Abs^{400} ya que longitudes de onda iguales o mayores a 550 nm no absorbe ninguna especie.

Las reacciones rápidas (2 horas o menos) se monitorizaron hasta la conversión completa del sustrato buscando tener como mínimo 50 puntos de absorbancia en función del tiempo. Para las reacciones lentas (10% de conversión en 2 horas), se obtuvieron curvas cinéticas hasta un 10-15% de conversión del sustrato, seleccionando intervalos de tiempo que permitieran tener como mínimo 100 puntos de absorbancia a 400 nm.

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: el método integral o el método de velocidades iniciales. Los datos para reacciones rápidas monitoreadas hasta la hidrólisis completa del sustrato se analizaron ajustándolos mediante la Ecuación 5 para obtener k_{obs} , la cual corresponde a una ecuación integral de primer orden, en donde A^{400} es la absorbancia corregida a 400 nm, ΔA_{∞}^{400} , es la diferencia entre absorbancia inicial y la infinita ($A_0 - A_{\infty}^{400}$), A_0 es la absorbancia al inicio, k_{obs} es la constante de rapidez observada y t es el tiempo (Apendice (B)). Se muestra un ejemplo del ajuste en la Figura 6.7.3

$$A^{400} = A_0 + \Delta A_{\infty}^{400}(1 - \exp(-k_{obs}t)) \quad \text{Ecuación 5}$$

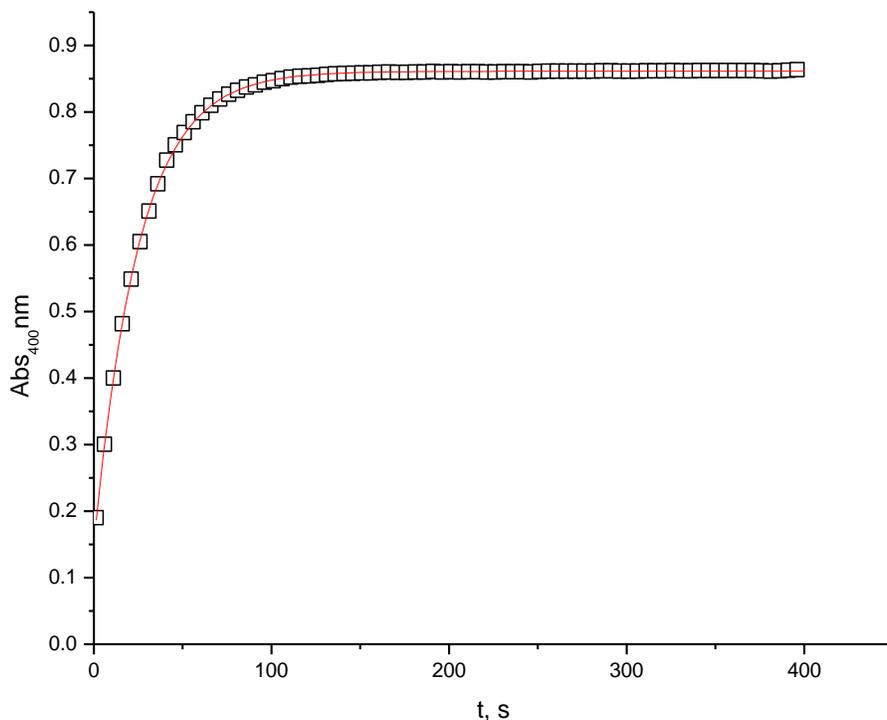


Figura 6.7.3 Ejemplo del ajuste integral para una curva cinética. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.

Es importante resaltar que estas curvas cinéticas se ajustaron satisfactoriamente a una ecuación de primer orden a pesar de que no se trabajó a condiciones de pseudo-primer orden lo cual sólo puede suceder si la etapa de desacilación del nucleófilo es rápida. Para el ligante sólo, como se trabajó a valores de pH básicos, esta etapa es rápida. En el caso de los complejos metal-ligante se trabajó a menores valores de pH y de todas formas las curvas cinéticas se ajustaron a ecuaciones de primer orden, lo cual es indicativo de que la hidrólisis de NFA es un proceso catalítico (ver Figura 3.7).

Para las reacciones lentas fue necesario analizar los datos por el método de la rapidez inicial para calcular los valores de k_{obs} . De los datos de absorbancia en función del tiempo se obtiene la pendiente, la cual corresponde a la velocidad inicial, v_0 (ver Apéndice (C)) y conociendo el coeficiente de absorción del

producto (NF^-) y la concentración inicial de sustrato (NFA) se puede usar la Ecuación 6 para determinar k_{obs} . Aquí es evidente la necesidad de conocer el coeficiente de absorción molar del NF^- , a las condiciones en las que se realiza la cinética para los diferentes valores de pH.

$$k_{\text{obs}} = \frac{v_0^{\text{exp}}}{\epsilon_{\text{NF}^-} [\text{NFA}]_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

En presencia de cationes metálicos, se observó que la esterólisis del NFA en medios muy básicos era muy rápida para ser monitorizada por espectrofotometría por lo que sólo se pudo trabajar a ciertos valores de pH (menores a 11). En la Figura 6.7.4 se muestran curvas cinéticas en presencia y ausencia de Cd (II). Como puede observarse, los datos en presencia del catión metálico se ajustan bien a una cinética de primer orden aunque las condiciones no son de pseudo-primer orden y el efecto de aceleración por la presencia del catión metálico es notable.

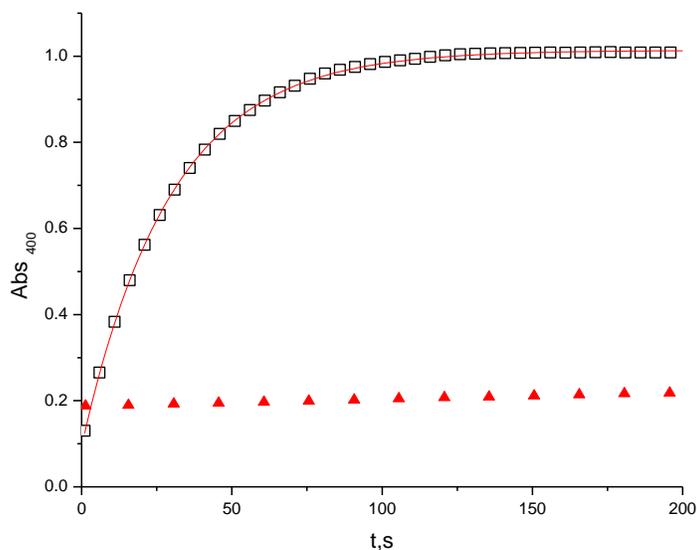


Figura 6.7.4 Curvas cinética de hidrólisis de NFA 0.04 mM en presencia de Hdapam 0.01 mM, pH 8.97, CHES 100 mM a 25°C. Los cuadros corresponden a los datos cinéticos en presencia de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 0.05 mM y los triángulos a los datos en ausencia del catión metálico. La línea continua muestra el ajuste a una ecuación cinética de primer orden.

7. Síntesis y caracterización.

El ligante precursor se prepara mediante una condensación entre la diacetilpiridina e hidroxilamina [Yatsimirsky 1998]. A 2.058 g (12.4 mmol) de 2,6-diacetilpiridina se añaden lentamente a 20 mL de una disolución con 1.11 g (28 mmol) de hidróxido de sodio y 1.92 g (28 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina en una mezcla 50% de metanol-agua. La mezcla se calienta a reflujo por dos horas y se forma un sólido blanquecino. Después del tiempo de reacción el producto se filtra y se lava con agua desionizada. En la figura 7.1 se muestra el esquema de reacción. Se toman espectros de RMN ^1H en DMSO- d_6 del producto crudo y del recrystalizado para confirmar la síntesis la dioxima H_2dapd .

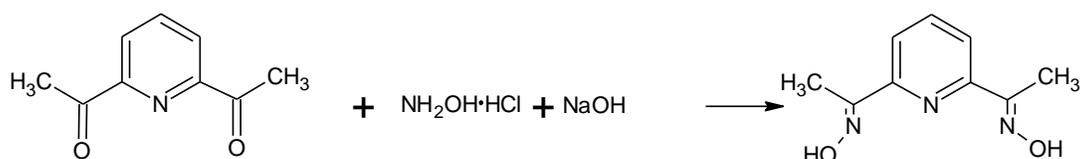


Figura 7.1 Esquema de reacción para la síntesis de H_2dapd

En la segunda condensación se toman 0.65g (2 mmol) de H_2dapd con 0.25 g (1 mmol) de $\text{Cs}_2(\text{CO}_3)_3$ en 20 mL de acetona bajo agitación en un matraz de bola. Después se adicionan lentamente 0.138 g (1 mmol) de 2-bromacetamida y se ponen a reflujo por 2 horas con agitación. El esquema general de reacción se presenta en la Figura 7.2.

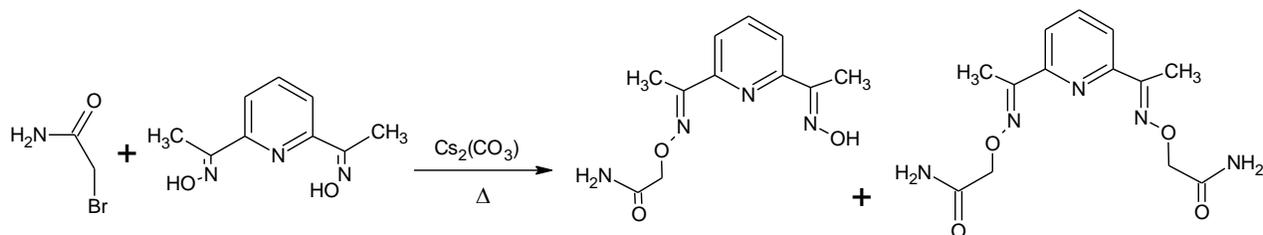


Figura 7.2 Esquema general de reacción para la síntesis de Hdapam y Dapydam

El transcurso de la reacción se puede monitorar en placas de cromatografía de capa fina de sílica o cromatoplasas (TLC) en donde se observa, como se esperaba, la formación de los productos correspondientes a la O-monosustitución y la di-O-

sustitución. Con el propósito de favorecer la formación del producto monosustituido, se probaron varias condiciones de reacción, y se obtuvieron mejores resultados empleando una relación de 1:2 equivalentes de 2-bromacetamida- H_2dapd , logrando obtener un 60% del ligante monosustituido, un 5% de ligante disustituido y un 35% del precursor sin reaccionar. Cuando se utiliza un exceso de 2-bromacetamida, se obtiene una conversión completa hacia el ligante disustituido.

La separación de la mezcla de ambos productos de sustitución y el ligante precursor se logró mediante cromatografía en columna, aunque se tuvieron algunas dificultades porque los grupos amina se adhieren fuertemente a la sílica gel. Después de varias pruebas la mejor separación se logró con la mezcla de eluyentes de 2:1 Tolueno/THF con 10% en volumen de hidróxido de amonio. Para separar 2 gramos de la mezcla se prepararon 700 mL de eluyente y se pesaron 28 g de sílica gel la cual se empacó en seco sobre una columna de separación de 5 cm de diámetro y 75 cm de altura. Se añadió el eluyente y se tomaron fracciones de 10 mL monitorizando la separación en cromatoplasmas. El compuesto H_2dapd es el primero en salir de la columna (en los primeros 250 mL), después a 500 mL comienza a salir el segundo compuesto, $Hdapam$, hasta 700 mL mientras que el tercer producto, $Dapydam$, es necesario sacarlo de la columna con THF puro o con metanol.

El análisis mediante RMN 1H en $DMSO-d_6$ de la mezcla de productos y cada una de las fracciones evaporadas nos permitió confirmar que el primer producto en salir de la columna es el H_2dapd , y los siguientes dos, los productos de la sustitución ($Hdapam$, $Dapydam$), lo cual resulta razonable pues el grupo amino interactúa fuertemente con la sílica gel. Se identificó el producto deseado por el protón correspondiente a la oxima en RMN 1H y se procedió a hacer la caracterización completa del mismo.

Análisis elemental

El análisis elemental del ligante Hdapam se hizo la consideración de que el compuesto cristaliza como monohidrato tal como se presenta en la Tabla 7.1 y posteriormente se comprobó la presencia de esta molécula de agua en la espectrometría de masas. El análisis elemental del ligante Dapydam se presenta en la Tabla 7.2.

Tabla 7.1 Análisis elemental con datos teóricos y experimentales de Hdapam

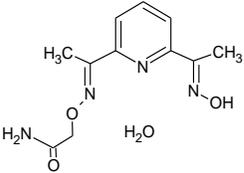
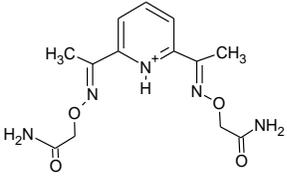
Compuesto	Formula	Masa molar	Elemento	%Teórico	%Exp	%Error
	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₄	268.26	C	49.25	49.89	1.28
			N	20.88	20.74	0.67
			H	6.01	5.75	4.52

Tabla 7.2 Análisis elemental con datos teóricos y experimentales de Dapydam

Compuesto	Formula	Masa molar	Elemento	%Teórico	%Exp	%Error
	C ₁₃ H ₁₈ N ₅ O ₄	308.30	C	50.64	50.63	0.01
			N	22.76	22.62	0.61
			H	5.88	5.37	8.67

Espectrometría de masas

Se obtuvieron los espectros de masas de Hdapam y Dapydam mediante la técnica de impacto electrónico, con detección de iones positivos. A continuación se presentan los espectros, seguidos de una tabla con su fragmentación asociada.

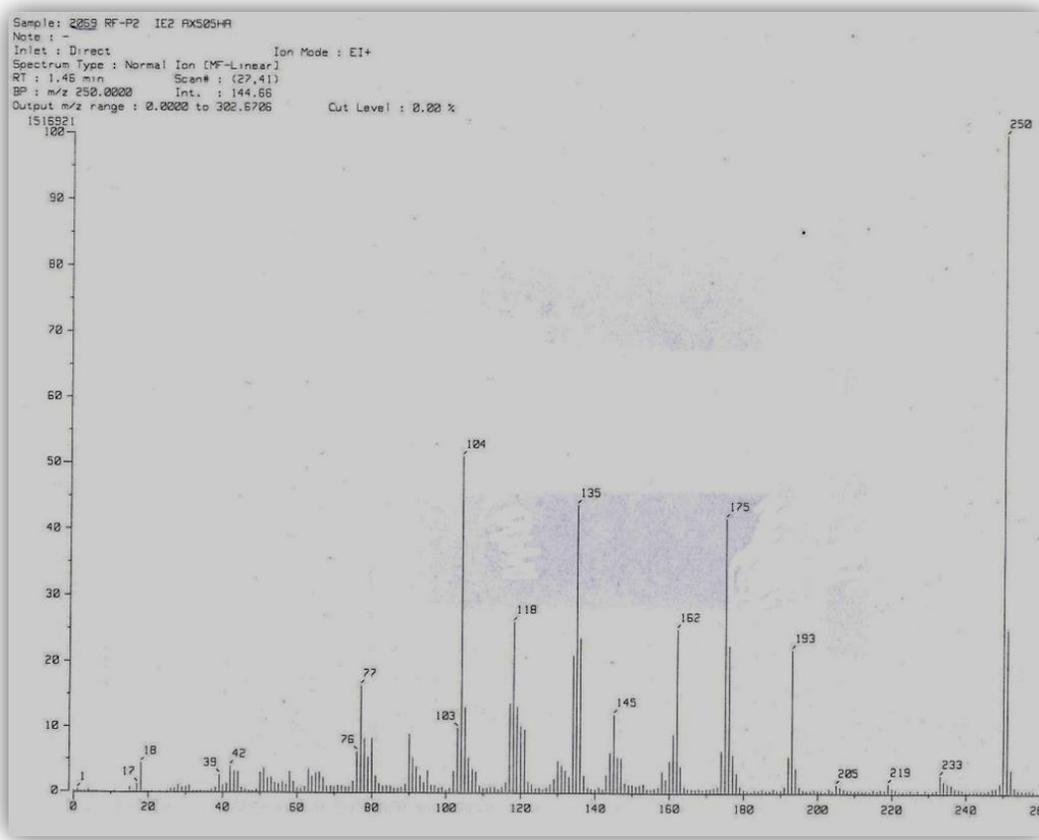


Figura 7.3 Espectro de masas por impacto electrónico, con detección de fragmentos positivos de Hdapam

Tabla 7.3 Estructuras de la posible fragmentación según su relación m/z de Hdapam

	m/z= 250	m/z=233	m/z=219	m/z=205	m/z=193
Fragmentos					
	m/z=175	m/z=162	m/z=145	m/z=135	m/z=118
	m/z=104	m/z=77	m/z=42	m/z=39	m/z=18

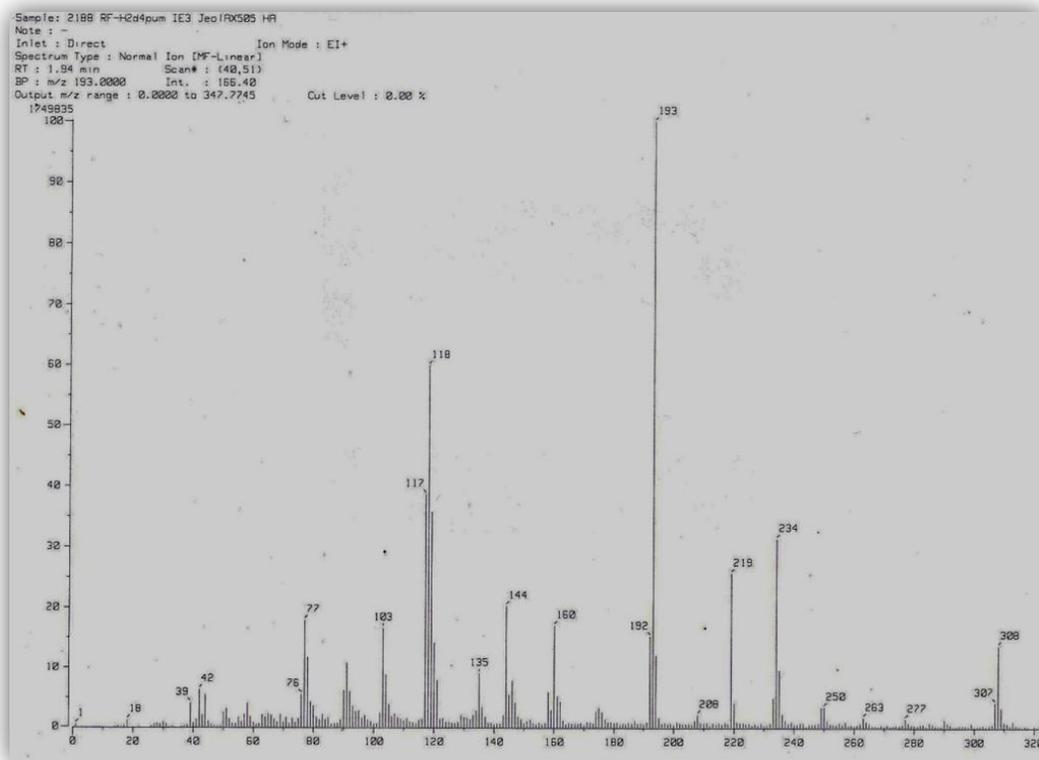


Figura 7.4 Espectro de masas por impacto electrónico, con detección de fragmentos positivos de Dapydam

Tabla 7.4 Estructuras de la posible fragmentación según su relación m/z de Dapydam

	m/z= 308	m/z=277	m/z=263	m/z=250	m/z=234
Fragmentos					
	m/z=219	m/z=193	m/z=160	m/z=144	m/z=135
	m/z=118	m/z=103	m/z=77	m/z=42	m/z=39

Se puede observar que en ambos espectros (Figura 7.3 y 7.4) podemos hallar relaciones m/z asociadas a fragmentos idénticos o similares en diferentes proporciones (m/z= 250, 219, 193, 138, 118, 77, 42). La relación m/z= 193 que corresponde a la masa molecular del precursor H₂dapd se observa en ambos espectros. Y el pico m/z= 250 que corresponde a la masa molecular de Hdapam (Figura 7.3).

En la Tabla 7.5 se muestran los picos correspondientes a los iones moleculares. La masa relativa en el caso del ligante Dapydam 307.71 con diferencia de 1 unidad con su relación m/z= 308 debida a que en el espectro la especie se encuentra protonada sobre la piridina ya que se encontraba en medio ácido (pH=2).

Tabla 7.5 Relación de la masa molar con la m/z para ambos productos.

Compuesto	Formula	Masa molar	m/z de M ⁺
Hdapam	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₂	250.25	250
Dapydam	C ₁₃ H ₁₈ N ₅ O ₄	307.31	308

RMN ¹H

Los espectros de resonancia del precursor H₂dapd y de los productos Hdapam y Dapydam se obtuvieron en DMSO-d₆ a temperatura ambiente.

H₂dapd

En el espectro de H₂dapd (Figura 7.5, Tabla 7.6) se puede observar que a campo bajo en 11.524 ppm se encuentra el protón correspondiente al grupo oxima, que integra para 2 protones. Después a campo medio, en 7.81 ppm, se observa un multiplete asociado a los 3 protones del anillo de piridina. A pesar de que la H₂dapd es una molécula muy simétrica el multiplete se debe a que el carbono unido al anillo puede tener libre giro y los protones de la oxima pueden acercarse al anillo afectando de esta forma a los protones piridínicos. Después a campo alto, en 2.247 ppm, se observa un singulete que corresponde a los 6 protones de los dos metilos.

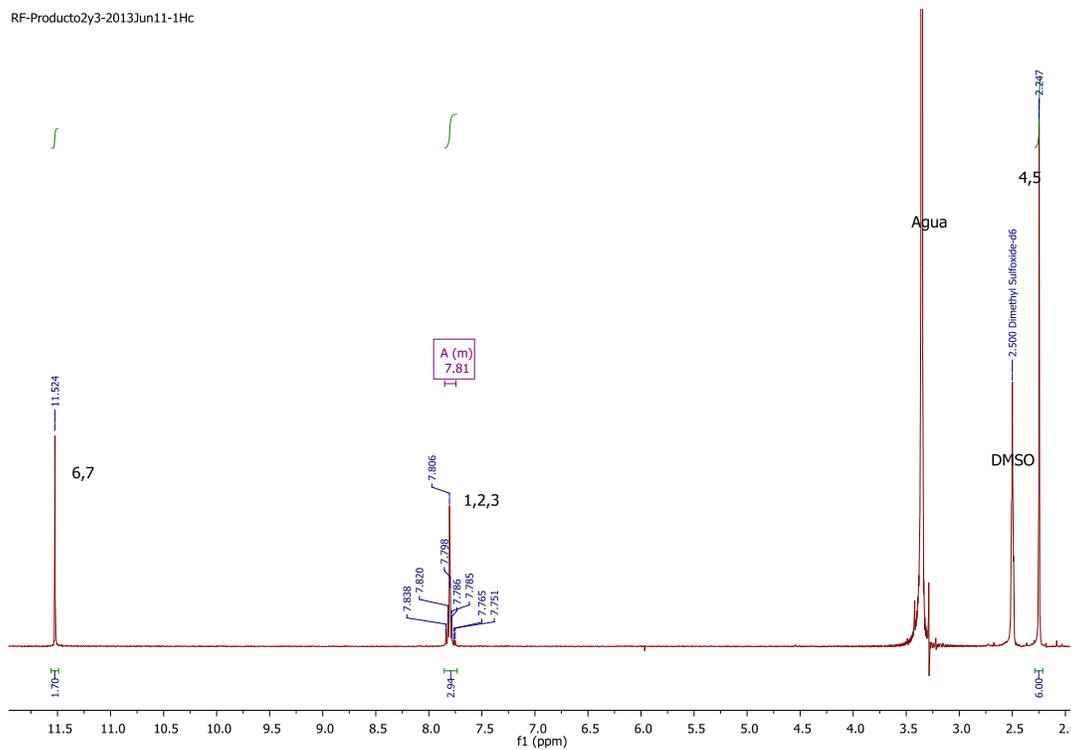


Figura 7.5 Espectro de RMN ^1H de H_2dapd con la numeración de los protones de la estructura de la Tabla 7.6

Tabla 7.6 Asignación de señales del espectro de H_2dapd para protones.

Estructura	#Átomo-H	$\delta(\text{ppm})$	Señal	Integración
	1,2,3	7.81	Multiplete	3
	6,7	11.524	Singulete	2
	4,5	2.247	singulete	6

Hdapam

En el espectro de Hdapam (Figura 7.6 y Tabla 7.7) se observa a campo bajo el protón del grupo oxima en 11.574 ppm, ligeramente desplazado respecto a H₂dapd. Luego a campo medio, 7.82 ppm, se observa un multiplete los 3 protones de la piridina y la aparición de un doblete que integra para 2 protones en 7.29 ppm corresponde a los protones unidos al nitrógeno en la amida. Posteriormente se observa un singulete en 4.543 ppm, que integra para 2 protones, que corresponde al grupo metileno. También se observan 2 señales en 2.366 y 2.249 ppm de las cuales la primera corresponde a los protones del metilo del carbono 4, que se desplaza a campo más bajo debido a la presencia del grupo amida y la segunda corresponde al metilo menos afectado por la sustitución, por ello su desplazamiento, comparado con el del precursor, es mínimo.

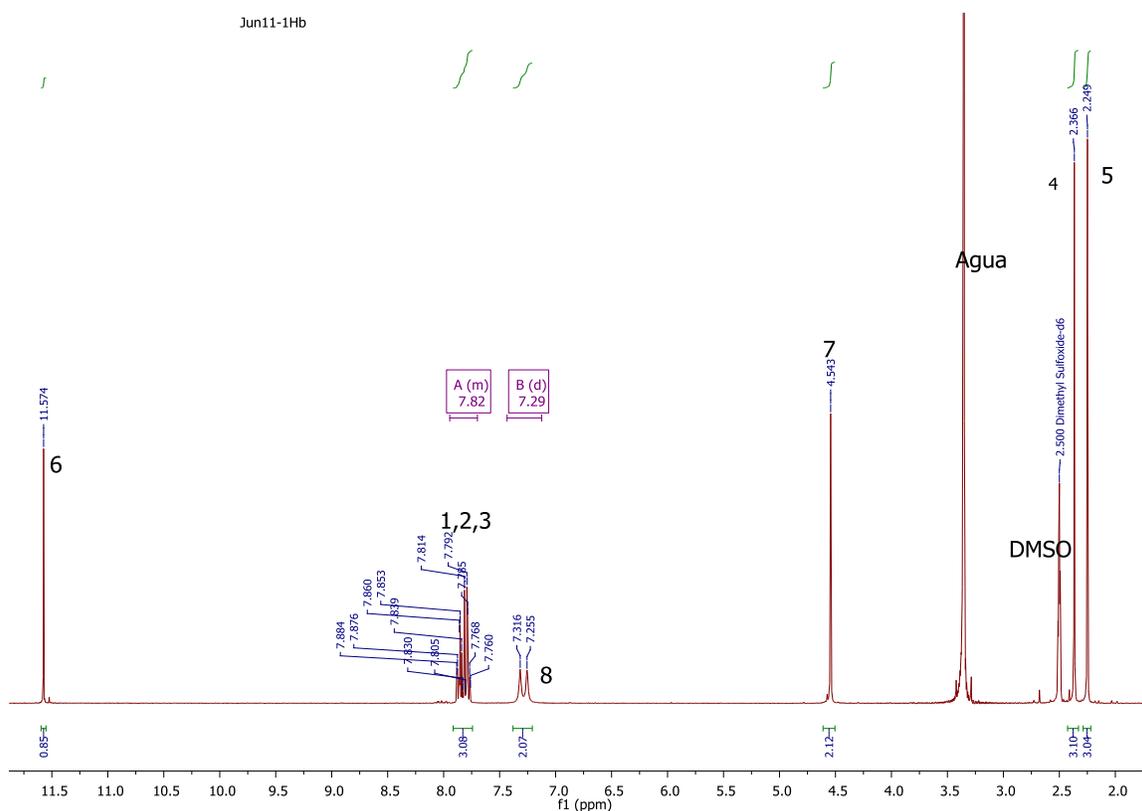
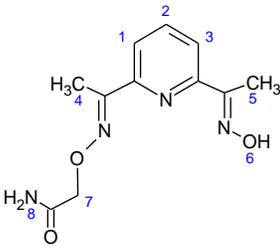


Figura 7.6 Espectro de ¹H RMN de Hdapam con numeración de carbonos de la estructura de la tabla 7.7

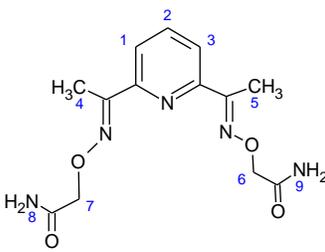
Tabla 7.7 Asignación de señales del espectro de Hdapam para protones

Estructura	#Átomo-H	δ (ppm)	Señal	Integración
	1,2,3	7.820	Multiplete	3
	6	11.574	Singulete	1
	8	7.290	Doblete	2
	7	4.543	Singulete	2
	4	2.366	singulete	3
	5	2.249	singulete	3

Dapydam

En el espectro para Dapydam (Tabla 7.8, Figura 7.7,) se puede observar la desaparición de la señal asociada al protón de la oxima y al ser simétrica, su espectro es más sencillo. A campo medio, se observa que el multiplete asociado a los tres protones piridínicos se convierte en un singulete en 7.874 ppm, a 7.330 ppm aparece un doblete que integra para 4 protones correspondiente a los protones de la amida, a 4.583 ppm se observa un singulete que integra para 4 protones correspondientes a los metilenos y por último otro singulete en 2.402 ppm correspondiente a los protones de los metilos que integra para 6 protones; si se compara esta señal con la del precursor H₂dapd (2.247 ppm), se observa que la sustitución desplaza la señal de los metilos a campo bajo.

Tabla 7.8 Asignación de señales del espectro de Dapydam para protones

Estructura	#Átomo-H	δ (ppm)	Señal	Integración
	1,2,3	7.874	Singulete	3
	9,8	7.330	Doblete	4
	6,7	4.583	Singulete	4
	4,5	2.402	Singulete	6

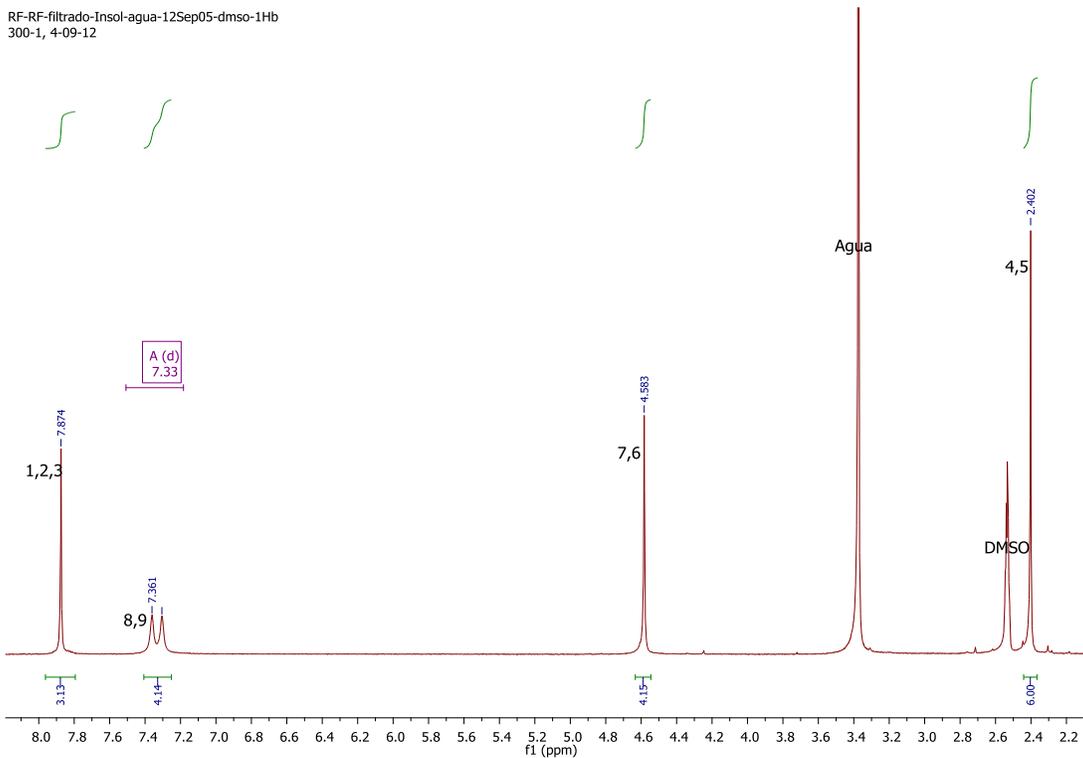


Figura 7.7. Espectro de RMN ^1H de Dapydam con la numeración de carbonos de la estructura de la tabla 7.8

RMN ^{13}C

Hdapam

A continuación se presenta el espectro de RMN ^{13}C del compuesto Hdapam, determinado en $\text{DMSO-}d_6$ y su correspondiente asignación en la Figura 7.8 y Tabla 7.9 respectivamente. Se asignaron las bandas con el programa *MestReNova 2009*.

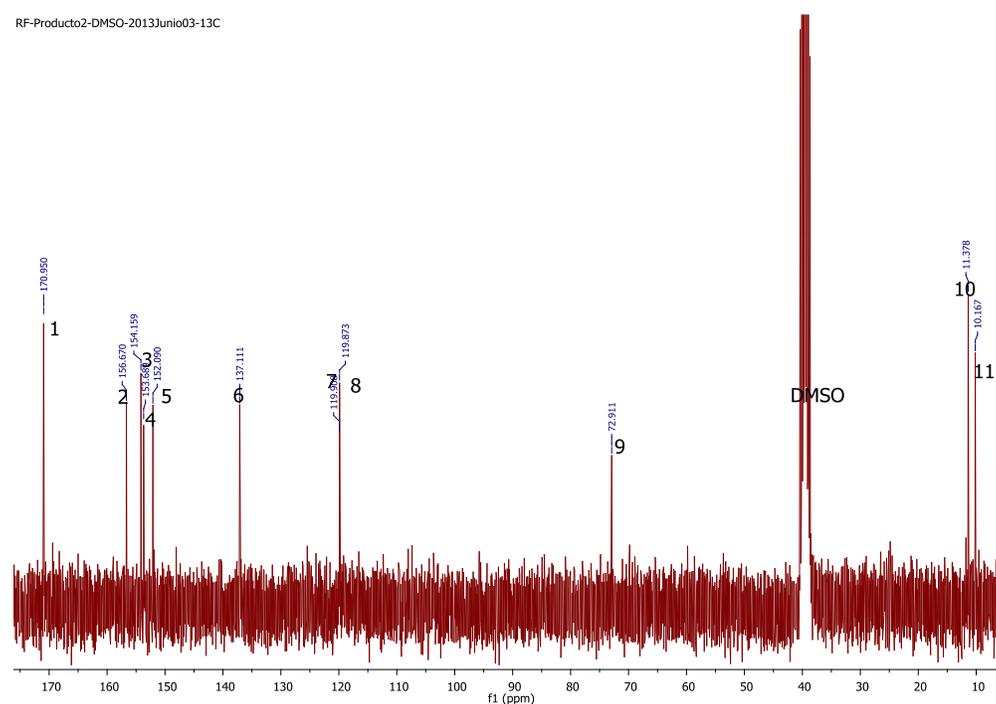


Figura 7.8 Espectro de RMN ^{13}C de Hdapam con numeración de carbonos de la estructura de la tabla 7.9.

Tabla 7.9 Asignación de señales del espectro de Hdapam para carbonos

Estructura	Carbono	$\delta(\text{ppm})$	Carbono	$\delta(\text{ppm})$
	1	170.950	7	119.908
	2	156.670	8	119.873
	3	154.159	9	72.911
	4	153.689	10	11.378
	5	152.090	11	10.167
	6	137.111		

Espectroscopía UV-Vis.

Se determinaron los espectros de absorción del ligante Hdapam en una mezcla de 10% metanol/agua a una concentración 0.4 mM del ligante en presencia de CAPS 1 mM a diferentes valores de pH. En estos espectros se observa un patrón bien definido el cual tiene un máximo de absorbancia en 286 nm. Se observa que la absorción aumenta conforme aumenta el pH. En la Figura 7.9 se muestran espectros de UV-vis de Hdapam a pH ácido, 4.56, y básico, 12.42, en donde se observa que se tiene el patrón de absorción; si se comparan estos espectros con los reportados para la piridina se observa un patrón similar pero la longitud de onda máxima está situada en 258 nm. Este espectro es característico del compuesto Hdapam. Se observa un cambio en la intensidad de las bandas pero con el mismo patrón conforme aumenta el pH, lo que se puede asociar a la desprotonación de ligante.

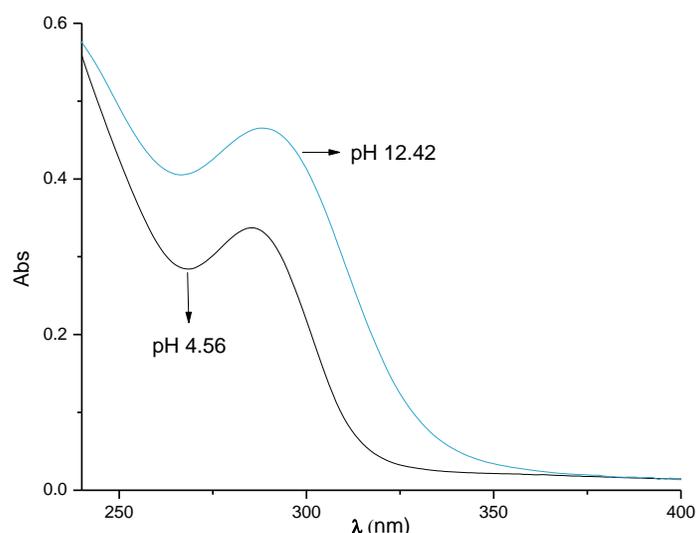


Figura 7.9 Espectros de UV-vis de Hdapam a pH ácido y básico.

Espectroscopía de Infrarrojo

A continuación se presentan los espectros infrarrojos de los reactivos y productos empleados en la síntesis de la Hdapam tomados en pastilla de KBr, y en la Tabla 7.10 se hace un resumen de las bandas asignadas a cada grupo funcional con base en las tablas de *Structure Determination of Organic Compounds* [Badertscher

2009], en donde se abrevian los modos vibracionales de la siguiente manera: estiramiento (st), deformación (δ), resonancia de Fermi (rF), sobretonos (ot), vibración del anillo (va) y los subíndices: asimétrico (as), simétrico (sy) y fuera del plano (oop).

2,6-Diacetilpiridina

En el caso del reactivo 2,6-diacetil piridina (Figura 7.10 y Tabla 7.10), una de las bandas más importantes es la que corresponde al estiramiento del carbonilo en 1698 cm^{-1} y en nuestro caso la ausencia de las bandas correspondientes al grupo oxima (R-C=N-OH).

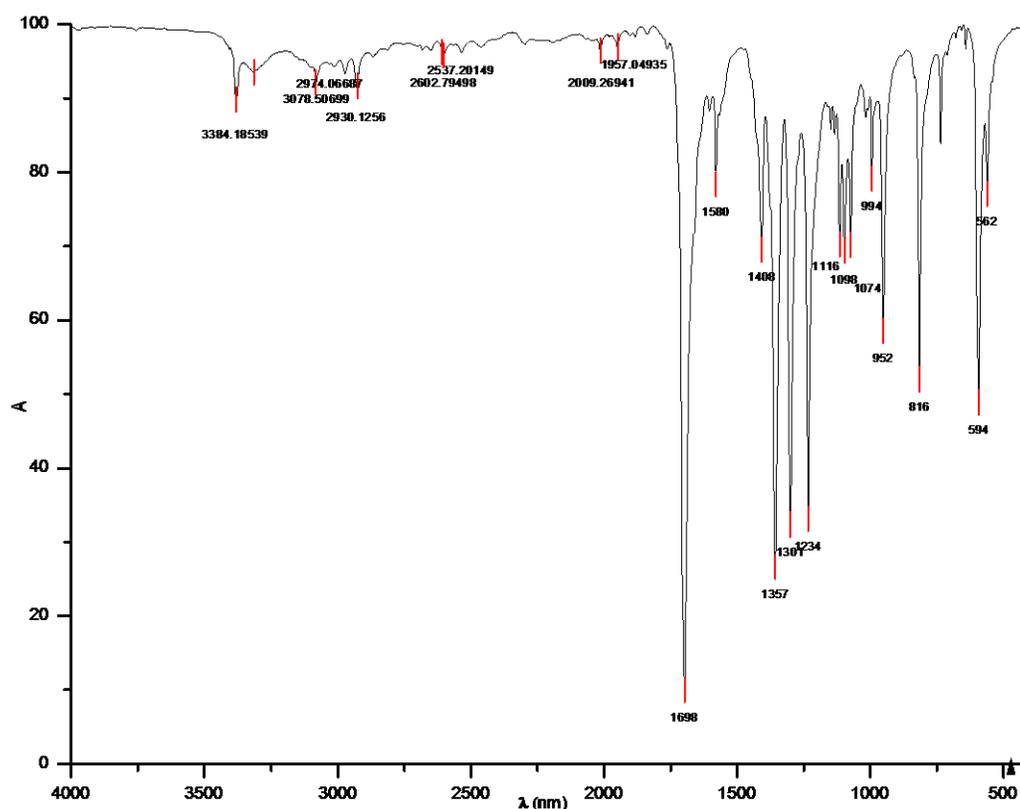


Figura 7.10 Espectro de IR de la 2,6-diacetilpiridina.

Tabla 7.10 Asignación de bandas según su grupo funcional, el enlace y su modo vibracional de la 2,6-diacetilpiridina.

Grupo funcional	Banda ν (cm^{-1})	Enlace	Modo vibracional
Metilos	1408	$\text{CH}_3\text{-C=O}$	δ_{as}
Cetona	1698	C=O	st
Piridina	3384, 3078	C-H	st
	952, 816	C-H	δ
	594	C-H	δ_{oop}
	1357,1301,1234	C=C	va
	2100-1800		ot

H₂dapd

En el espectro del precursor H₂dapd (Figura 7.11 y Tabla 7.11) se puede observar la considerable disminución de la banda de 1696 cm^{-1} correspondiente al carbonilo y aparecen las bandas en 1571 cm^{-1} y 1365 cm^{-1} asociadas con el estiramiento del enlace C=N y la deformación del enlace O-H respectivamente del grupo oxima. La señal asociada al estiramiento O-H de la oxima, tal como la mayoría de las señales OH es intensa y ancha, apareciendo en 3214 cm^{-1} .

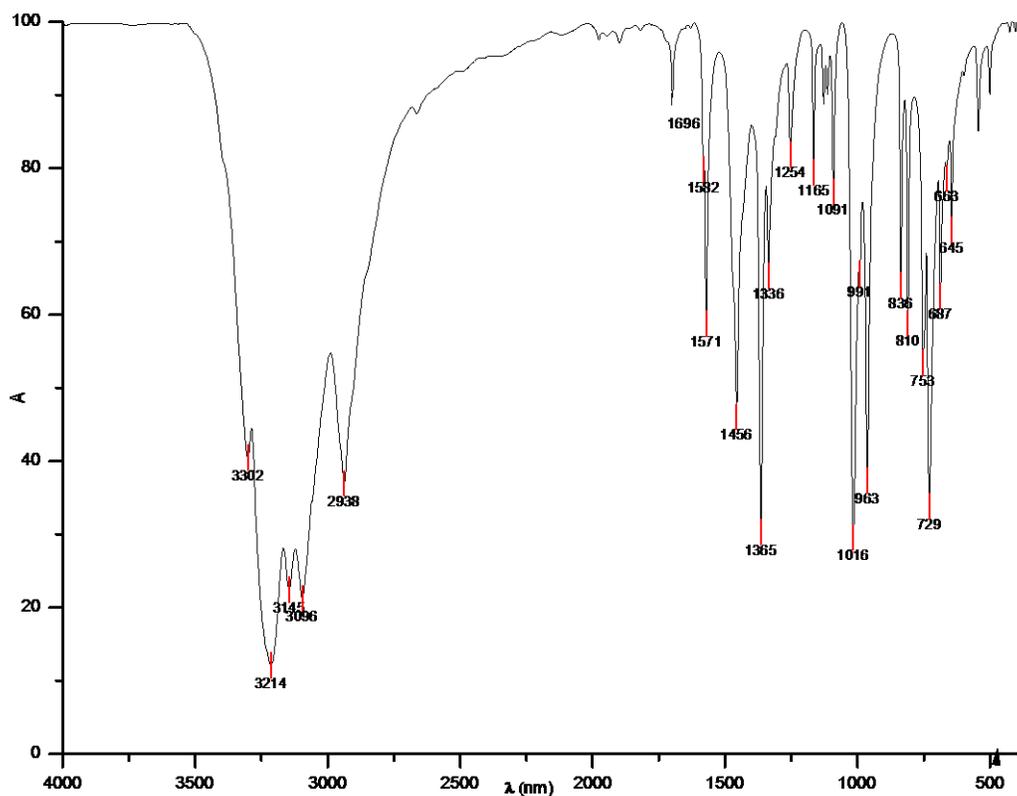


Figura 7.11. Espectro de IR de la H₂dapd

Tabla 7.11 Asignación de bandas según su grupo funcional, el enlace y su modo vibracional de la H₂dapd.

Grupo funcional	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Enlace	Modo vibracional	Grupo funcional	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Enlace	Modo vibracional
Metilos	1456	CH ₃ - C=N-O	CH ₃ δ_{as}	Piridina	1016, 991, 963 836, 810, 758	C-H	δ
Oxima	1571	C=N	st_{as}		1582, 1571, 1365	C=C	va
	1336	O-H	δ		2000-1800		ot
	3214	O-H	st				
	729	N-O	st				

Hdapam

En el espectro de Hdapam (Figura 7.12 y Tabla 7.12) además de que reaparece la señal en 1698 cm^{-1} la cual se asocia en este caso al enlace N-O de la oxima, también se observa la señal ancha e intensa del estiramiento del enlace O-H de la oxima en 3201 cm^{-1} . Además aparecen nuevas señales correspondientes al grupo amida, características para las amidas primarias, dos señales en 3417 y 3300 cm^{-1} de la misma intensidad por el estiramiento N-H de la amida y una señal en 1663 cm^{-1} características del estiramiento C=O de la amida.

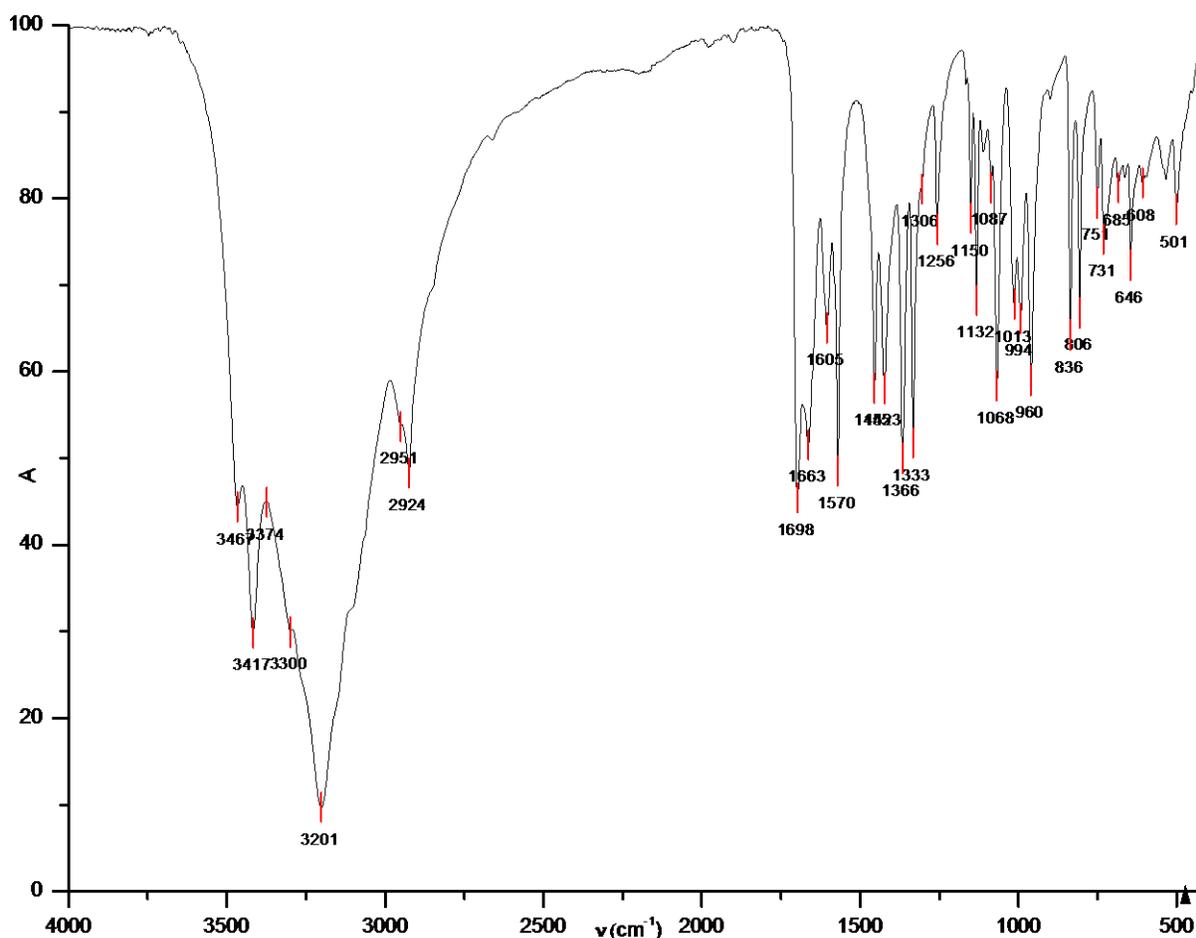


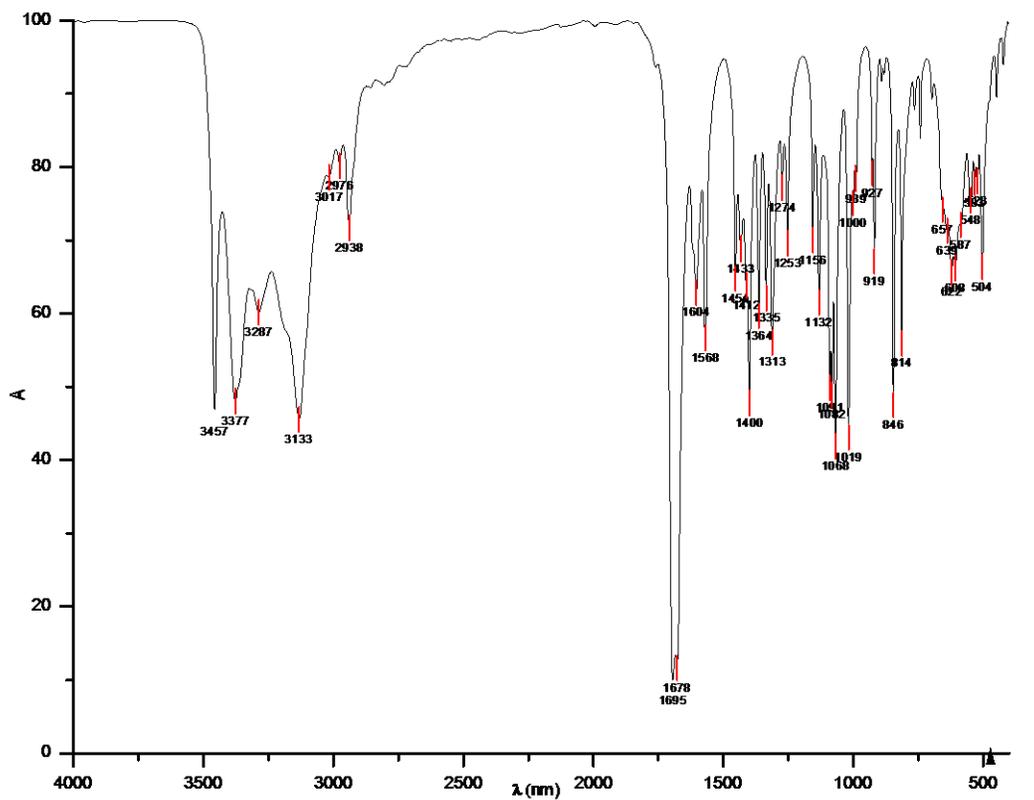
Figura 7.12 Espectro de IR de la Hdapam

Tabla 7.12 Asignación de bandas según su grupo funcional, el enlace y su modo vibracional de la Hdapam

Grupo funcional	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Enlace	Modo vibracional	Grupo funcional	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Enlace	Modo vibracional
Metilos	1455	CH ₃ - C=N-O	CH ₃ δ_{as}	Piridina	994, 960, 836 806, 751,	C-H	δ
Tipo cetona	1698	-H ₂ C- CO-NH ₂	C=O st		501	C-H	δ_{opp}
Oxima	1570	C=N	st _{as}		1605, 1570, 1366	C=C	va
	1423	O-H	δ		2000- 1800		ot
	3201	O-H	st	Amida	3417, 3300	N-H	st
731	N-O	st	751, 646		N-H	δ_{opp}	
Tipo Éter	1068, 1013	C-O-N	st _{sy}		1150	N-H	
	1256	C-O-N	st _{as}		1663	C=O	st
				1423	C-N	st	

Dapydam

Lo más notable en el espectro de Dapydam (Figura 7.13 y Tabla 7.13) es la desaparición de la señal amplia e intensa del enlace OH de la oxima, pero se conservan las señales en 3457 cm^{-1} y 3377 cm^{-1} que corresponden al estiramiento N-H de la amida. Se observan dos señales muy cercanas en 1695 y 1678 cm^{-1} que corresponden al estiramiento del enlace N-O y C=O respectivamente, el primero se asocia al N-O-R de la oxima O-sustituida y el segundo al C=O de la amida.



7.13 Espectro de IR de la Dapydam

Tabla 7.13 Asignación de bandas según su grupo funcional, el enlace y su modo vibracional de la Dapydam

Grupo funcional	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Enlace	Modo vibracional	Grupo funcional	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Enlace	Modo vibracional	
Metilos	1454	CH ₃ - C=NO	CH ₃ δ_{as}	Piridina	994, 960, 836 806, 751,	C-H	δ	
Tipo cetona	1678	H ₃ C-CN- CH	C=N st		501	C-H	δ_{opp}	
	1695	-H ₂ C- CO-NH ₂	C=O st		1605, 1570, 1366	C=C	va	
Amida	3457, 3377	N-H	st		2000- 1800		ot	
	751, 646	N-H	δ_{oop}		Tipo Éter	1068, 1013	C-O- N	st _{sy}
		1256	C-ON			st _{as}		
	1150	N-H	δ					
1423	C-N	st						

8. Determinación de los valores de pK_a del ligante Hdapam

Los valores de pK_a del ligante se determinaron mediante titulaciones espectrofotométricas, potenciométricas y posteriormente a partir de los datos cinéticos (ver Sección 9) a 25°C manteniendo, en todos los casos se utilizó un flujo de N_2 para evitar la presencia de CO_2 y posible formación de carbonatos.

Espectrofotometría

Estas titulaciones se hicieron a concentraciones 0.4 mM del ligante en presencia y ausencia de un equivalente de HCl. En los experimentos sin HCl se amortiguó el medio con 100 mM de CAPS en una mezcla de 10% metanol en agua. Durante la titulación se añadieron volúmenes constantes de NaOH estandarizado 0.56 M y a cada punto se registró el espectro de UV-vis. Para el análisis de los datos obtenidos, se seleccionaron varias longitudes de onda, particularmente donde el ligante Hdapam tiene un máximo de absorción (268 nm) y estos datos se ajustaron a una ecuación para determinar el pK_a (Ecuación 4, Figura 8.1).

En las titulaciones en las que se añadió un equivalente de ácido, se alcanzaron a observar dos valores de pK_a : uno que se asigna al equilibrio acido-base del grupo piridina en 1.37 ± 0.02 y otro que se asigna al grupo oxima en 11.51 ± 0.10 (estos valores son promedio de al menos tres determinaciones analizadas a tres longitudes de onda tal como se muestra en las Tablas 8.1 y 8.2), con base en resultados publicados anteriormente [Yatsimirsky 1998, Gómez-Tagle 2013].

En la Figura 8.2 se muestra una curva de titulación detallada en la zona básica que corresponde a las titulaciones que se hicieron sin adicionar un equivalente de HCl, empleando como amortiguador CAPS 100 mM y se analizaron los datos obtenidos a las mismas longitudes de onda. El valor obtenido de pK_a es de 11.43 ± 0.05 y se asigna a la desprotonación de la oxima con base en los resultados de trabajos anteriores [Yatsimirsky 1998, Gómez-Tagle 2013].

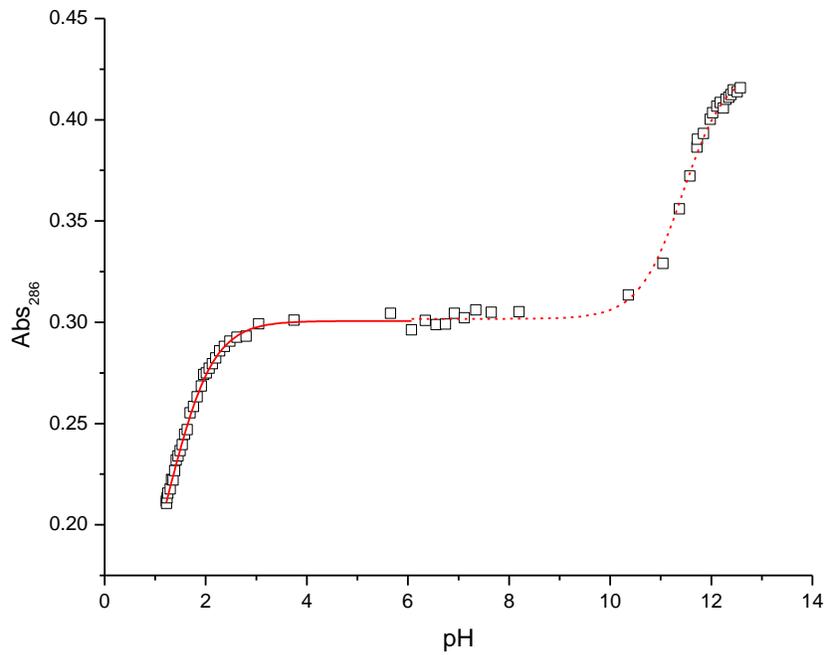


Figura 8.1 Titulación espectrofotométrica de Hdapam con un equivalente de HCl. La línea continua representa el ajuste a la Ecuación 4 (ver sección 6.7) en la parte ácida y la línea punteada representa el ajuste en la zona básica.

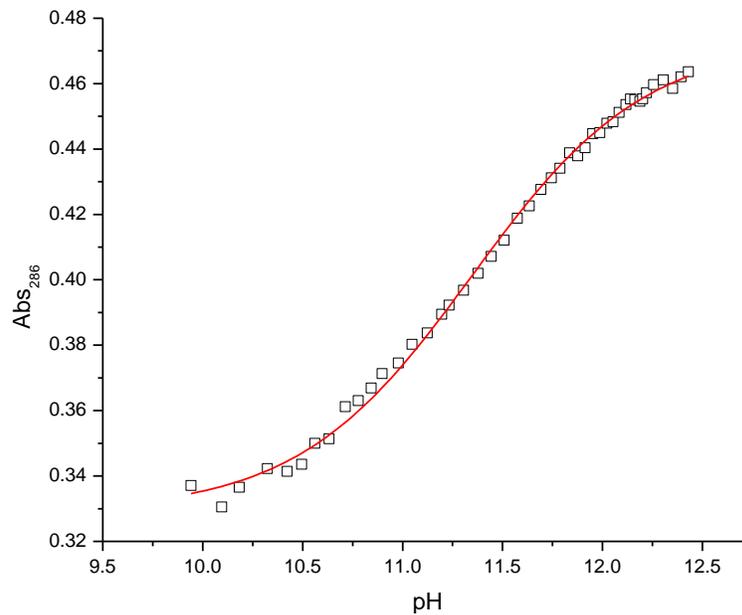


Figura 8.2 Titulación espectrofotométrica de Hdapam en ausencia de HCl. La línea continua representa el ajuste a la Ecuación 4 (ver sección 6.7).

Tabla 8.1 Valores de pK_a para Hdapam a varias longitudes de onda.

Longitud de onda λ nm	$pK_{a1} \pm ds$	$pK_{a2} \pm ds$
329	1.37 ± 0.02	11.50 ± 0.05
286	1.31 ± 0.02	11.43 ± 0.03
223	1.43 ± 0.02	11.60 ± 0.10
Promedios	1.37 ± 0.02	11.51 ± 0.10

Tabla 8.2 Valor del segundo pK_a para Hdapam a varias longitudes de onda. Estos valores son promedio de las titulaciones en presencia y en ausencia de un equivalente de HCl.

Longitud de onda λ nm	$pK_{a2} \pm ds$
329	11.46 ± 0.02
286	11.43 ± 0.03
223	11.40 ± 0.01
Promedio	11.43 ± 0.03

Potenciometría

Las titulaciones potenciométricas del ligante se realizaron a una mayor concentración de ligante que las titulaciones espectrofotométricas. En potenciometría se usó una concentración de 2.5 mM del ligante y las titulaciones también se hicieron en presencia y ausencia de un equivalente de HCl, en una mezcla de 20% metanol en agua (para evitar problemas de solubilidad), empleando como titulante NaOH 0.211 M estandarizado, y a fuerza iónica impuesta con NaCl 100 mM.

Los datos de potenciometría se ajustaron directamente en el programa *Hyperquad*. El programa *Hyperquad* tiene un método numérico que permite calcular varias constantes acumulativas (β) 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*. Su versión para titulaciones espectrofotométricas permite la iteración simultánea a 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 de los equilibrios presentes en disolución, la composición de cada especie y los valores iniciales 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 8.3 se muestra una curva de titulación sin la adición de un equivalente de ácido y su ajuste en el programa *Hyperquad*. Tal como se muestra, se obtiene un valor de pK_a de 11.30 ± 0.20 .

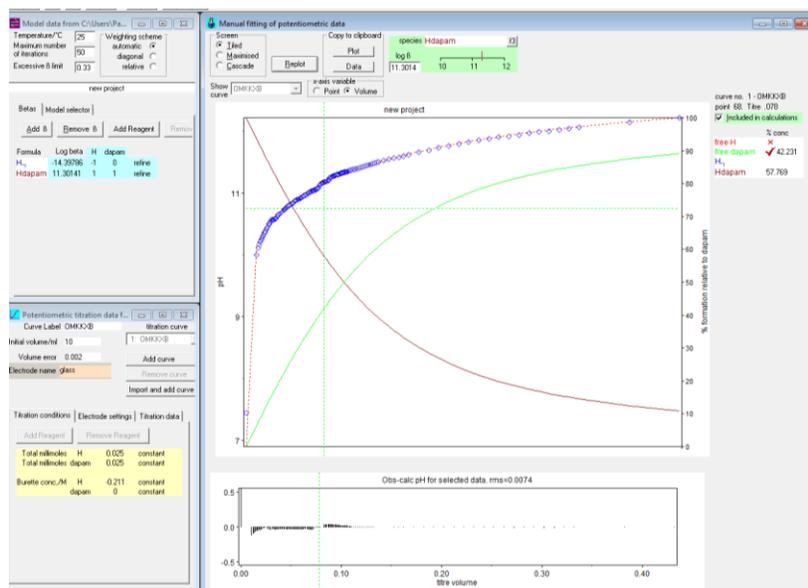


Figura 8.3 Ajuste de la titulación potenciométrica de Hdapam en *Hyperquad* (imagen de pantalla al hacer el ajuste). Ligante 2.5 mM, NaOH 0.211 M, NaCl 100 mM, 25°C, bajo flujo de N₂ (ausencia de HCl), 20% de metanol. pK_a 11.30 ± 0.05

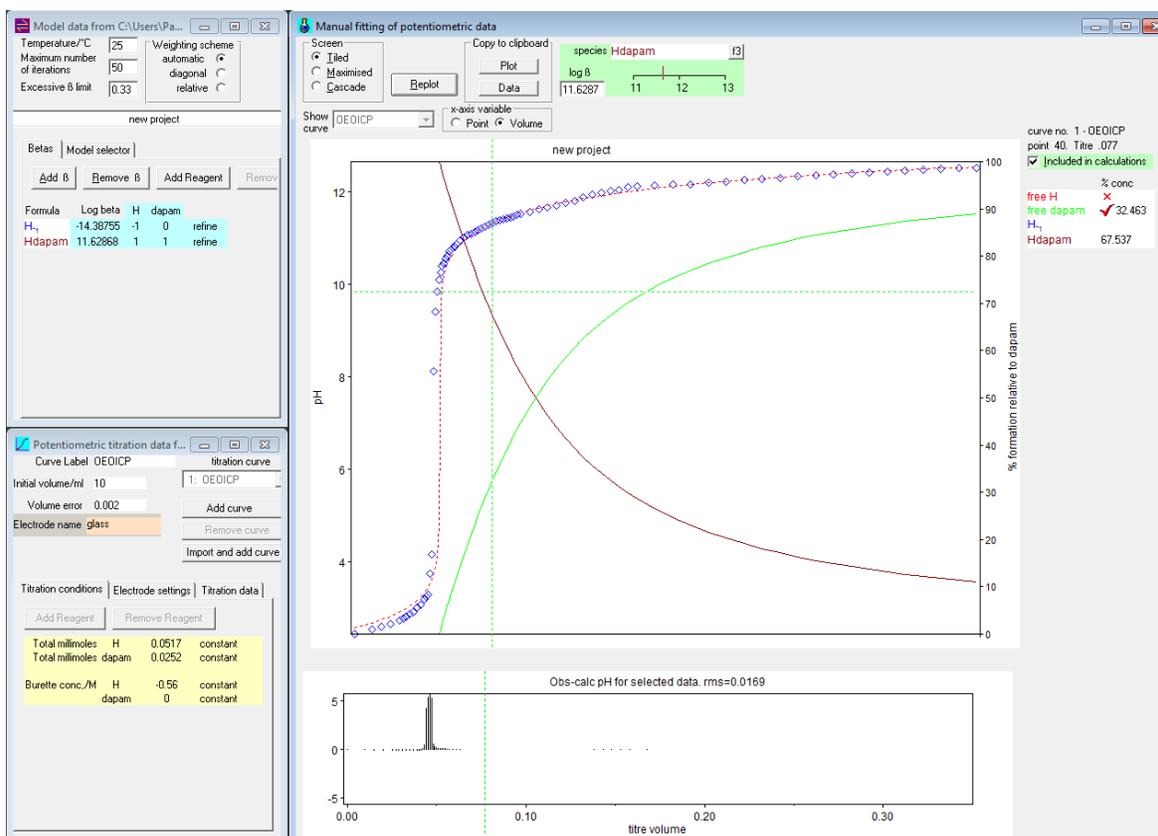


Figura 8.4 Ajuste de la titulación potenciométrica de Hdapam en *Hyperquad* (imagen de pantalla al hacer el ajuste). Ligante 2.5 mM con un equivalente de HCl, NaOH 0.211 M, NaCl 100 mM, 25°C, bajo flujo de N₂, 20% de metanol. $pK_{a2} 11.70 \pm 0.07$

La titulación con la adición de un equivalente de ácido se realizó a las mismas condiciones anteriores, buscando determinar el pK_a de protonación de la piridina. Sin embargo, como el pH inicial de la disolución es cercano a 2.4, no se obtiene un buen ajuste para el primer valor de pK_a y el segundo nos dio un valor de 11.70 ± 0.07 .

A partir de los resultados obtenidos por espectrofotometría se determinan valores promedio de pK_a de 1.5 ± 0.8 para la protonación de la piridina y de 11.47 ± 0.2 para el grupo oximato (el cual es muy cercano al valor determinado cinéticamente, $pK_a 11.48$, sección siguiente), que corresponden respectivamente a los equilibrios 1 y 2 de la Figura 8.4. En lo sucesivo se usarán estos valores ya que fueron determinados en el mismo porcentaje de metanol-agua, 10%, que es el disolvente

empleado en los estudios cinéticos; el valor de pK_a de la oxima determinado mediante potenciometría es mayor, probablemente porque se usó un mayor porcentaje de metanol, 20%.

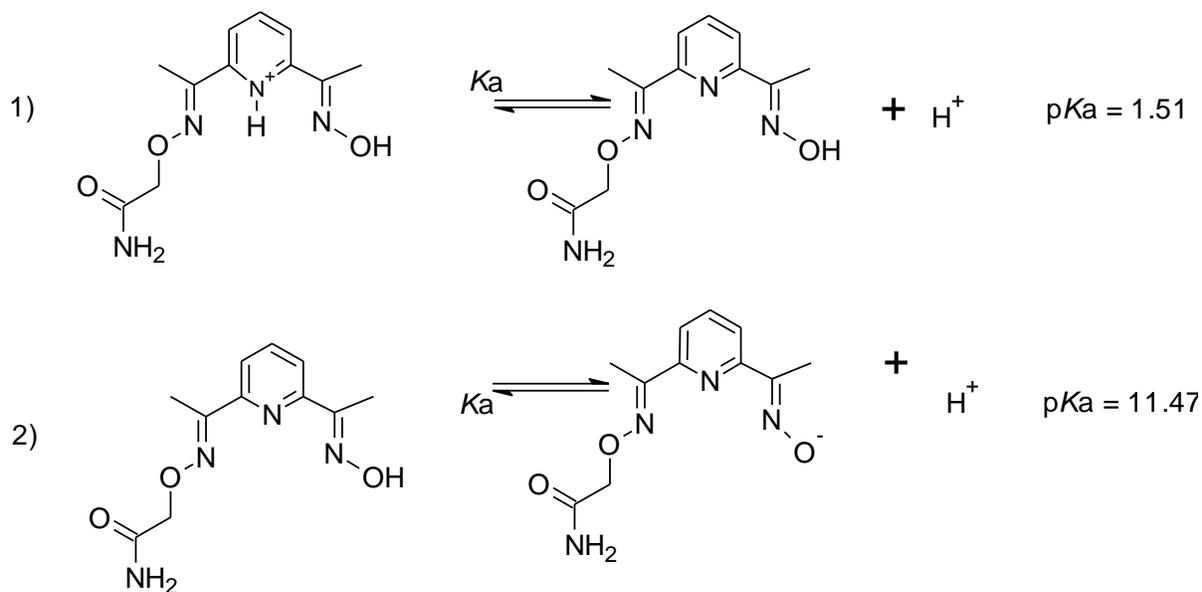


Figura 8.4 Equilibrios de disociación ácida para Hdapam

9. Reactividad nucleofílica del ligante Hdapam

Se determinó la reactividad intrínseca del nucleófilo aniónico $dapam^-$, para una posterior comparación con la de sus complejos metálicos y con otros oximatos reportados en la literatura y para mostrar si la Hdapam se comporta como un α -nucleófilo en la esterólisis de NFA. Una forma de hacer de esto es comparar la reactividad intrínseca del anión oximato con el anión OH^- libre. La constante de hidrólisis alcalina, k_{OH} , reportada para la hidrólisis del sustrato NFA en agua a $25^\circ C$, es de $14.7 M^{-1}s^{-1}$. [Hupe 1960]. En el caso de los aniones oximato, a esta constante se le denomina *constante de oximinólisis*, k_{ox} , y es la *constante de reactividad intrínseca* del anión oximato en ese medio, tiene unidades de $M^{-1}s^{-1}$. Como se trata de una constante de rapidez de segundo orden que no depende del pH y ni de la concentración del oximato, se le llama "intrínseca". Adicionalmente se espera que exhiba el efecto de nivelación en las coordenadas de Brønsted para oximas de $pK_a \geq 8$.

Dependencia del pH en la hidrólisis del NFA con Hdapam

Para poder obtener la dependencia de k_{obs} en función del pH a cierta concentración de Hdapam, el estudio cinético de la hidrólisis del NFA es necesario separar las contribuciones del anión $dapam^-$ y del OH^- ya que ambos dependen del pH. Esto se hizo de dos formas. Primero, se determinó la constante de hidrólisis alcalina en el medio de reacción y se restó esta contribución a cada valor de pH. Segundo, se estudió la dependencia de k_{obs} respecto a la concentración del ligante Hdapam a diferentes valores de pH; esto nos permite determinar a partir de la ordenada al origen la contribución alcalina, comprobar que la reacción es de primer orden para $dapam^-$, y obtener la constante de segundo orden a un valor de pH fijo.

Así, se siguió la esterólisis de NFA a diferentes valores de pH (8.5-11.5) y a una concentración fija de Hdapam. Las curvas cinéticas (datos de absorbancia en función del tiempo) se ajustaron a una ecuación de primer orden (Ecuación 5) de donde se obtuvieron las constantes de rapidez observadas, k_{obs} . Se determinaron también las constantes de rapidez en ausencia del ligante, k_{OH}' . Así, de la diferencia de $k_{corr} = k_{obs} - k_{OH}' = k_{ox} [ox^-]$ se obtienen las constantes de rapidez corregidas, k_{corr} , que dan únicamente la contribución del ligante a cada pH; esta es una primera aproximación ya que estos datos son puntuales. Las condiciones empleadas fueron NFA 0.04 mM, CAPS 100 mM ajustado al valor deseado con NaOH o HCl valorados, Hdapam 1 mM, 10% de MeOH en agua a 25°C.

De la grafica de k_{corr} en función del pH se obtiene k_{corr} límite ajustando los datos con la Ecuación 4b, que es una ecuación similar a la Ecuación 4 (ver Apendice(F)), pero se usan los parámetros de cinética en lugar de los parámetros de absorbancia.

$$k_{corr} = \frac{k_{ox}[Hdapam]_0}{(10^{pK_a - pH} + 1)}$$

Ecuación 4b

Así, se obtiene un valor de pK_a 11.63 ± 0.18 que es cercano al obtenido al hacer las titulaciones potenciométricas en condiciones similares y un valor de la constante de oximinólisis, k_{ox} , de $50 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que es razonable comparado con los valores reportados en la literatura para otras piridín oximas. Sin embargo, este valor tiene un error de ± 12.9 lo cual nos deja una gran incertidumbre, por eso resulta necesario determinarlo empleando varias concentraciones totales del ligante.

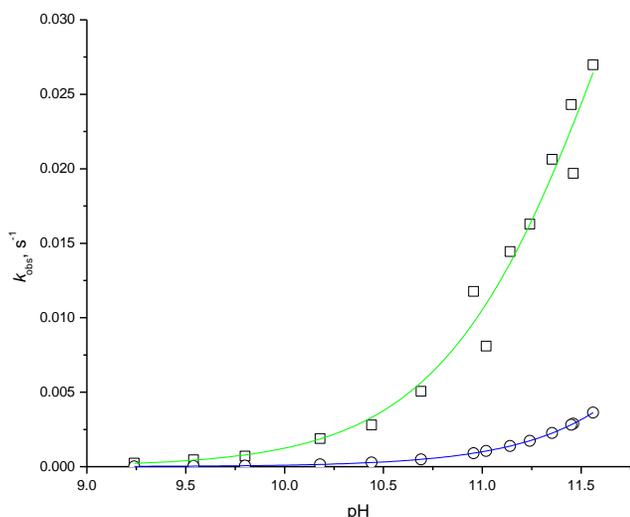


Figura 9.1 Constantes de velocidad observadas, k_{obs} , en la esterólisis del NFA con Hdapam (\square) y del medio (o) en función del pH.

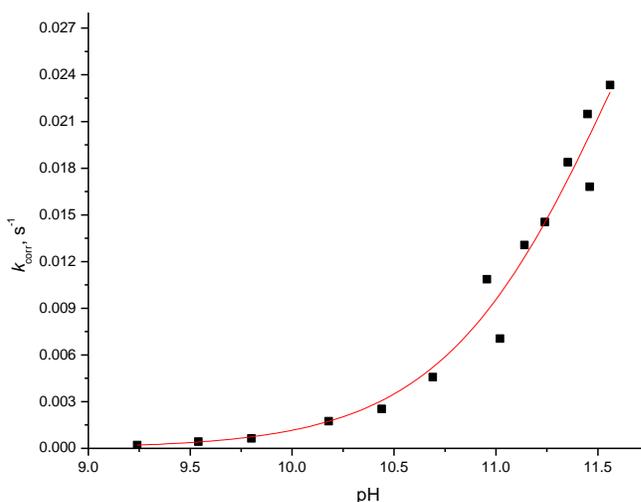


Figura 9.2 Constantes de velocidad corregidas, k_{corr} , en la esterólisis del NFA en función del pH para una concentración 1 mM de ligante. La línea es el ajuste a la Ecuación 4b

El valor de pK_a que se obtuvo es razonablemente bueno en términos del error y coincide con el esperado por lo que se usó como una aproximación para estudios posteriores más detallados. Por otro lado, la constante de segundo orden para el anión oximato indica que se comporta como un α -nucleófilo: si lo comparamos con la reactividad del anión OH^- en agua, $14.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Hupe y Jenks 1960], es aproximadamente 4 veces mayor a pesar de que su pK_a es casi 4 unidades menor. Se observa también que en el intervalo de pH estudiado la contribución del medio es pequeña comparada con la del oximato.

Dependencia de constante de rapidez con respecto de la concentración de Hdapam a diferentes valores de pH.

La rapidez de hidrólisis del sustrato NFA depende de la concentración de los nucleófilos presentes en disolución, que en nuestro caso son el OH^- y el anión oximato; ambas concentraciones aumentan con el pH, sin embargo, al variar la concentración de Hdapam a un valor de pH fijo, la contribución del OH^- es la misma, mientras que la de dapam^- se incrementa por un aumento en la concentración total aunque la relación $[\text{dapam}^-]/[\text{Hdapam}]$ se mantiene constante.

El intervalo en que se varía la concentración de Hdapam depende del pH ya que es deseable que la concentración del oximato vaya desde una concentración igual a la de OH^- hasta sobrepasarlo por unas 3 veces. La concentración de OH^- , y por lo tanto su contribución a la hidrólisis del NFA, cambia fuertemente con el pH siendo pequeña a valores bajos de pH, pero conforme aumenta el pH esta contribución será mayor. Por ejemplo, para pH de 9.0 se espera una contribución del OH^- a la constante de rapidez observada k_{obs} de $1.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ mientras que a pH 11.0 es 100 veces mayor, $1.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Al ir aumentando el pH se obtiene una mayor relación oximato/oxima y para obtener el perfil completo de pH es necesario hacer mediciones de cinética a valores de pH que estén dos unidades por encima del pK_a de la oxima para obtener datos en condiciones donde esté casi completamente desprotonada. Sin embargo, como el pK_a de Hdapam debe ser alrededor de 11.5 de acuerdo a los datos de potenciometría y espectrofotometría, sería necesario ir hasta un pH de 13.48 lo cual no es posible experimentalmente en un medio acuoso. Además, como la k_{obs} es la suma de contribuciones del OH^- del medio y del ion oximato, la hidrólisis del sustrato transcurriría en fracciones de segundos y se requeriría monitorizar las reacciones haciendo uso de un stopped-flow.

Considerando estas situaciones, para determinar la constante de oximinólisis se hicieron mediciones cinéticas determinando las k_{obs} para la esterólisis del NFA, variando la concentración de Hdapam a pH constante. Los experimentos se hicieron por triplicado a cada valor de pH cubriendo un intervalo entre 9.7 y 11.82 ($t_{1/2}$ de NFA a pH 11.8 es aprox. de 10 segundos); el medio se mantuvo amortiguado empleando los amortiguadores biológicos CHES y CAPS que no tiene reactividad esterolítica hacia NFA. A estas condiciones, las constantes de rapidez observadas, k_{obs} , se obtuvieron mediante el ajuste de los datos a una ecuación de primer orden, Ecuación 5. En la Figura 9.3 se muestra un ejemplo de estos ajustes.

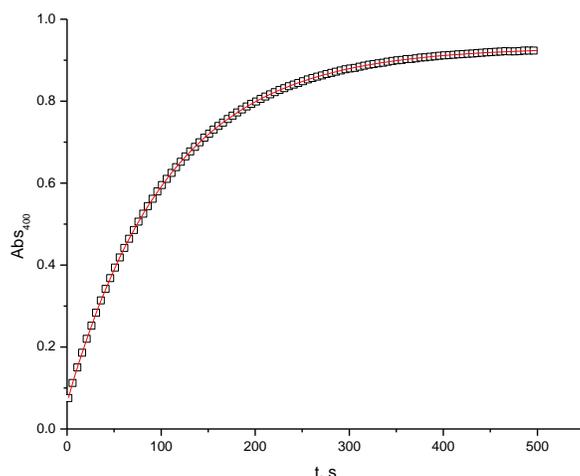


Figura 9.3 Esterólisis de NFA 0.04 mM a pH 10.15 con Hdapam 2.6 mM, MOPS 100 mM a 25°C, 10% metanol. La línea continua representa el ajuste de los datos a la Ecuación 5. $k_{obs} = (0.00935 \pm 0.0018) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Posteriormente se graficaron las k_{obs} en función de la concentración total de Hdapam a cada valor de pH (Figuras 9.4-9.12 y Tablas 9.1 a 9.9). Los perfiles observados corresponden a rectas para cada valor de pH lo cual permite: 1) comprobar que el orden de reacción por el anión oximato es uno, 2) calcular la constante aparente de segundo orden a ese pH, k'_{ox} , para el anión oximato a

partir de la pendiente de la recta y 3) medir la contribución del anión OH^- tomado del intercepto al origen.

Tabla 9.1 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 9.73, CAPS 100 mM.

[Hdapam], 10^{-4}M	$k_{\text{obs}} \pm \text{ds}(10^{-6}), \text{s}^{-1}$
0	0.00165 ± 1.8
1.97	0.00244 ± 1.0
3.9	0.00262 ± 6.9
5.91	0.00293 ± 5.1
7.88	0.00324 ± 8.5
9.85	0.0033 ± 1.1

Tabla 9.2 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 10.15, CHES 100 mM.

[Hdapam], 10^{-4}M	$k_{\text{obs}} \pm \text{ds}(10^{-6}), \text{s}^{-1}$
0	0.0048 ± 2.9
10.3	0.00546 ± 1.7
15.5	0.00661 ± 2.1
20.7	0.00815 ± 2.7
25.9	0.00935 ± 1.8

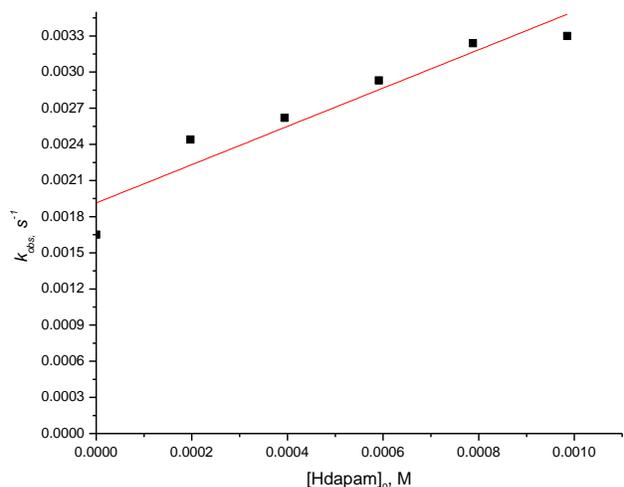


Figura 9.4 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 9.73, CAPS 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{\text{ox}} = 1.58 \pm 0.24 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

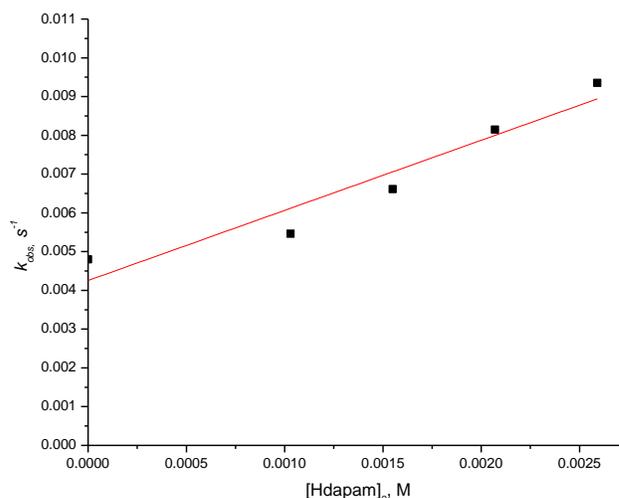


Figura 9.5 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 10.15, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{\text{ox}} = 2.54 \pm 0.22 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabla 9.3 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 10.53, CHES 100 mM

[Hdapam], 10 ⁻⁴ M	$k_{obs} \pm ds(10^{-4}), s^{-1}$
0	0.01009 ± 0.76
1.87	0.01226 ± 0.75
3.74	0.01462 ± 0.74
5.61	0.01614 ± 1.4
7.48	0.01738 ± 1.1
9.35	0.01802 ± 1.5

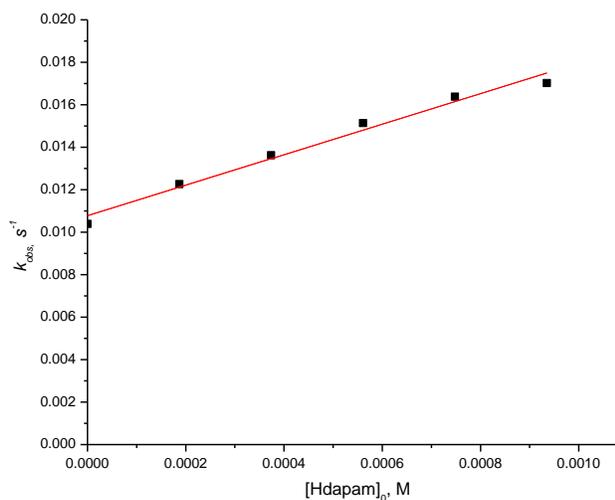


Figura 9.6 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 10.53, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{ox} = 7.18 \pm 0.01 M^{-1}s^{-1}$

Tabla 9.4 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 10.68, CHES 100 mM.

[Hdapam], 10 ⁻⁴ M	$k_{obs} \pm ds(10^{-5}), s^{-1}$
0	0.01043 ± 0.86
1.87	0.0125 ± 0.97
3.74	0.02083 ± 0.98
5.61	0.02479 ± 3.1
7.48	0.02896 ± 5.1
9.35	0.03357 ± 6.4

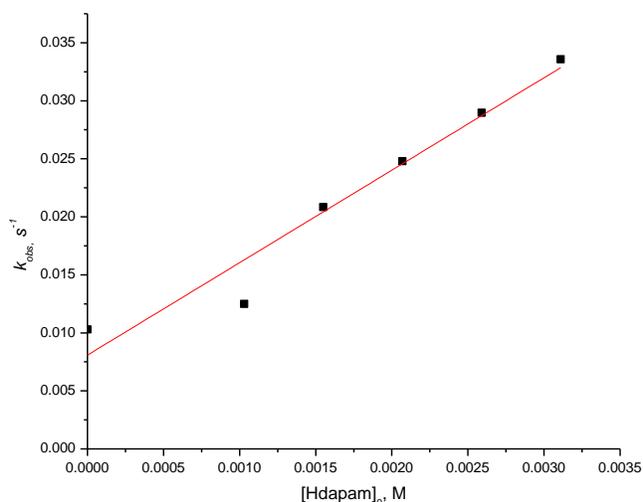


Figura 9.7 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 10.68, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{ox} = 7.96 \pm 0.46 M^{-1}s^{-1}$

Tabla 9.5 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 11.01, CHES 100 mM

[Hdapam], 10^{-4}M	$k_{\text{obs}} \pm \text{ds}(10^{-5}), \text{s}^{-1}$
0	0.015 ± 5.5
10.3	0.02766 ± 4.5
15.5	0.03976 ± 13
20.7	0.04226 ± 0.29
25.9	0.05052 ± 0.28
31.1	0.05783 ± 0.29

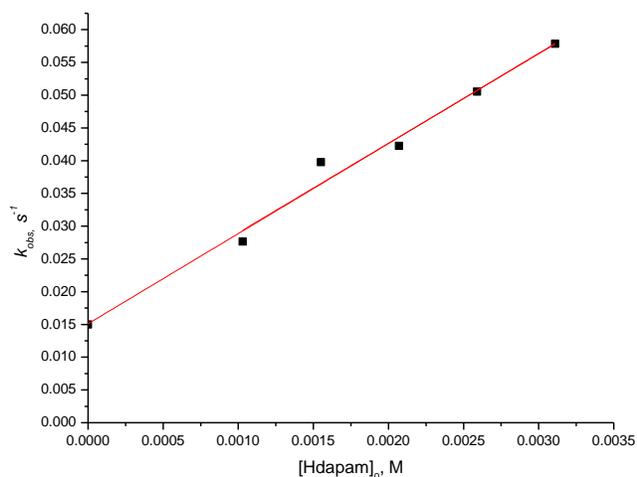


Figura 9.8 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 11.01, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{\text{ox}} = 13.67 \pm 1.68 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabla 9.6 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 11.28, CHES 100 mM

[Hdapam], 10^{-4}M	$k_{\text{obs}} \pm \text{ds}(10^{-3}), \text{s}^{-1}$
0	0.05309 ± 0.24
1.979	0.06203 ± 1.0
3.958	0.06406 ± 0.51
5.937	0.06596 ± 1.3
7.916	0.07669 ± 1.3
9.895	0.08371 ± 2.3

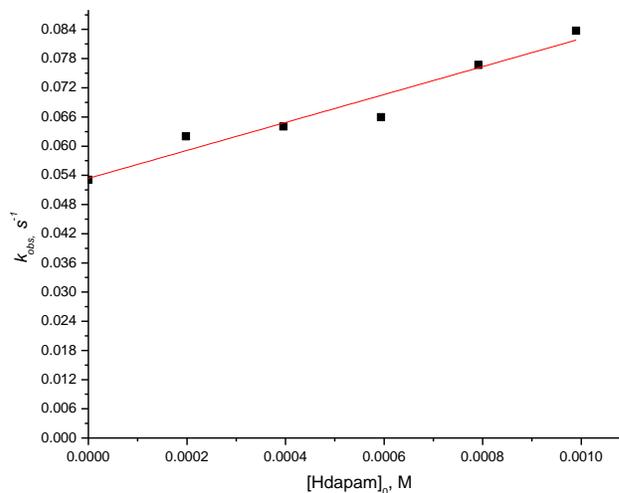


Figura 9.9 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 11.28, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos $k'_{\text{ox}} = 22.46 \pm 1.5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabla 9.7 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 11.45, CHES 100 mM

[Hdapam], 10^{-4} M	$k_{obs} \pm ds(10^{-4}), s^{-1}$
0	0.058 ± 10
1.97	0.06331 ± 6.9
3.94	0.07049 ± 0.11
5.91	0.07502 ± 9.1
7.88	0.07978 ± 0.11
9.85	0.08521 ± 6.4

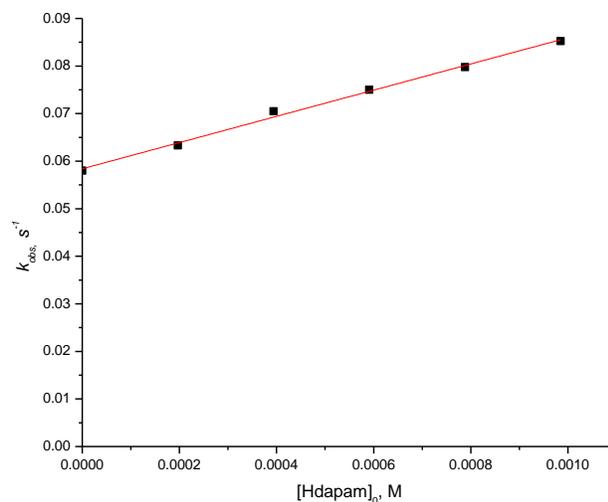


Figura 9.10 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 11.45, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa a $k'_{ox} = 27.55 \pm 3.4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabla 9.8 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 11.72, CHES 100 mM

[Hdapam], 10^{-4} M	$k_{obs} \pm ds(10^{-4}), s^{-1}$
0	0.166 ± 12
1.979	0.1683 ± 5.9
3.958	0.1745 ± 3.7
5.937	0.1751 ± 7.9
7.916	0.1949 ± 8.4
9.895	0.198 ± 6.1

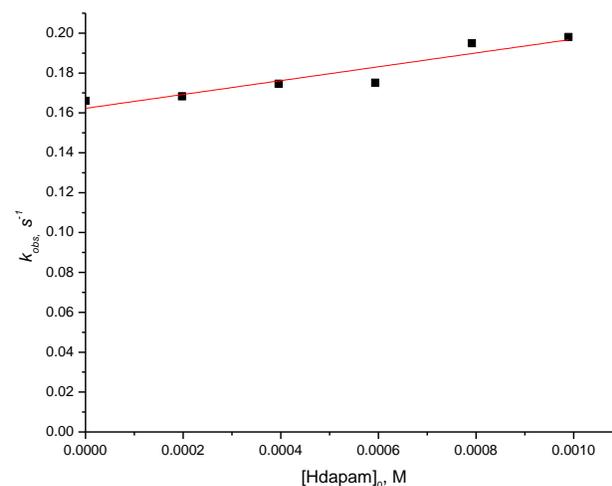


Figura 9.11 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 11.72, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{ox} = 34.7 \pm 3.9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tabla 9.9 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante en la esterólisis de NFA 0.04 mM a 25°C, pH 11.82, CHES 100 mM

[Hdapam], $10^{-4}M$	$k_{obs} \pm ds(10^{-4}), s^{-1}$
0	0.1138 ± 4.3
1.97	0.1202 ± 3.0
3.94	0.1393 ± 4.1
5.91	0.1428 ± 2.3
7.88	0.1473 ± 4.7
9.85	0.1509 ± 5.3

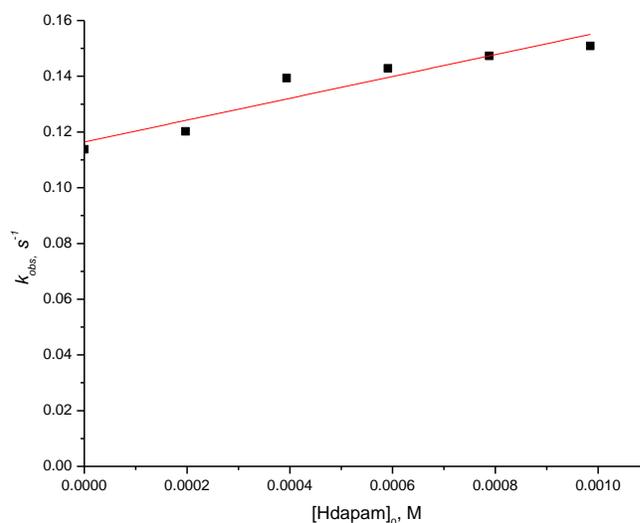


Figura 9.12 k_{obs} en la esterólisis de NFA en función de [Hdapam] a pH 11.82, CHES 100 mM, 25°C. La línea continua representa el ajuste de los datos. $k'_{ox} = 39.2 \pm 6.2 M^{-1}s^{-1}$

Tabla 9.10 Constantes de oximinólisis aparentes, k'_{ox} , a diferentes valores de pH en la hidrólisis de NFA 0.04 mM. CAPS o CHES 100 mM, 25°C en 10% de metanol en agua.

pH	$k'_{ox} \pm ds, M^{-1}s^{-1}$	pH	$k'_{ox} \pm ds, M^{-1}s^{-1}$
9.73	1.58 ± 0.24	11.28	22.46 ± 1.5
10.15	2.54 ± 0.22	11.45	27.55 ± 3.4
10.53	7.18 ± 0.01	11.72	34.7 ± 3.9
10.68	7.96 ± 0.46	11.82	39.2 ± 6.2
11.01	13.67 ± 1.68		

Con estos valores de k_{ox}' se puede determinar la constante de oximinólisis independiente del pH, k_{ox} , de acuerdo a la Ecuación 7.

$$k'_{ox} = \frac{k_{ox}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Los datos de k_{ox} en función del pH dan una curva sigmoideal (Figura 9.14) la cual se podría ver completa, si se pudiera trabajar a pH mayores. Sin embargo, a pesar de que sólo se cuenta con un poco más de la mitad del perfil sigmoideal (porque las reacciones son demasiado rápidas para la técnica que se usó para medirlas), el ajuste mostrado en la Figura 9.14 (datos de la Tabla 9.10) es razonablemente bueno y se obtienen como parámetros un valor de pK_a de 11.48 ± 0.05 y una constante de oximinólisis, k_{ox} , de $56 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor de k_{ox} es muy confiable pues es el resultado de una serie de variaciones de concentración y pH.

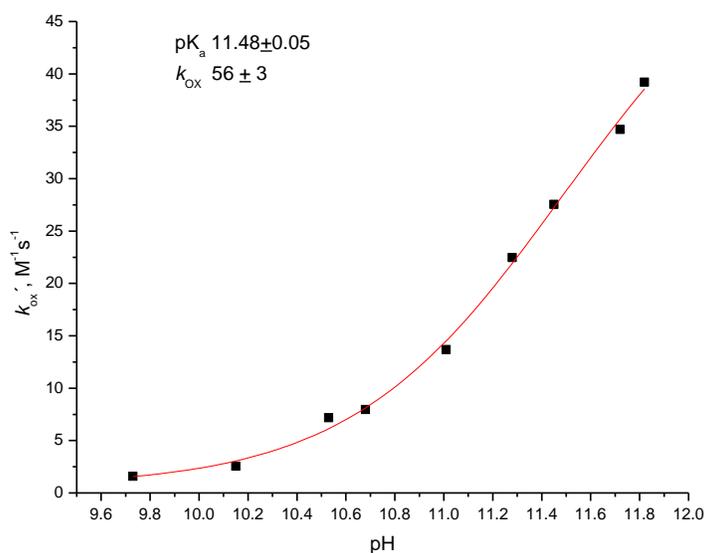


Figura 9.14 Determinación de la constante de oximinólisis, k_{ox} para Hdapam hacia el sustrato NFA. Datos de la tabla 9.10. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 29 del apéndice. $k_{ox} = 56 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $pK_a = 11.48 \pm 0.05$

Así, se puede calcular la constante de rapidez observada, debida al anión oximato dapam⁻ a cualquier valor de pH empleando la Ecuación 8:

$$k_{obs} = (56 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})[\text{dapam}^-] \quad \text{Ecuación 8}$$

El valor del pK_a cinético también es muy confiable por la misma razón, aunque es necesario mencionar que a medida que aumenta el pH el error en la determinación de los valores de k_{obs} es mayor.

Si incluimos estos valores para Hdapam en la Figura 3.5 (coordenadas de Brønsted, Figura 9.15) y la comparamos con otras oximas que se sabe se comportan como α -nucleófilos, se observa que efectivamente Hdapam pertenece a este grupo de nucleófilos y cae dentro de la zona de nivelación de la reactividad que se observa para otras oximas.

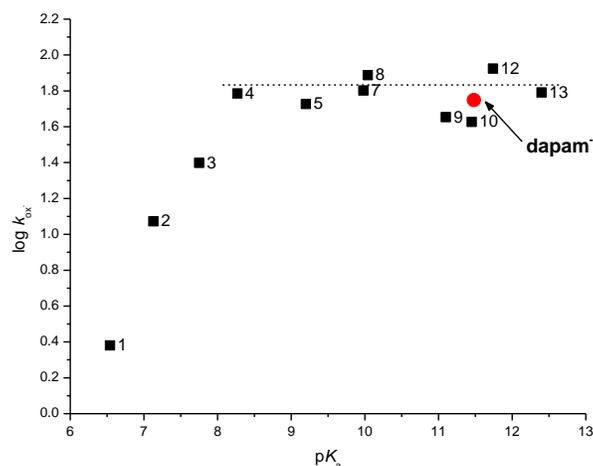


Figura 9.15 Comparación de la reactividad de la oxima Hdapam con otras oximas (Figura 3.5) en las coordenadas de Brønsted.

Finalmente, si analizamos estos resultados en términos de las especies presentes en disolución, todo indica que la especie $dapam^-$, proveniente de la desprotonación de Hdapam que tiene un pK_a de 11.48, es responsable de la hidrólisis del NFA.

Para ejemplificar este análisis, se tomarán los valores de k_{corr} de la Figura 9.2 a concentración fija del ligante, 0.1 mM, en función del pH. Primero, se calcula la concentración del anión $dapam^-$ del diagrama de especiación (Figura 9.16) empleando el valor del pK_w y los valores de pK_a obtenidos a partir de los estudios potenciométricos y espectrofotométricos. Luego, se sobreponen los datos de cinética con el diagrama de especiación para $dapam^-$.

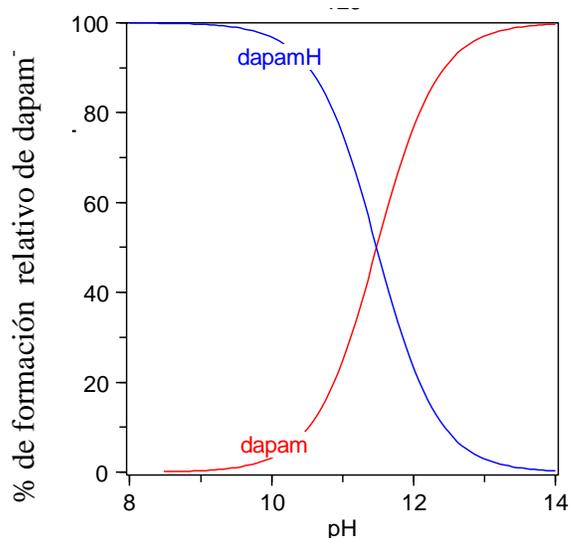


Figura 9.16 Diagrama de especiación en función del pH, calculado para $[Hdapam]_0$ 0.1 mM. Determinado con el pK_a de Hdapam en el programa *HySS 2009*.

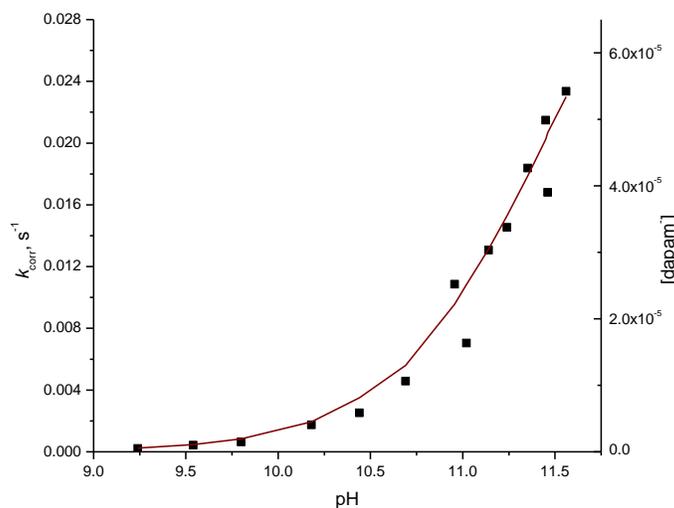


Figura 9.17 Constantes de rapidez observada en la hidrólisis de NFA función del pH. Los puntos corresponden a los valores de k_{corr} (tomados de la Figura 9.1). La línea continua representa la distribución de la especie $[dapam^-]$ en función del pH, para $[Hdapam]_0 = 0.1$ mM y $pK_a = 11.48$. La distribución de especies fue obtenida a partir de las constantes de la Tabla 8.3 con el programa *Hyss 2009*.

La Figura 9.17 muestra, la concentración de la especie $dapam^-$ calculada para Hdapam 0.1mM de en función del pH (eje derecho, línea continua) sobrepuesto

con las constantes de rapidez corregidas, k_{corr} en s^{-1} tomadas de la Figura 9.17 (eje izquierdo, puntos). De esta gráfica lo que resulta evidente es que hay una correlación entre las constantes de velocidad obtenidas y la concentración del anión oximato.

Posteriormente, se calculan las concentraciones exactas molares exactas del anión oximato a partir de la distribución de especies, $[\text{dapam}^-]$, a los valores de pH empleados para las determinaciones cinéticas y se grafican las constantes de rapidez obtenidas en función de la concentración del anión oximato calculada: k_{corr} en función de $[\text{dapam}^-]$, Figura 9.18. Como puede observarse esta dependencia es lineal, lo cual comprueba que la reacción es de primer orden para el anión oximato y la pendiente nos da el valor de la constante de segundo orden para el anión oximato libre, $k_{\text{ox}} = 56 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que concuerda con la constante obtenida de la dependencia del pH, Figura 9.14 y con la estimación de k_{ox} usando la Ecuación 4 modificada a partir de estos mismos datos cinéticos, $k_{\text{ox}} 48 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

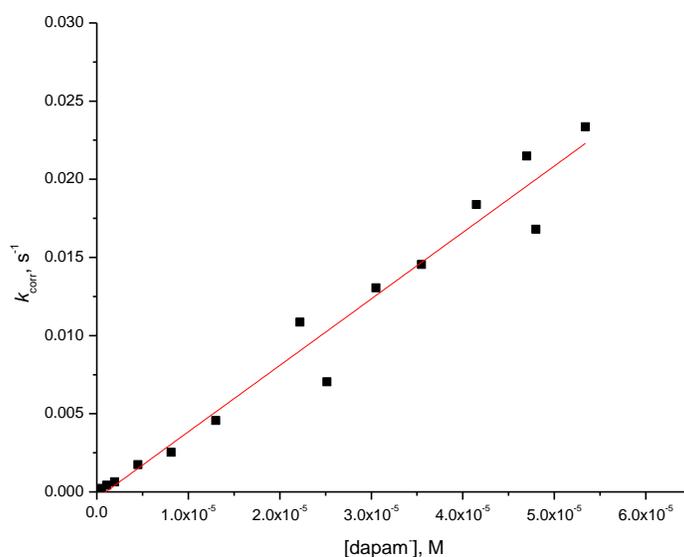


Figura 9.18 k_{corr} en función de la concentración de $[\text{dapam}^-]$. Los valores de $[\text{dapam}^-]$ fueron calculados desde la distribución de especies (Figura 9.16). $k_{\text{ox}} = 56 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Estos resultados son congruentes con el mecanismo de ruptura del NFA propuesto en la literatura para otras piridín oximas, [Breslow 1965, Suh 1992, 1984,

Yatsimirsky 1992, 1998], Figura 9.19. 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 NFA, con la consecuente ruptura del éster que da como productos la oxima desprotonada dapam acetilada y *p*-nitrofenol.
3. La hidrólisis del grupo acilo que se queda unido al oximato

Como para todos los experimentos realizados se observa la liberación de un equivalente de NF^- (0.04 mM), la ruptura del sustrato es completa incluso cuando dapam^- se encuentra a una concentración de 10^{-5} M, y la ruptura de NFA sucede bajo un régimen catalítico, donde la velocidad de desacilación de la oxima, posiblemente asistida por OH^- , es tan rápida que se regenera el nucleófilo y puede hidrolizar otra molécula de sustrato.

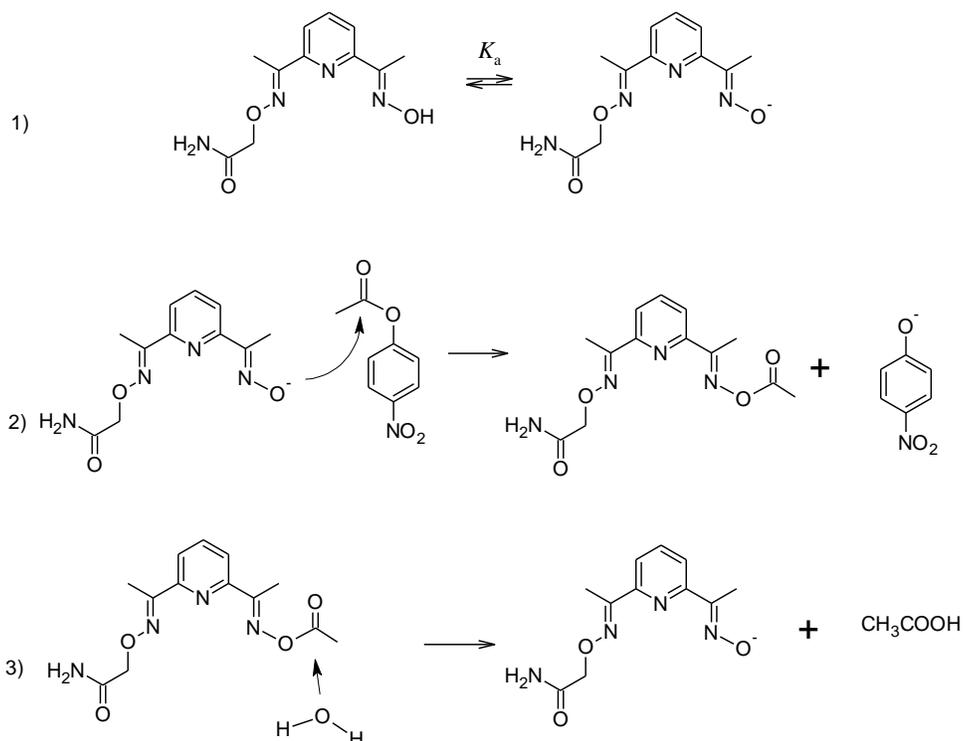


Figura 9.19 Mecanismo de ruptura del NFA propuesto en la literatura. [Breslow 1965, Suh 1992, 1984, Yatsimirsky 1992, 1998].

Comparación de la reactividad con el ligante disustituido Dapydam.

También se hizo un estudio que demostró que el ligante que se obtiene de la doble sustitución de la 2,6-diacetilpiridíndioxima con la 2-bromacetamida, Dapydam, no presenta reactividad esterolítica hacia NFA. Esto es lógico ya que no tiene en su estructura un grupo que sirva como nucleófilo. Los resultados obtenidos al variar la concentración de Dapydam a pH 10.9 se muestran en la Tabla 9.11 y Figura 9.20. De aquí resulta claro que no hay una dependencia de k_{obs} en función de la concentración de Dapydam, por tanto la hidrólisis corresponde únicamente a la contribución del medio. En conclusión el ligante Dapydam no tiene reactividad esterolítica

Tabla 9.11 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración de Dapydam en la esterólisis de NFA 0.04 mM en 10% de metanol en agua a pH 10.9, CAPS 50 mM, 25°C.

[Dapydam], M	k_{obs}, s^{-1}
0	2.52 E-3
2E-4	2.67 E-3
4 E-4	2.32 E-3
6 E-4	2.48 E-3
8 E-4	2.35 E-3
10 E-4	2.38 E-3
12 E-4	2.66 E-3

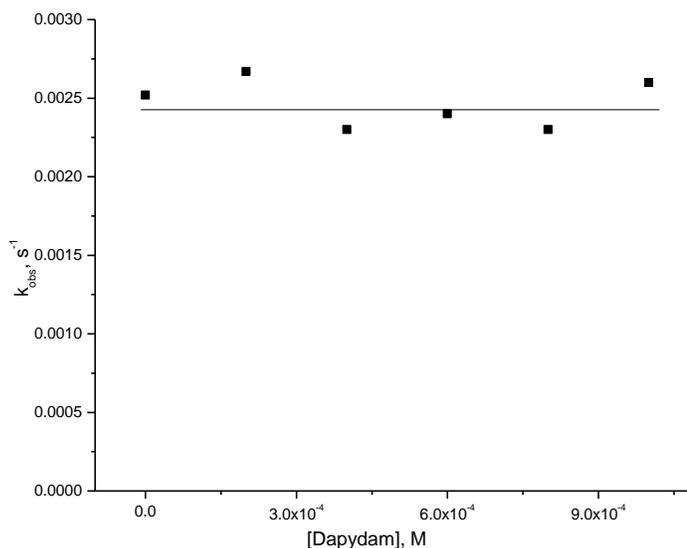
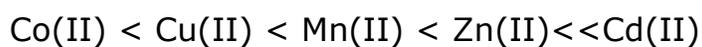


Figura 9.20 Dependencia de k_{obs} en función de la concentración del ligante Dapydam en la esterólisis de NFA. Condiciones de la tabla 10.3

Estudios cinéticos de la esterólisis de NFA en presencia de Hdapam catalizada con cationes metálicos

Se estudió la reactividad esterolítica de Hdapam en presencia de varios cationes divalentes, como Mn(II), Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II) y Cd(II), con los que se ha observado un efecto catalítico con otras oximas [Yatsimirsky 1998, Gómez-Tagle 2013] primero a una concentración fija del ligante, Hdapam 0.1 mM y a pH 7.0, pensando que al coordinarse el catión acidifica a la oxima y se ha observado que disminuye su pK_a por 2.5–6.5 unidades dependiendo del catión metálico; evidentemente el valor de pH 7.0 no es el óptimo para ninguno de los cationes metálicos, sin embargo es necesario evaluar si existe un efecto catalítico. Los experimentos se realizaron variando la concentración del catión entre 0.01-0.1 mM, fijando el pH con MOPS 100 mM, en un medio con 10% metanol acuoso a 25 °C. Las disoluciones de todas las sales de los metales divalentes fueron estandarizadas por complejometría y analizadas por absorción atómica para asegurarse que la concentración de metal añadida fuera la deseada.

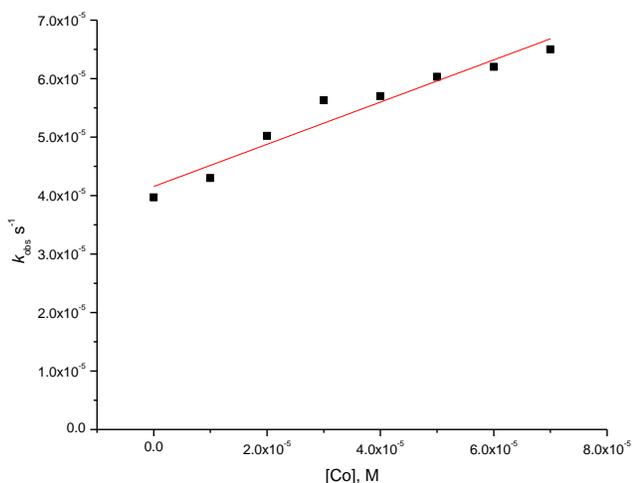
Las Figuras 9.21 A-G muestran la dependencia de k_{obs} en función de la concentración del catión metálico para 6 cationes en el orden: Co(II), Mn(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II) y Cd(II). De aquí podemos ver que: todos estos cationes metálicos, con la excepción de Ni(II) catalizan la esterólisis de NFA; como la dependencia es lineal, la reacción a estas condiciones es de primer orden y la pendiente de la recta nos proporciona una constante aparente $k_{MOx'}$ a pH 7.0. El orden de reactividad observado a este pH es:



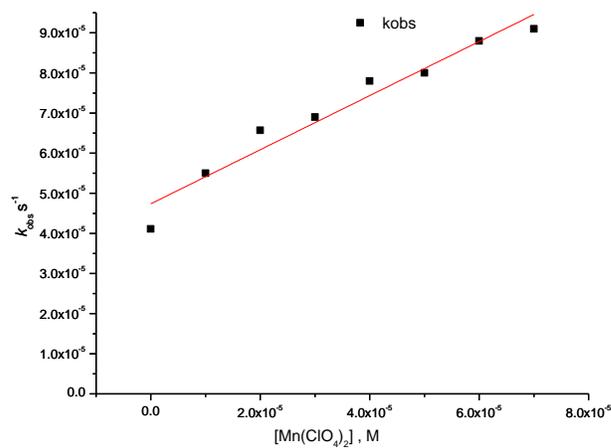
Por lo tanto, se puede pensar que los cationes que catalizan más eficientemente la esterólisis de NFA son Zn(II) y Cd(II), aunque no se haya trabajado a un valor de pH óptimo para cada catión metálico.

Esto puede deberse a varias razones: a que no se formen complejos igualmente estables con todos los cationes metálicos, que el ligante se coordine por el átomo

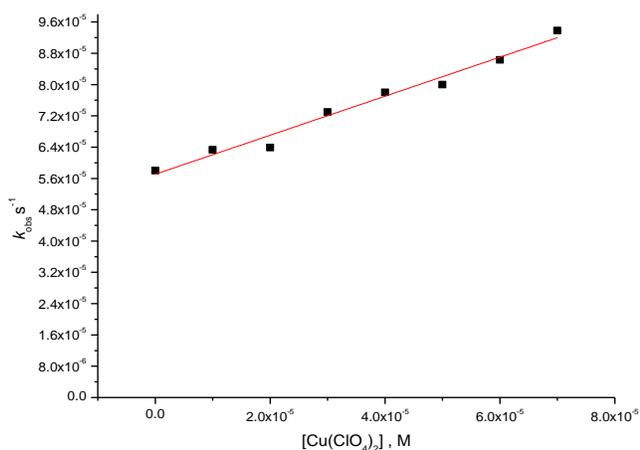
de oxígeno del anión oximato bloqueando el centro nucleofílico, a que no se esté trabajando a un pH óptimo para cada catión metálico, etc. Sin embargo, para el alcance de este trabajo se decidió que era más importante detallar los sistemas con Zn(II) y Cd(II) que tienen una reactividad mayor a la de los otros cationes, además de se han reportado grandes efectos catalíticos de estos cationes en la ruptura de NFA.



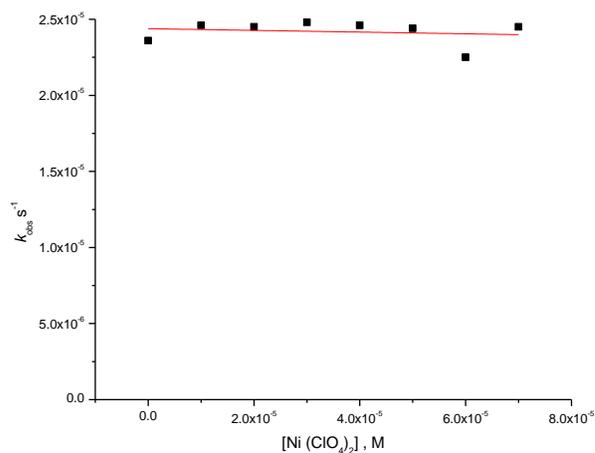
A



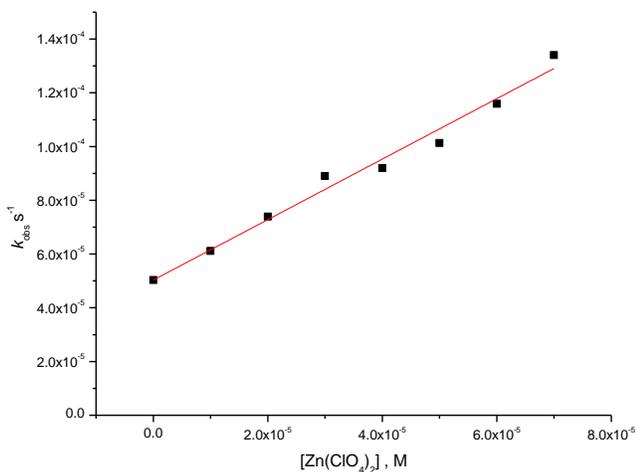
B



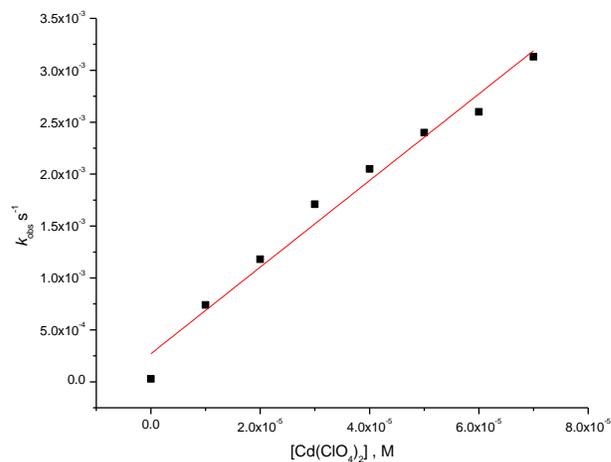
C



D



F



G

Figura 9.21 k_{obs} en función de la concentración del catión a pH 7.0, MOPS 100 mM, 10% de metanol en agua, 25°C, para los seis cationes divalentes. **A.** Co(II) $k'_{\text{ox}} = 0.36 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. **B** Mn(II) $k'_{\text{ox}} = 0.67 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. **C** Cu(II) $k'_{\text{ox}} = 0.49 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. **D.** Ni(II) no tiene efecto catalítico. **F.** Zn(II) $k'_{\text{ox}} = 1.12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. **G.** Cd(II) $k'_{\text{ox}} = 41.68 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

En el caso de Cu(II), Co(II) y Mn(II) la disolución se colorea muy ligeramente, verde, rojo y amarillo respectivamente, antes de agregar el sustrato, por lo que su estudio cinético se complica pues interfiere en la longitud de onda a la que se monitorea el NF^- (400 nm).

Para descartar que la razón de no observar un efecto catalítico esté relacionada con haber trabajado a un pH lejos del óptimo para cada catión, se varió el pH a una concentración 0.1 mM de Hdapam en relación equimolar para cada catión (Figura 9.22) hasta donde se observó precipitación del hidróxido metálico. Lo que se observa es que el efecto de los cationes Mn(II), Co(II), Ni(II) y Cu(II) sólo sobrepasan ligeramente la hidrólisis alcalina mientras que para Cd(II) y para Zn(II) se observa un valor de constante de rapidez corregida entre 100 y 10 veces mayor, respectivamente, a la hidrólisis alcalina de NFA. Las curvas esperadas son sigmoidales si la especie activa es el complejo 1:1 desprotonado, debe observarse un punto de inflexión en el valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ del complejo. Para Cd(II) se observa aproximadamente en pH 8.7, para Zn(II) aparentemente está en pH 8.5 y con los

demás cationes metálicos no se alcanza a observar antes de que precipite el hidróxido del metal. Esto puede deberse a que la constante de formación entre el ligante y el catión metálico es pequeña y la fracción que está complejada no es suficiente para prevenir la precipitación a pH por debajo de 9.0. Sin embargo, con los cationes Cd(II) y Zn(II) no se observa precipitación en un intervalo más amplio de pH lo cual permite obtener mayor información del sistema y lograr mayores efectos catalíticos.

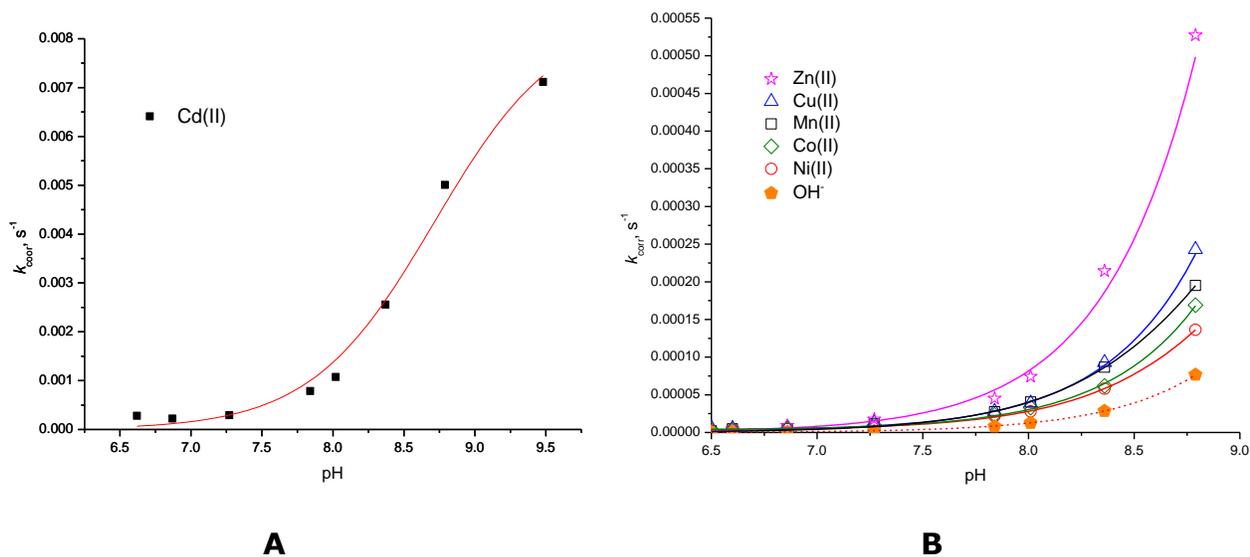


Figura 9.22 k_{corr} en función del pH para Hdapam 0.1 mM con 0.1 mM de metal **A)** para Cd (II) y **B)** para Mn(II), Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn (II).

10. Constantes de formación de los complejos Hdapam con Cd(II) y Zn(II)

Ya que la reactividad esterolítica del ligante Hdapam mostró los mayores incrementos en presencia de los cationes Zn(II) y Cd(II) (Figura 9.21), resulta interesante y necesario investigar cuáles son las especies presentes en disolución para analizar posteriormente la reactividad observada en función de estas especies.

Para determinar las constantes de formación de los complejos de Zn(II) y Cd(II) con Hdapam en disolución acuosa se realizaron titulaciones a diferentes condiciones (concentración y relación metal:ligante) empleando tres técnicas diferentes: RMN ^1H , potenciometría y espectrofotometría.

RMN ^1H

Se determinaron las constantes de asociación de Hdapam con ambos cationes, Cd(II) y Zn(II), mediante resonancia de protón en una mezcla de 25% de MeOD en D_2O a pH 3.77 en presencia de MES 25mM como amortiguador. Dado que a este pH el ligante se encuentra totalmente protonado, estas titulaciones nos permiten evaluar las constantes de asociación del catión metálico con el ligante protonado, ya que es el único equilibrio presente; además, nos permite analizar si el catión metálico se coordina a todos los grupos, pues se espera que los desplazamientos químicos se modifiquen más para los grupos que están más cercanos al sitio de coordinación. En las Figuras 10.1 y 10.2 se muestra como ejemplo una secuencia de espectros de RMN ^1H del ligante titulado con el metal para el caso de Cd(II): las señales de los protones de la piridina (Figura 10.1) y de los grupos metilo (Figura 10.2) titulados hasta la adición de 3 equivalentes del catión metálico. En ambos casos se observa que hay un desplazamiento de las señales hacia campo bajo por efecto de coordinación con el catión metálico, por lo tanto tanto los grupos oxima como el nitrógeno de la piridina deben coordinarse a

pesar de que el ligante sea neutro; esto es importante porque se esperaría que la coordinación sea mucho mejor con el ligante en su forma aniónica. Las señales del grupo metileno no se pudieron emplear pues están muy cercanas a la señal del agua y el error en el ajuste es grande y las señales de la amida no se observan.

En el caso de la titulación con Cd(II) las señales de los protones piridínicos, Figura 10.1, se puede observar que al alcanzar la concentración equivalente de Hdapam se define claramente un doblete que integra para dos protones y un triplete que integra para uno (espectro 19), estas señales se van definiendo al formarse el complejo ya que la estructura toma una geometría más rígida, con menos giros y grados de libertad. En el caso de los metilos y metilenos parecen solo sufrir un desplazamiento químico a campo más bajo, esto porque al formarse el complejo se necesita mayor energía para hacer el cambio de espín de los protones. En el caso de Zn(II), Figura 10.3, se puede observar un comportamiento similar para los metilos aunque las señales son más anchas y tienen menor definición. Para Zn(II) no se muestran los protones de la piridina ya que tampoco se definieron bien.

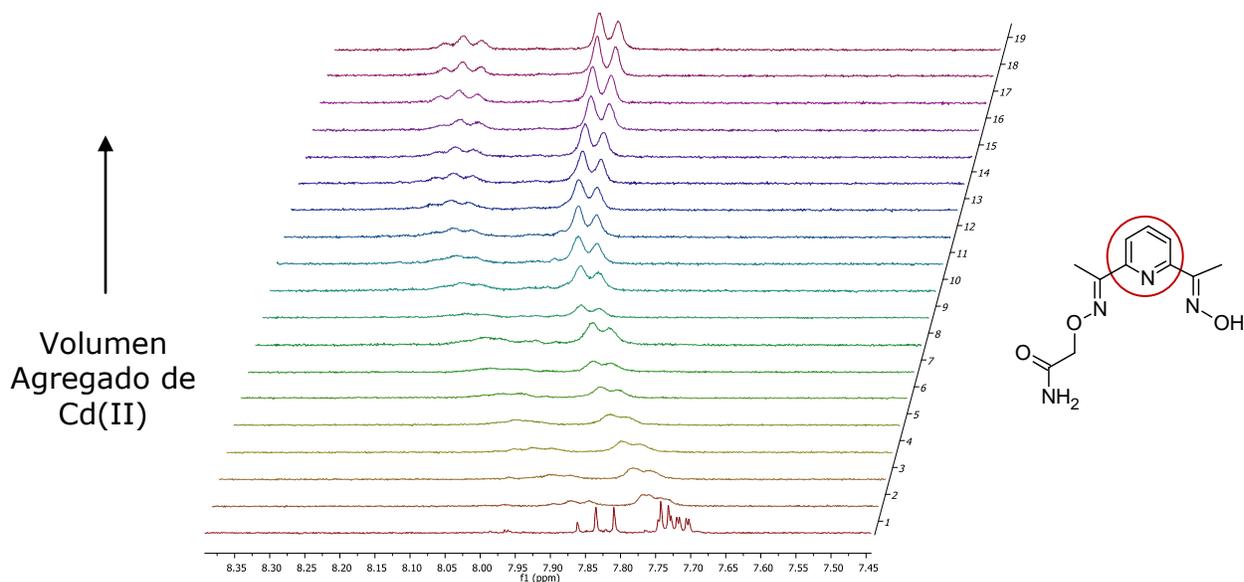


Figura 10.1 Espectros de la titulación por RMN ^1H de Hdapam 2.5mM con Cd(II) 1.0 M en D_2O , a pH 3.77 (MES 25 mM) en 20% de MeOD en D_2O . Región de los protones piridínicos.

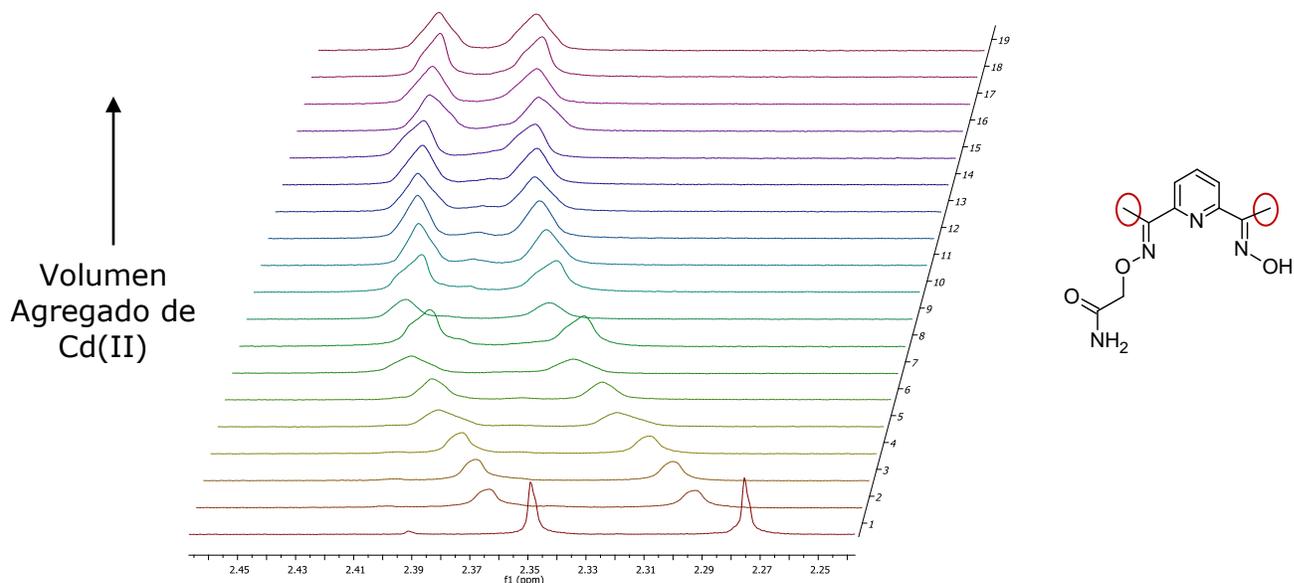


Figura 10.2 Espectros de la titulación por RMN ^1H de Hdapam 2.5mM con Cd(II) 1.0 M en D_2O a pH 3.77 (MES 25 mM) en 20% de MeOD en D_2O . Región de los protones de los metilos.

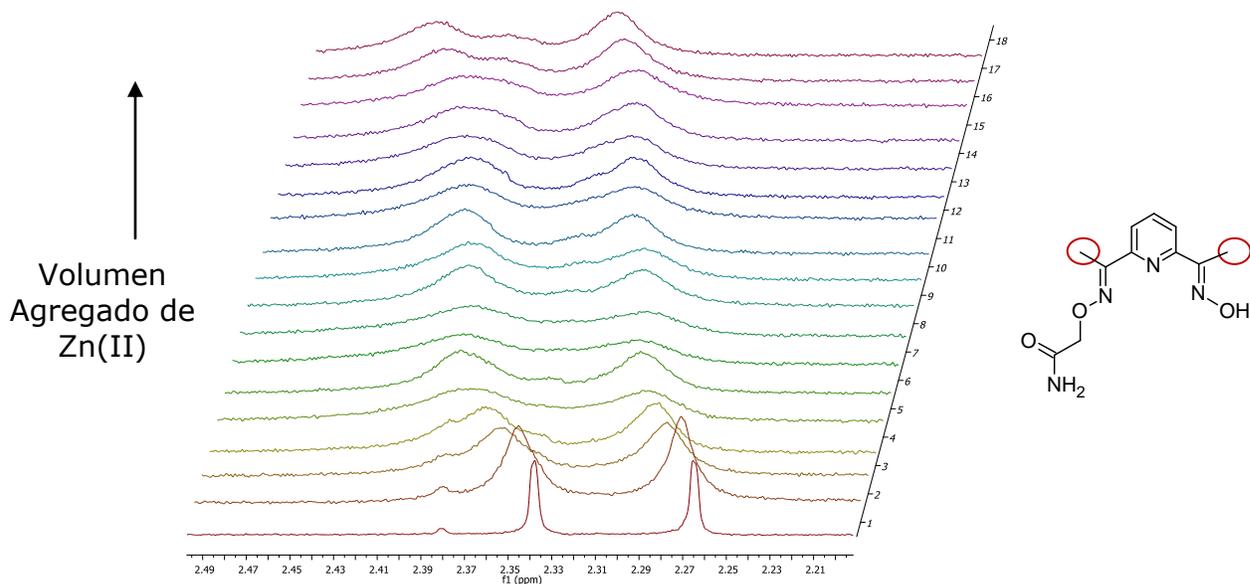


Figura 10.3 Espectros de la titulación por RMN ^1H de Hdapam 2.5mM con Zn(II) 1.0 M en D_2O a pH 3.77 (MES 25 mM) en 20% de MeOD en D_2O . Región de los protones de los metilos.

El desplazamiento de las señales se empleó para hacer un ajuste no lineal en función de la concentración del catión metálico usando un modelo de una isoterma de enlace 1:1 (ver Apéndice, ecuación 32) obteniéndose buenos ajustes. Para la

titulación con Zn(II) el valor de la constante de formación es muy pequeña lo cual se debe a que el ligante está totalmente protonado, $K_{ML} = 113 \pm 2 \text{ M}^{-1}$, Figura 10.4. La constante de formación para Cd(II) a ese valor de pH es tres veces mayor, pero también es pequeña, $K_{ML} = 331 \pm 6 \text{ M}^{-1}$, Figura 10.5.

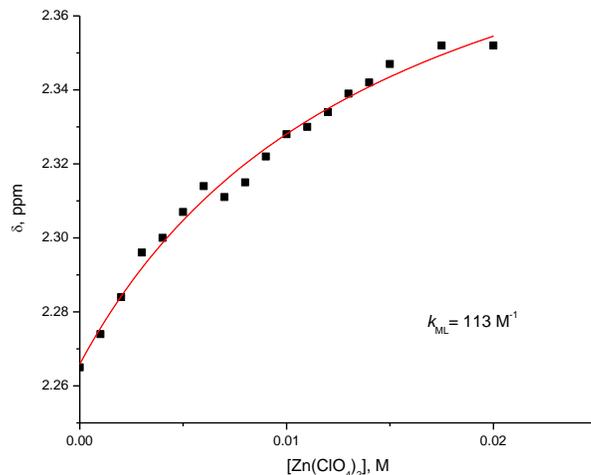


Figura 10.4 Titulación de Hdpam pH 3.77 con Zn(II) 1.0 M en D₂O. Desplazamiento en función de concentración añadida $K_{ML} = 113 \text{ M}^{-1} \pm 2$.

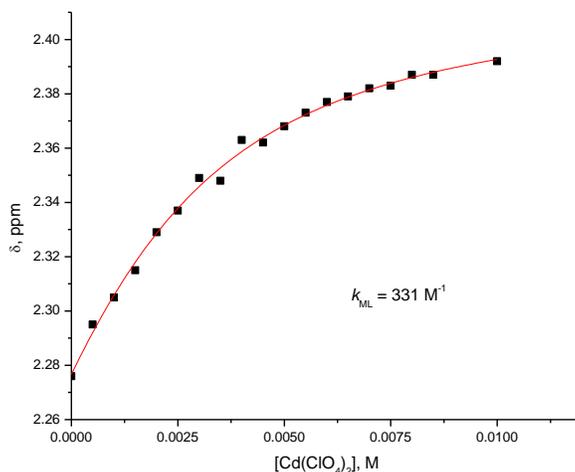


Figura 10.5 Titulación de Hdpam pH 3.77 con Cd(II) 1.0 M en D₂O. Desplazamiento en función de concentración añadida $K_{ML} = 331 \text{ M}^{-1} \pm 6$.

Espectrofotometría

En la primera parte, se realizaron titulaciones espectrofotométricas a concentración de ligante y pH fijos. El pH lejano al pK_a del ligante, para asegurar que Hdapam estuviera neutro. Así se determinaron las constantes de asociación entre el ligante neutro y los cationes metálicos, de acuerdo con la Figura 10.6. Se empleó como titulante una disolución concentrada y estandarizada del perclorato del catión metálico en agua, se fijó el pH empleando como amortiguadores MOPS o MES 100 mM (que no forman complejos con Zn (II) o Cd(II)) y se empleó un medio con 10% de metanol acuoso a 25°C.

De acuerdo a la Figura 9.22, el efecto catalítico con Cd(II) empieza a aparecer a pH mayor a 6.5 y con Zn(II) a pH mayor a 7.0. Por lo tanto, si se trabaja a pH 5.0 para Cd(II) y 6.9 para Zn(II) las especies que deberían existir en disolución son: el ligante libre, el catión metálico y el complejo 1:1 con el ligante protonado.

En las Figuras 10.7 y 10.8 se muestran titulaciones espectrofotométricas para Cd(II) y Zn(II), respectivamente, las cuales muestran el cambio de la absorbancia a pH fijo conforme se va adicionando la disolución estandarizada del catión metálico. Se puede observar que en ambos casos, se incrementa la absorbancia conforme se adiciona del catión metálico. El análisis de estos espectros a varias longitudes de onda permite calcular las constantes de formación, a estas condiciones, para ambos cationes metálicos.

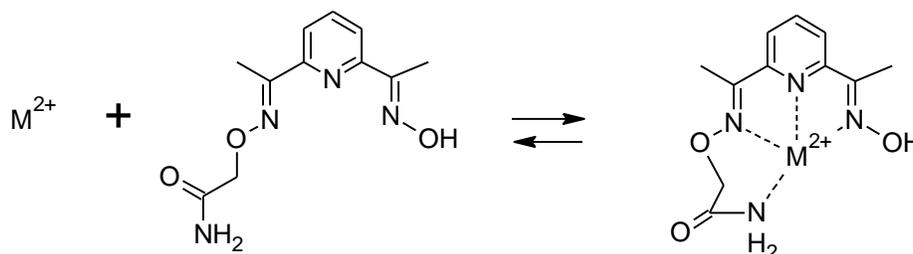


Figura 10.6 Equilibrio de formación del complejo entre Hdapam y M^{2+}

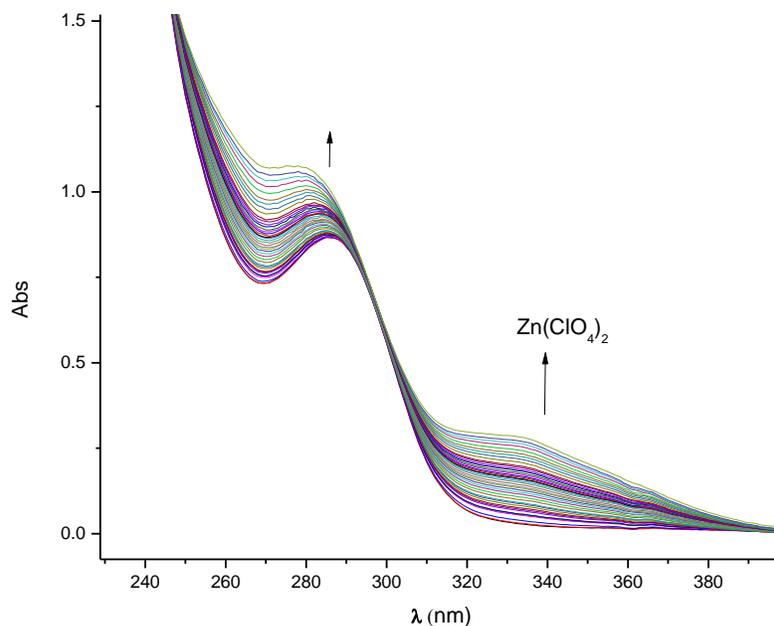


Figura 10.7 Titulación espectrofotométrica de Hdapam 1.0 mM con $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ 81.0 mM. MOPS 100 mM, pH 6.9, 10% de metanol en agua, 25°C, N_2 .

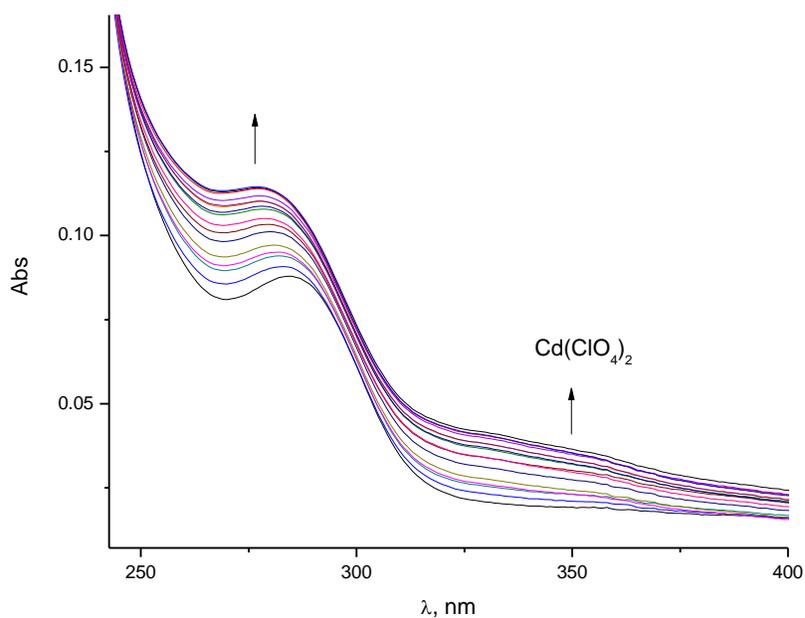
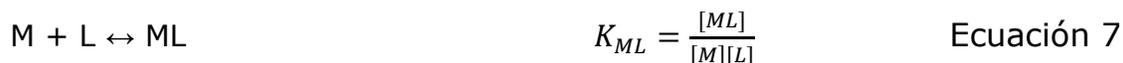


Figura 10.8 Titulación espectrofotométrica de Hdapam 0.1 mM con $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 100 mM. MES 100 mM, pH 5.0, 10% de metanol en agua, 25°C, N_2 .

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 metal:ligante de estequiometría 1:1. Este equilibrio se puede expresar por medio de la Ecuación 7 en donde se omiten las cargas para mayor claridad



En principio, estas tres especies pueden contribuir a la absorbancia de la disolución a cada longitud de onda, Ecuación 8. Sin embargo, a las condiciones de trabajo, se puede considerar que la contribución del catión metálico a la absorbancia, Abs_M , es cero a las longitudes de onda analizadas.

$$Abs_t = Abs_M + Abs_L + Abs_{ML} \qquad \text{Ecuación 8}$$

El ajuste de los datos de la concentración total de la sal del catión metálico agregado, $[Zn(ClO_4)_2]_0$ ó $[Cd(ClO_4)_2]_0$, en función de la absorbancia a cierta longitud de onda, se hizo mediante un ajuste no lineal en *Origin* a una expresión en la que se consideran el balance de masa para el catión metálico como función de la concentración total del catión metálico: Ecuación 9 [Schneider, Yatsimirsky 2000], en donde Abs_L es la absorbancia del ligante a esa longitud de onda; $\Delta\epsilon_{ML-L}$ es la diferencia en el coeficiente de absortividad molar del complejo y el ligante; $[L]_0$ es la concentración del ligante; $[M]_0$ es la concentración del metal y K_{ML} es la constante de equilibrio de formación del complejo (ver Apéndice).

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

Ecuación 9

En la Figura 10.9 se muestra un ejemplo de los ajustes realizados a varias longitudes de onda empleando los datos de absorbancia a una longitud de onda de 310 nm en la titulación de Hdapam con Zn(II), y los resultados de los ajustes a

otras tres longitudes de onda para Cd(II) y Zn(II) se resumen en la Tabla 10.1. En estas titulaciones se observa que, efectivamente, sólo está presente un equilibrio de formación (Figura 10.6). Los valores de las constantes de formación son mayores para Cd(II) que para Zn(II) y concuerdan razonablemente con los obtenidos mediante RMN ^1H .

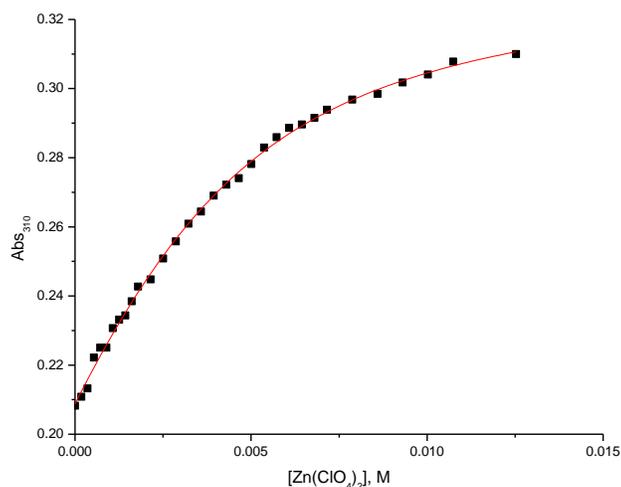


Figura 10.9 Ajuste de los datos a 310 nm de la titulación espectrofotométrica de Hdapam 1.0 mM con $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ 81 mM. MOPS 100 mM, pH 6.9, 10% de metanol en agua, 25°C, N_2 . La línea continua muestra el ajuste a la Ecuación 9.

Tabla 10.1 Constantes de formación de Hdapam con Cd(II) y Zn(II)

λ , nm	$\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (pH=5) $K_{ML} \pm ds$	$\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ (pH=7) $K_{ML} \pm ds$
268	247 ± 12	80 ± 5
285	341 ± 13	85 ± 3
310	374 ± 16	94 ± 4
335	410 ± 18	132 ± 6
Promedio	343 ± 18	98 ± 6
Log K_{ML}	2.53 ± 0.03	1.99 ± 0.04

Sin embargo, se observa cierta tendencia en las constantes a aumentar a mayores longitudes de onda lo cual podría reflejar la presencia de un equilibrio adicional. Por esta razón, el ajuste de los mismos datos se realizó en *Hyperquad* (partiendo

del valor obtenido en *Origin*) ya que este programa permite hacer iteraciones simultáneas a todas las longitudes en el intervalo 230-340 nm. El ajuste en *Hyperquad* (Figura 10.10) fue bueno para Cd(II) y nos dio un valor de $\log K_{ML}$ de 2.98. Para Zn(II) el ajuste no fue tan bueno, posiblemente porque al trabajar a un mayor valor de pH (7.0) puede existir una mayor fracción desprotonada del complejo que contribuye de forma diferente a la absorbancia de la disolución.

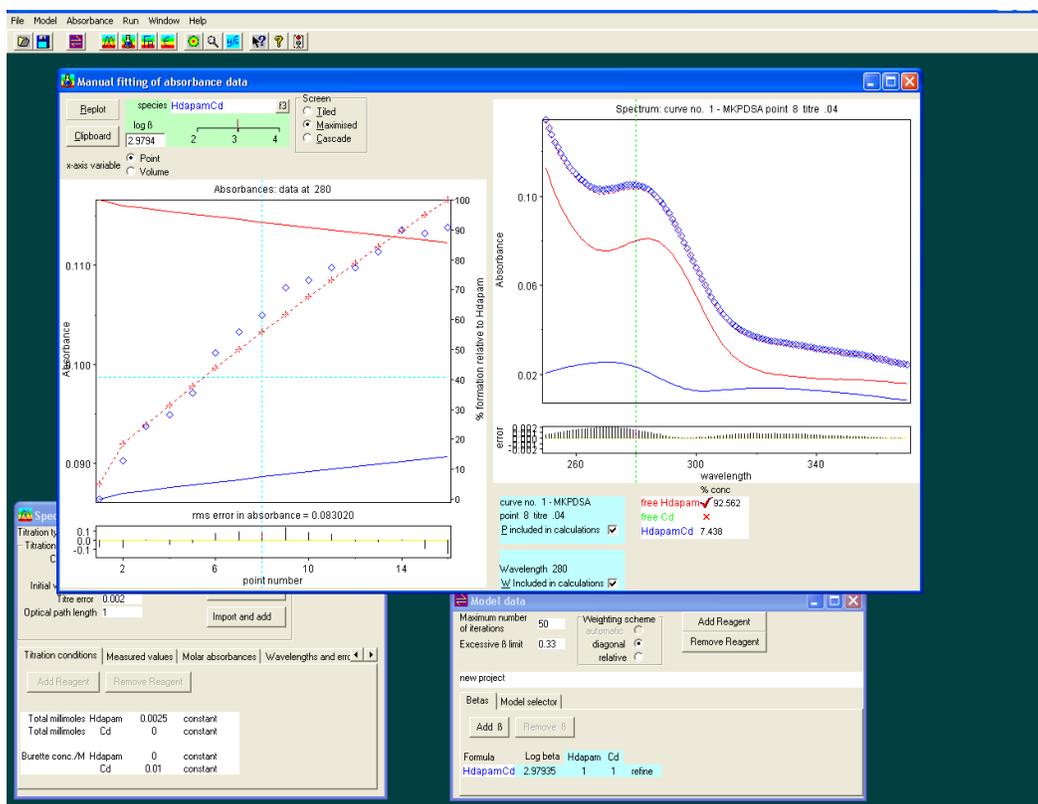


Figura 10.10 Ajuste de los datos de la titulación espectrofotométrica de Hdapam 0.1 mM con $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 100 mM. MES 100 mM, pH 5, 10% de metanol en agua, 25°C, N_2 .

El resumen de las constantes de formación del ligante neutro con Zn(II) y Cd(II) obtenidas por titulaciones espectrofotométricas y por RMN ^1H se muestran en la Tabla 10.2, y corresponden a la formación de complejos 1:1 para ambos cationes.

Tabla 10.2 Constantes de formación de Hdapam neutro con Cd(II) y Zn(II), 25°C, 10% metanol en agua.

Técnica	K_{ML}	
	Cd(II)	Zn(II)
Espectrofotometría	343±29	95±6
RMN 1H	331±6	113±2
Promedio	337±18	105±6
Log $K_{ML}(\text{promedio})$	2.52±0.02	2.02±0.02

11. Determinación del pK_a de los complejos de Hdapam con Cd(II) y Zn(II)

Para determinar los valores de pK_a de los complejos de Hdapam con Cd(II) y Zn(II) es necesario titular una mezcla en la que previamente se forme el complejo y se vaya desprotonando con la adición NaOH. Esto puede monitorizarse mediante espectrofotometría, registrando el espectro de UV-vis a cada valor de pH o bien mediante potenciometría, registrando el valor de pH a cada adición de NaOH. El intervalo de concentraciones que resulta adecuado para ambas técnicas es diferente, 10-100 veces más concentrado para potenciometría, y por lo tanto el grado de formación del complejo es diferente.

Espectrofotometría

Se hicieron titulaciones espectrofotométricas de mezclas equimolares del ligante y del catión metálico en concentración 0.1 mM y se titularon con NaOH estandarizada 0.56 M. Se registraron los espectros a cada pH y luego se obtuvieron, para diferentes longitudes de onda, curvas del cambio de la absorbancia en función del pH. Estas curvas se ajustaron empleando la Ecuación 4 para obtener el valor de pK_a de los complejos. En las Figuras 11.1 y 11.2 se muestran ejemplos de estos ajustes a una longitud de onda de 285 nm, de donde el valor de pK_a para el complejo de Zn(II) es de 7.96 ± 0.20 y para el complejo de

Cd(II) es de 9.01 ± 0.10 . Esto concuerda con lo mencionado en la sección anterior: a pH 5.0 el complejo de Cd(II) se mantiene totalmente protonado mientras que a pH 7.0 el 10% del complejo de Zn(II) ya está desprotonado.

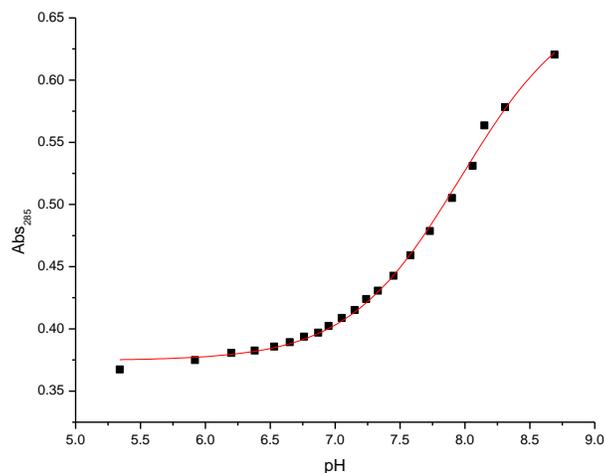


Figura 11.1 Ajuste de los datos de la titulación de Hdapam y Zn(ClO₄)₂ 0.1 mM con NaOH 0.56 M en 10% MeOH, 25°C, N₂. La línea continua muestra el ajuste a la Ecuación 4. $pK_a = 7.94 \pm 0.02$

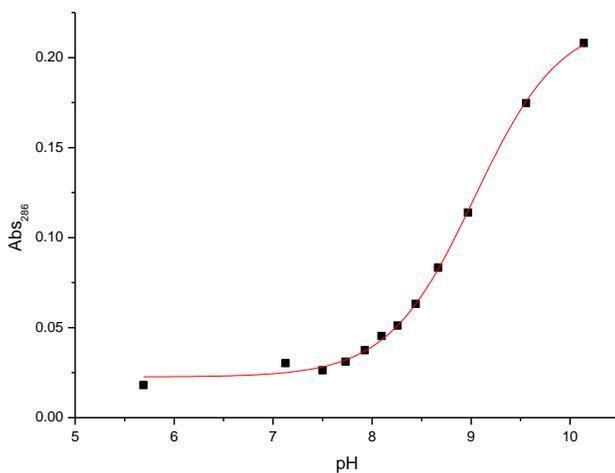


Figura 11.2 Ajuste de los datos de la titulación de Hdapam y Cd(ClO₄)₂ 0.1 mM con NaOH 0.56 M en 10% MeOH, 25°C, N₂. La línea continua muestra el ajuste a la Ecuación 4. $pK_a = 9.03 \pm 0.02$

En la Tabla 11.1 se reúnen los valores de pK_a determinados a diferentes longitudes de onda para Cd(II) y Zn(II). Se observa que la diferencia al cambiar la longitud de onda es pequeña y los valores promedio son 9.01 ± 0.06 para el complejo de Cd(II) y 7.96 ± 0.05 para el complejo de Zn(II).

Tabla 11.1 Logaritmos de las constantes de acidez de los complejos de Hdapam con Cd(II) y Zn(II) obtenidos de datos a diferentes longitudes de onda

λ , nm	CdHdapam ²⁺ $pK_{aML} \pm ds$	ZnHdapam ²⁺ $pK_{aML} \pm ds$
270	9.01 ± 0.02	7.96 ± 0.01
285	9.03 ± 0.02	7.94 ± 0.03
310	9.03 ± 0.02	7.96 ± 0.02
350	8.96 ± 0.05	7.98 ± 0.04
Promedio	9.01 ± 0.06	7.96 ± 0.05

Potenciometría

Se hicieron titulaciones potenciométricas preparando disoluciones que contenían una mezcla del metal y ligante en relación 1:1 a una concentración 2.5 mM y se titularon con NaOH estandarizado, pero fue necesario usar un 20% de metanol en la disolución para garantizar la solubilidad del ligante en el medio. Al final de la titulación se observa un precipitado del hidróxido del catión metálico, por lo que los datos se analizaron hasta donde no se observa precipitación. El análisis se hizo en *Hyperquad* empleando como parámetros conocidos el pK_w y el pK_a de Hdapam determinados anteriormente, y se calcularon los valores de constante de formación de los complejos 1.1 metal:ligante. Los resultados se resumen en la Tabla 11.2 junto con los resultados obtenidos de espectrofotometría.

En las Figuras 11.3 y 11.4 se muestran los ajustes de *Hyperquad* para las titulaciones potenciométricas de mezclas del ligante Hdapam 2.33 mM con Cd(II) y Zn(II) 2.5mM tituladas con NaOH estándar 0.211 M.

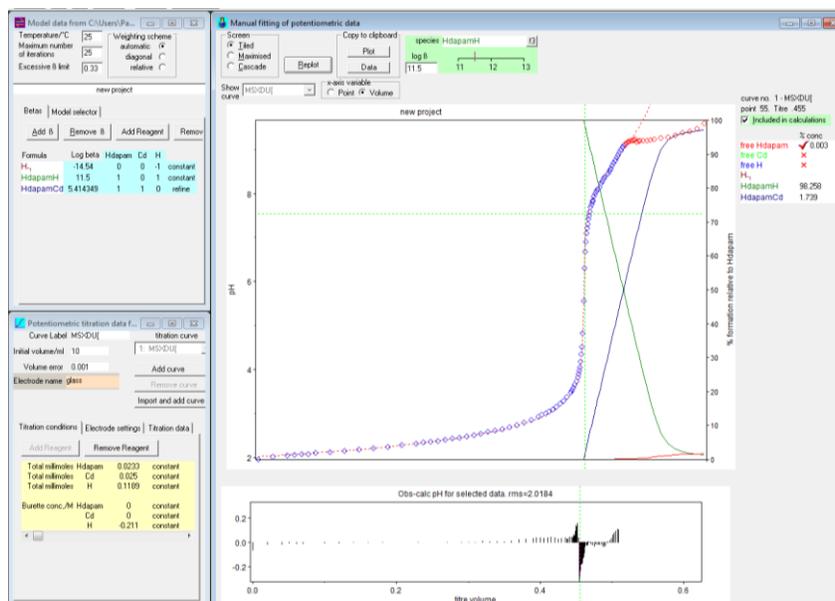


Figura 11.3 Ajuste de la titulación potenciométrica de Hdapam 2.33 mM y $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 2.5 mM en *Hyperquad* (imagen de pantalla al hacer el ajuste). NaOH 0.211 M, NaCl 100 mM, 25°C, bajo flujo de N_2 , 20% de metanol.

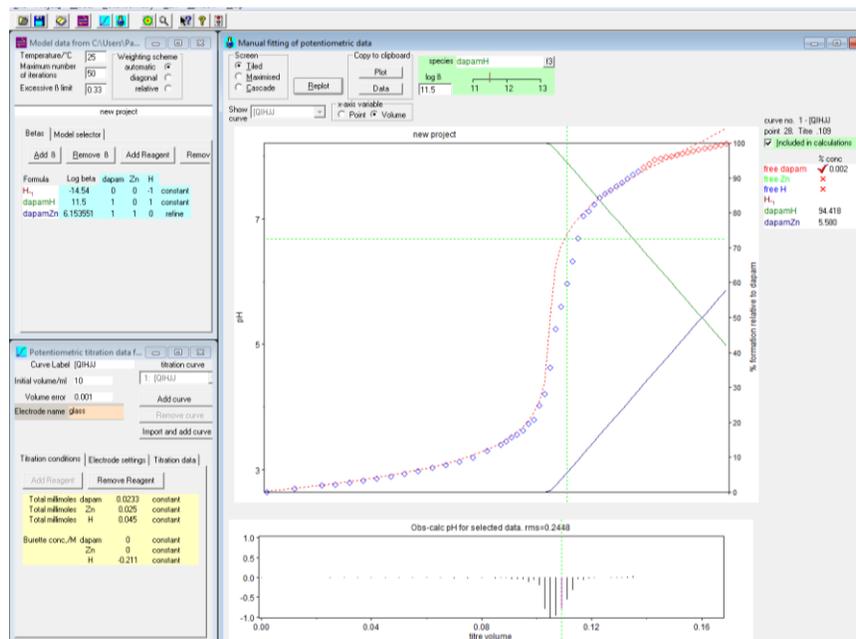


Figura 11.4 Ajuste de la titulación potenciométrica de Hdapam 2.33 mM y $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ 2.5 mM en *Hyperquad* (imagen de pantalla al hacer el ajuste). NaOH 0.211 M, NaCl 100 mM, 25°C, bajo flujo de N_2 , 20% de metanol.

Tabla 11.2 Resumen de los logaritmos de las constantes de disociación ácida para los complejos de Hdapam con Cd(II) y Zn(II)

Técnica	pK _a	
	Cd(II)	Zn(II)
Espectrofotometría (10% MeOH/ agua)	9.01±0.10	7.96±0.20
Potenciometría (20% MeOH/ agua)	8.84±0.35	7.59±0.5

En la Tabla 11.2 se observa que los valores de pK_a obtenidos por espectrofotometría y potenciometría difieren en sus valores. Esto se debe principalmente a que en las determinaciones se usaron medios con diferentes porcentajes de metanol 10 y 20%, pero la diferencia es razonable. En lo sucesivo, se usarán los valores obtenidos por espectrofotometría ya que los datos cinéticos fueron obtenidos en este mismo medio.

En la Tabla 11.3 se resumen los resultados de los equilibrios presentes en la disolución como los logaritmos de las constantes acumulativas de formación, log β, calculados con los valores de: promedios de pK_a's de Hdapam obtenidos por potenciometría y espectrofotometría, las constantes de formación de los complejos obtenidas por la titulación con metal seguidas por espectrofotometría y por resonancia de protón. Con estos datos es posible calcular en *Hyperquad* los valores del renglón 5, Tabla 11.3, que corresponden a la constante de formación consecutiva para el complejo desprotonado. También de las (Figuras 11.3 y 11.4) se puede analizar si existen otras especies, sin embargo y tal como se esperaba, se observa la formación de un sólo complejo 1:1 metal:ligante.

Tabla 11.3 Logaritmos de las constantes de formación acumulativas ($\log \beta$) para las especies en disolución acuosa de la Hdapam libre y de sus complejos con Cd(II) y Zn(II), a 25°C y fuerza iónica 0.1 M en 10% metanol en agua.

1	Especie	Log β	
		Cd(II)	Zn(II)
2	H ₂ dapam ⁺		H ⁺
3	Hdapam		1.37
4	MHdapam ²⁺	14.01	13.47
5	Mdapam ⁺	5.00 ^a	5.51 ^a
6	MOH ⁺	-10 ^b	-9 ^b

^a Calculados usando los pK_a de Tabla 11.2; ^b Martell, A. Stability Constants.

Finalmente, a partir de los valores para las constantes de formación acumulativas de la tabla anterior se pueden calcular las constantes para los equilibrios correspondientes a la formación de las especies presentes en disolución, Tabla 11.4. Aquí observamos que las constantes de formación de los complejos son mayores con el ligante aniónico que con el neutro. La desprotonación del complejo se asigna al grupo oximato pues los valores de pK_a de los complejos y de las especies cinéticamente activas (sección 10) coinciden y no existe otro grupo que se desprotona en el intervalo de pH 6.5-9.5.

Al comparar las constantes de la Tabla 11.4 es claro, que el complejo metal-oximato que se forma entre Cd(II) y dapam⁻ (renglón 2) es menos estable que el de Zn(II) (renglón 5) lo cual puede deberse al tamaño y acidez del catión. Además de que el complejo con Zn(II) es más ácido (renglón 6) que el complejo con Cd(II), (renglón 3). Ambas situaciones deben verse reflejadas en la reactividad de los complejos.

Tabla 11.4 Constantes de formación y acidez para los equilibrios de los complejos con Cd(II) y Zn(II) a 25°C , 10 % MeOH y fuerza iónica 0.1 M.

	Equilibrios de los complejos con Cd(II) y Zn(II)	Log k_{ML}	pK_a
1	$\text{Hdapam} + \text{Cd(II)} \rightleftharpoons \text{CdHdapam}^{2+}$	2.52	
2	$\text{dapam}^{-} + \text{Cd(II)} \rightleftharpoons \text{Cddapam}^{+}$	5.00	
3	$\text{CdHdapam}^{2+} \rightleftharpoons \text{Cddapam}^{+} + \text{H}^{+}$		9.01
4	$\text{Hdapam} + \text{Zn(II)} \rightleftharpoons \text{ZnHdapam}^{2+}$	2.02	
5	$\text{dapam}^{-} + \text{Zn(II)} \rightleftharpoons \text{Zndapam}^{+}$	5.51	
6	$\text{ZnHdapam}^{2+} \rightleftharpoons \text{Zndapam}^{+} + \text{H}^{+}$		7.96

12. Reactividad nucleofílica de Hdapam en presencia de Cd(II) y Zn(II)

Efecto de Cadmio

Se estudió la dependencia de la rapidez de esterólisis del NFA con respecto a la concentración de Cd(II) a diferentes valores de pH amortiguado (6.5-9.5), concentraciones del metal entre 0.01-0.10 mM y concentración fija de Hdapam 0.1 mM, en una mezcla 10% de MeOH/agua, NFA 0.04 mM a 25 °C. Para ilustrar el efecto catalítico del catión metálico la Figura 12.1 muestra un ejemplo de dos curvas cinéticas para la esterólisis del NFA con Hdapam 0.1 mM, en presencia y ausencia de Cd(II) 0.1 mM.

A continuación se muestran, los resultados de la variación de la concentración de Cd(II) a pH = 7.9, amortiguado con MOPS 100 mM, empleando Hdapam 0.1 mM, en un intervalo de concentración de Cd (II) de 0 a 0.14 mM. Se seleccionó ese valor de pH por dos razones: primero para asegurarnos de que la especie Cddapam^{+} estuviera presente (pK_a 9.04, Tabla 11.4) pero que no se encontrará presente dapam^{-} (pK_a 11.48, Tabla 11.3). Segundo, que los experimentos fueran medibles, ya que las velocidades aumentan significativamente al adicionar el catión y aun más al aumentar el pH.

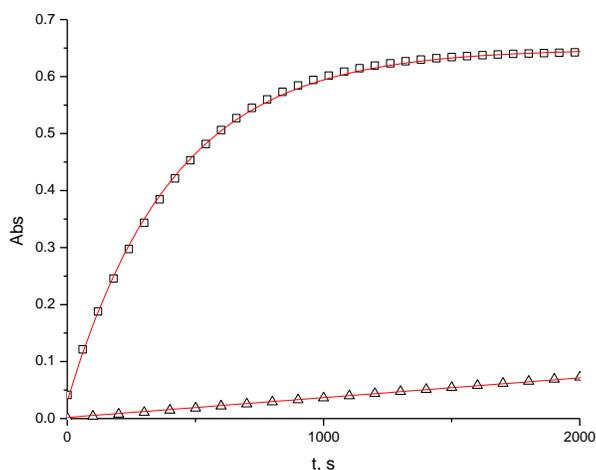


Figura 12.1 Efecto catalítico de Cd(II) en la hidrólisis de NFA 0.04 mM. Hdapam 0.1 mM, pH = 7.9, MOPS 100 mM. (□) curva cinética y su ajuste integral de primer orden (Ecuación 5) en presencia de Cd(II) 0.1 mM, $k_{\text{obs}} = 0.024 \text{ s}^{-1}$. (Δ) curva cinética y su ajuste lineal en ausencia de Cd(II), $k_{\text{obs}} = 0.000028 \text{ s}^{-1}$

Los datos de las curvas cinéticas obtenidas a diferentes concentraciones de Cd(II) se analizaron en *Origin* para obtener los valores de k_{obs} usando la Ecuación 5; estos valores se resumen en la Tabla 12.1 y se grafican en la Figura 12.2. Es de notar el gran incremento en la constante de rapidez que se observa en presencia de Cd(II) comparada con la suma de las contribuciones del ligante en su forma aniónica y el OH^- del medio a este pH ($2.8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). No se hacen correcciones de k_{obs} primero porque son muy pequeñas y segundo porque es la misma para todos los valores de concentraciones.

Tabla 12.1 Valores de k_{obs} obtenidos mediante el ajuste integral para cinéticas de primer orden (Ecuación 5) hidrolisis NFA, Hdapam 0.1 mM, $[\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2]_0$ variable.

Cd(II), M	$k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$	Cd(II), M	$k_{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
0	2.8×10^{-5}	8×10^{-5}	2.05×10^{-3}
2×10^{-5}	7.4×10^{-4}	1×10^{-4}	2.4×10^{-3}
4×10^{-5}	1.18×10^{-3}	1.2×10^{-4}	2.6×10^{-3}
6×10^{-5}	1.71×10^{-3}	1.4×10^{-4}	3.11×10^{-3}

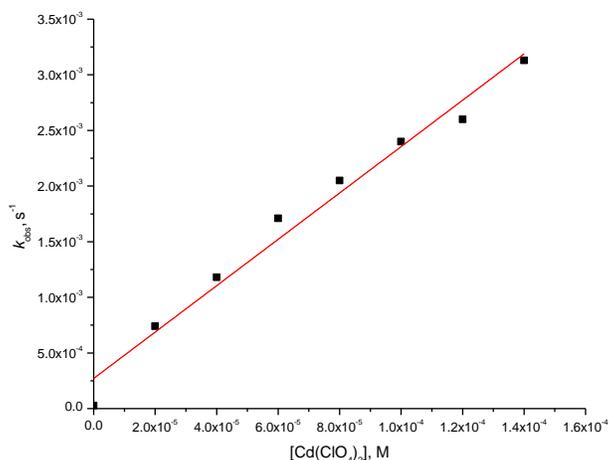


Figura 12.2 Gráfica de k_{obs} en función de la $[Cd(ClO_4)_2]_0$, a pH = 7.9. Hdapam 0.1 mM, MOPS 100 mM, en 10% MeOH/ agua, a 25 °C.

La Figura 12.2 nos muestra que la dependencia de la concentración del catión metálico es lineal, por lo que aparentemente es de primer orden respecto al complejo $Cddapam^+$ (sólo se forma un complejo 1:1) con una constante de reactividad de segundo orden de $21 \pm 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a este valor de pH.

Un aspecto adicional que es importante mencionar es que todas las curvas cinéticas se ajustan bien a un modelo cinético de primer orden, incluso cuando se usan concentraciones de Cd(II) menores a las del sustrato. En este caso, la única explicación razonable para que, aunque la concentración del complejo en disolución es menor que la del sustrato, la hidrólisis del sustrato sea completa (de acuerdo al valor esperado de absorbancia para 1 equivalente de NF^- producido), es que el complejo pueda desacilarse y operar de forma catalítica.

Del mismo modo que se procedió en los estudios de reactividad esterolítica del anión oximato, 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 la ayuda del programa *Hyss* usando las constantes de los equilibrios en disolución previamente establecidos.

De los diagramas de especiación, Figura 12.3, se puede apreciar que hasta pH 8.0 las especies predominantes en la disolución son el ligante protonado y hay menos del 5% en forma del complejo con el ligante neutro CdHdapam^{2+} . A medida que se aumenta el pH aumenta la fracción de Cddapam^{1+} ; además el cruce de las curvas para el complejo protonado y desprotonado se da en 9.0, lo cual es razonable porque el pK_a de esa especie se calculó en 8.9.

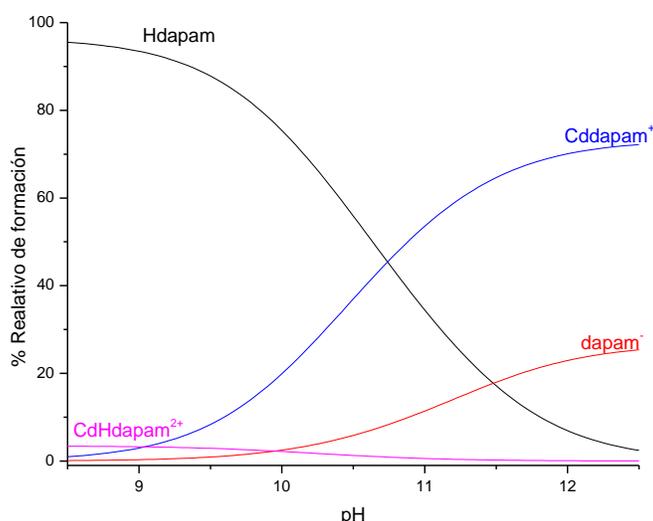


Figura 12.3 Diagrama de especiación en función del pH, calculado para Hdapam y Cd(II) 0.1 mM usando las constantes de la Tabla 11.4.

La Figura 12.4 muestra el gráfico de la distribución de la especie $[\text{Cd}(\text{dapam})]^{1+}$ en el eje del lado derecho en función de $[\text{Cd}(\text{II})]_0$, sobrepuesto con las constantes de rapidez observada, $k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$, 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 $[\text{Cddapam}]^{1+}$, ya que se observa la misma tendencia.

Para hacer esto de forma cuantitativa, se graficaron las constantes de rapidez observada, $k_{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$, en función de la concentración del complejo desprotonado, $[\text{Cddapam}^{1+}]$, Figura 12.5. De aquí se obtiene una correlación lineal, lo cual indica que la reacción es de primer orden para el complejo y por lo tanto la pendiente es la constante de oximinólisis, k_{MOx} , que refleja la reactividad intrínseca del

complejo; tiene un valor de $k_{MOX} = 1011 \pm 36 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor es mucho mayor que los obtenidos para otros complejos oximato reportados en la literatura.

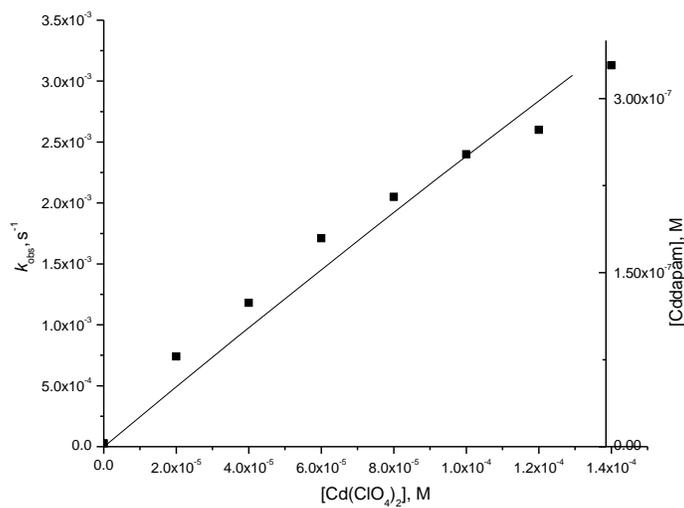


Figura 12.4 Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} y la línea continua representa la distribución de la especie $[\text{Cddapam}]^{1+}$.

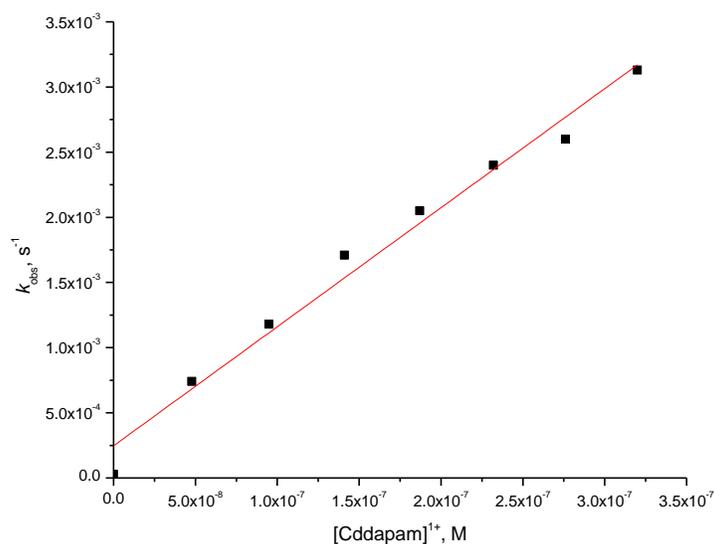
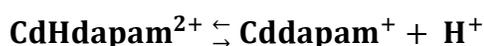


Figura 12.5 Constantes aparentes, k_{obs} en función de la concentración del complejo $[\text{Cddapam}]^{1+}$, a pH = 8.0, CAPS 100 mM 0.1 mM de Hdapam, 10% de MeOH/ agua, a 25°C. La línea continua representa el ajuste lineal de la correlación con la concentración de $[\text{Cddapam}]^{1+}$. $k'_{MOX} = 1011 \pm 36 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La reactividad en presencia de Cd(II) también se estudió en función del pH, a una relación metal: ligante 1:1, Cd(II) y Hdapam 0.1 mM (NFA 0.04 mM, MOPS 50 mM, 10% de metanol en agua, 25°C) haciendo por triplicado los experimentos. En la Figura 12.6 se muestra el gráfico de k_{obs} en función del pH. Directamente de este gráfico se puede estimar el pK_a de la especie cinéticamente activa (Ecuación 4b) que en este caso es de 8.97 ± 0.09 , que es muy cercano al obtenido propiamente como constante de disociación ácida para $Cd(Hdapam)^{2+}$ y tiene un valor de 9.01.



$$pK_a = 9.01$$

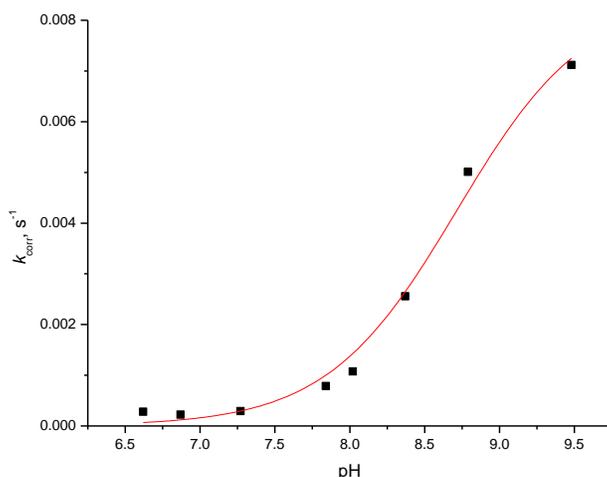


Figura 12.6 Constantes de rapidez observadas, k_{obs} en función del pH. Hdapam y Cd(II) ambos 0.1 mM, NFA 0.04 mM, MOPS 100 mM, 10% de metanol en agua, 25°C. La línea continua muestra el ajuste no lineal de los datos con la Ecuación 4b. El pK_a de la especie cinéticamente activa 8.97 ± 0.06

Sin embargo, estos resultados también deben ser comparados con la distribución de especies a las condiciones empleadas en cinética. Esta comparación se muestra en la Figura 12.7, donde se grafica la concentración de la especie $[Cddapam]^{1+}$ en el eje del lado derecho y las constantes de rapidez observadas, k_{obs} en el eje del lado izquierdo en función del pH.

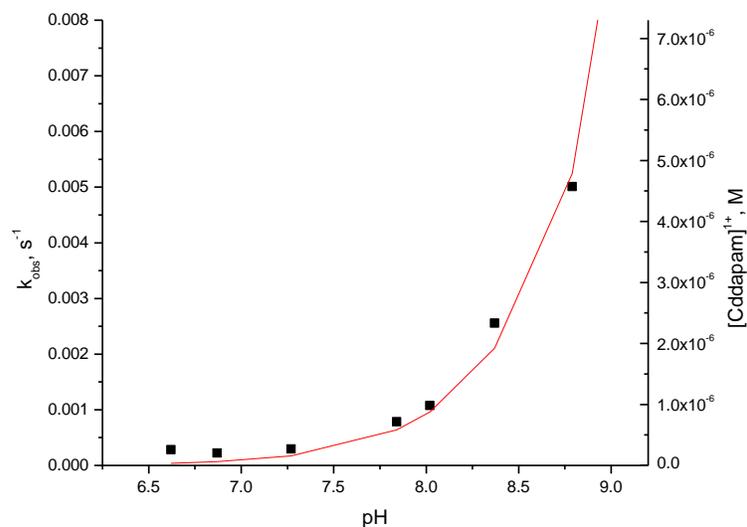


Figura 12.7 Constantes de rapidez observadas, k_{obs} , y $[Cddapam^{1+}]$ en función del pH. Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} . La línea continua representa la distribución de $Cddapam^{1+}$ en las mismas condiciones de las cinéticas.

Como se puede observar, los mayores valores de k_{obs} se obtuvieron a pH 9 ya que a valores mayores a pH 9.6 se observó que comenzaba a formarse un precipitado ($M(OH)_2$). Haciendo un promedio de las constantes k_{MOX} para $Cddapam^{1+}$ (Figura 12.8), tomadas de las dependencias de k_{obs} en función de la concentración del catión metálico a pH fijo (Figura 12.5), como de la dependencia del pH a concentraciones del ligante y metal fija (Figura 12.6), se obtiene una recta con una pendiente y valor de $k_{MOX} = 1050 \pm 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor de k_{MOX} , que atribuimos al complejo $Cddapam^{1+}$, resulta realmente enorme comparado con la reactividad esterolítica de la Hdapam libre ($k_{OX} = 56 \pm 3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y con la reactividad de otros complejos de cationes divalentes hacia NFA, y es comparable con los valores enzimáticos reportados para la hidrólisis de NFA lo cual es un resultado sobresaliente de este estudio.

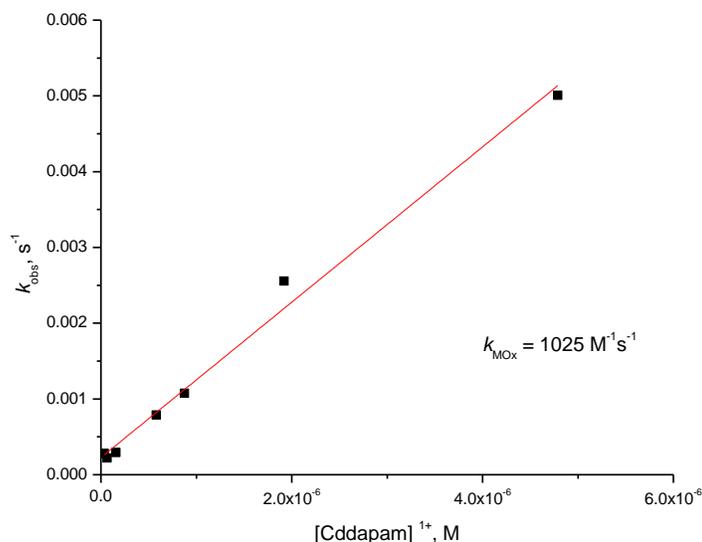


Figura 12.8 Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} , tomada de las dependencias de la concentración de metal y pH, en función de $[Cddapam^+]$. La línea representa el ajuste lineal y la pendiente la constante de segundo orden para $Cddapam^{1+}$ $k_{MOx} = 1050 \pm 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Si se piensa que el papel del Cd(II) al coordinarse con la Hdapam 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 de reactividad entre el oximato libre y el complejo con Cd(II) es de alrededor de 18 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.

Efecto de Zinc

Se estudió la dependencia de la rapidez de hidrólisis del NFA con respecto a la concentración de Zn(II), de manera análoga al efecto con Cd(II): variando el pH, y a una concentración fija de Hdapam y Zn(II), y también se hicieron experimentos variando la concentración total de Zn(II), fijando el valor de pH y la concentración de Hdapam. Para los experimentos con Hdapam 0.1 mM, a pH=8.0, se varió la concentración de Zn(II) en el intervalo 0 a 0.14 mM; este intervalo de concentraciones es mayor que para el Cd(II) ya que se ha observado para otros sistemas que la reactividad en presencia de Zn(II) es menor que en presencia de Cd(II).

Todas las curvas de absorbancia en función del tiempo se ajustaron con la Ecuación 5, método integral, para determinar los valores de k_{obs} , (Figura 12.9), y por la diferencia entre los valores en presencia y ausencia de Zn(II) no fue necesaria una corrección por la contribución del medio.

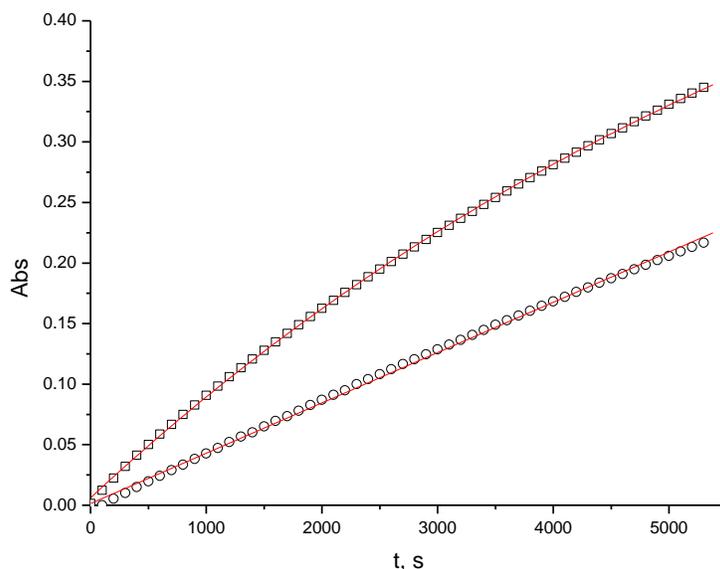


Figura 12.9 Reactividad esterolítica en ausencia de Zn(II) (o) y en presencia de Zn(II) 0.1 mM (□). pH=8.0, MOPS 100 mM, Hdapam 0.01 mM a 25°C y 10% de MeOH / agua.

De la recta obtenida en la Figura 12.10, la constante aparente, k'_{ox} , que tiene un valor de $1.13 \pm 0.06 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.95. Esta constante es menor que para el Cd(II),

sin embargo, como es proporcional a la cantidad de complejo presente a este valor de pH no refleja la reactividad intrínseca del complejo.

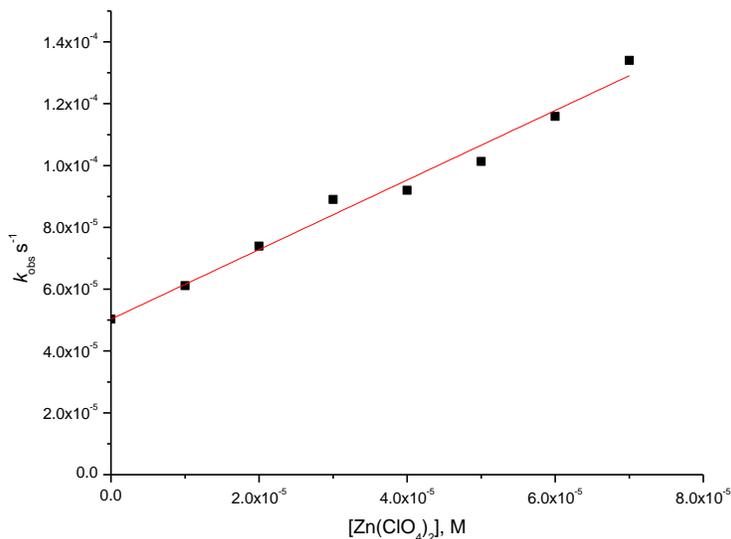
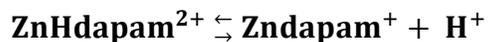


Figura 12.10 Gráfica de k_{obs} en función de la $[Zn(II)]_0$, a pH = 7.95, Hdapam 0.1 mM, MOPS 100 mM, 10% de MeOH / agua, 25 °C. $k'_{ox} = 1.13 \pm 0.06 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Posteriormente se hicieron mediciones por triplicado experimentos donde se fijó la concentración de Hdapam y Zn(II) en 0.1 mM y se varió el pH (Figura 12.11). El ajuste de estos datos a la Ecuación 4b nos da un valor de pKa de 8.0 ± 0.2 que concuerda razonablemente con el obtenido a partir del estudio de los equilibrios en disolución. Este valor de pKa es muy cercano al calculado a partir de las constantes de equilibrio:



$$pK_a = 8.1 \pm 0.02$$

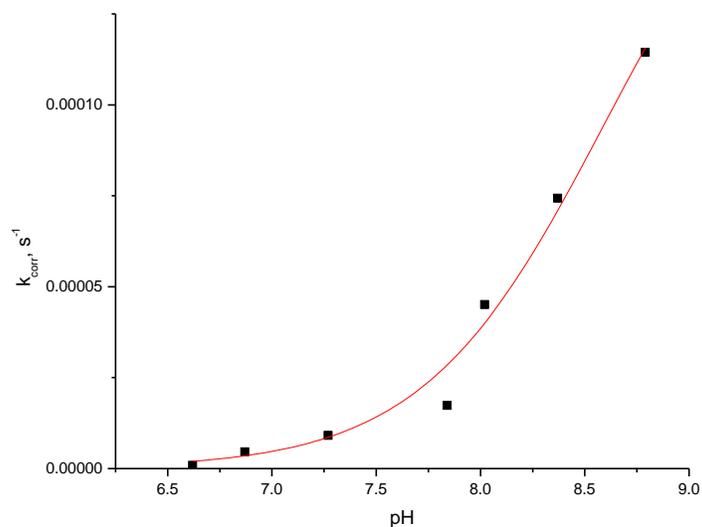


Figura 12.11 Valores de k_{corr} en función del pH con Hdapam y Zn(II) ambos 0.1 mM en 10% MeOH/ agua, 25 °C. El ajuste a la Ecuación 4b permite estimar el pKa de la especie cinéticamente activa en 8.03 ± 0.2 .

Para analizar estos datos en conjunto, a partir de las constantes de la Tabla 11.4, se realizó el diagrama de especiación para Hdapam y Zn(II) Figura 12.12 y se sobrepuso el diagrama para la especie Zndapam^+ (eje derecho) con las constantes de rapidez observadas (eje izquierdo), Figura 12.13. De aquí es claro que siguen una misma tendencia.

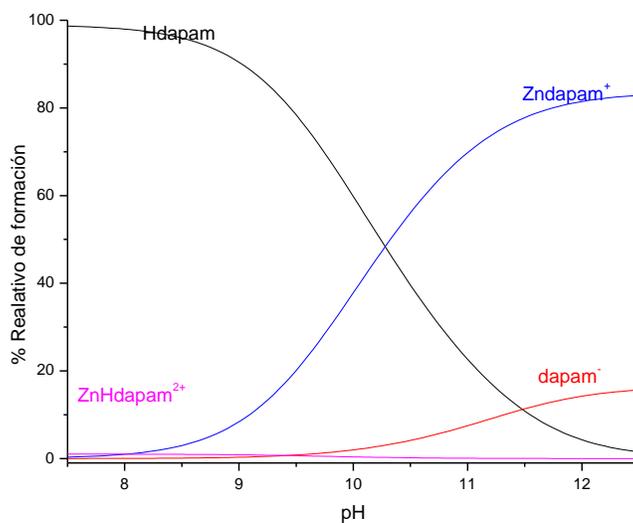


Figura 12.12 Diagrama de especiación en función del pH calculado para Hdapam y Zn(II) 0.1 mM.

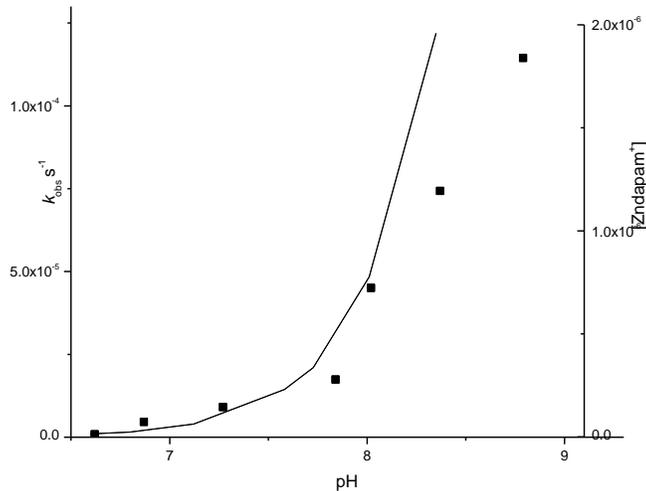


Figura 12.13 Constantes de rapidez observadas, k_{obs} , y $[Zndapam^{1+}]$ en función del pH. Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} . La línea continua representa la distribución de $Zndapam^{1+}$ en las mismas condiciones.

Posteriormente, se tomaron los datos de k_{obs} obtenidos de las dependencias de la concentración en función del pH, se graficaron en función de la concentración de $[Zndapam^{1+}]$, para obtener k_{Mox} (Figura 12.14). La constante de oximinólisis, calculada del valor de la pendiente de la recta, tiene un valor de $k_{Mox} = 215 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para el complejo con Zn(II). Por lo tanto, la reactividad intrínseca es casi 5 veces menor para el complejo de Zn(II) que para el complejo de Cd(II).

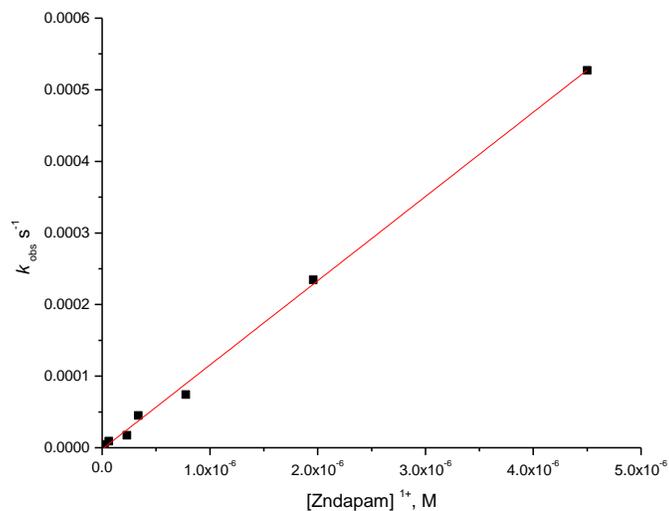


Figura 12.14 Los datos corresponden a valores de k_{obs} . La línea representa el ajuste lineal y la pendiente la constante de segundo orden $Zndapam^{1+}$, $k_{Mox} = 215 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Finalmente, las reactividades intrínsecas y los logaritmos de las constantes de acidez promedio de los complejos de interés se resumen en la Tabla 12.2.

Tabla 12.2 Logaritmos de las constantes de acidez y constantes de velocidad de segundo orden para el ligante Hdapam y sus complejos de Cd(II) y Zn(II) en la esterólisis de NFA a 25°C en 10% de metanol acuoso.

Especie	$k_{ox} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	pK_a
OH ⁻	14.57	---
Dapam ⁻	58 ± 3	11.48
Cddapam ⁺	1050 ± 40	9.01
Zndapam ⁺	215 ± 10	7.96

De esta tabla podemos decir que el ligante Hdapam se comporta como un α -nucleófilo frente a la hidrólisis del NFA, y tiene una constante de segundo orden, 3 veces mayor que la del OH⁻. Se puede apreciar que la reactividad esterolítica aumenta considerablemente para los complejos de Cd(II), 20 veces, y Zn(II), 4 veces con respecto al anión oximato. De hecho, los efectos catalíticos que observamos son tan grandes que no pueden atribuirse simplemente a la disminución del pK_a por la coordinación del metal y a tener una mayor fracción de nucleófilo desprotonado a menor valor de pH. Además no se observa una disminución de la nucleofilia debida a la coordinación del par electrónico adyacente al centro nucleofílico, como se podría haber pensado.

13. Resumen y análisis global de resultados

El primer reto de este trabajo consistió en la síntesis del ligante. Después de varias reacciones a diferentes condiciones se logró obtener, un 60% del producto de interés Hdapam, un 5% del ligante disustituido Dapydam y un 35% del precursor H₂dpd que se puede recuperar después de hacer una separación mediante cromatografía por columna.

Posteriormente se demostró que Hdapam se comporta como un α -nucleófilo (Figura 9.15), mientras que Dapydam no tiene reactividad nucleofílica en la hidrólisis de NFA (Figura 9.20). Al comparar el comportamiento del el ion oximato de Hdapam con otros aniones oximato, encontramos que cae dentro de la zona de nivelación. Sin embargo, cuando Hdapam se coordina con cationes metálicos da una disminución de su pK_a sin pérdida de la reactividad, más aún, la reactividad de sus complejos es mayor que la del anión oximato.

Se hicieron estudios de los equilibrios que presenta Hdapam en disolución para determinar el pK_a de la oxima (a partir de titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas). Posteriormente se estudio la hidrólisis del NPA con Hdapam, para demostrar que es un alfa nucleófilo. Este estudio ayudó a corroborar el valor de pK_a determinado por otras técnicas, y al relacionar las constantes observadas con la concentración de dapam⁻ (del diagrama de distribución de especies) se corrobora que el ion oximato es el responsable de la hidrólisis del NFA como se observa en la Figura 9.18. También se observó que la hidrólisis ocurre bajo un régimen catalítico a pH básico, ya que en algunas condiciones experimentales se tenía al nucleófilo en una concentración hasta 80 veces menor (5×10^{-7} M) que la del sustrato NFA (4×10^{-5} M), Figura 9.18.

En presencia de cationes metálicos se encontraron efectos catalíticos con varios cationes metálicos. Esta reactividad sigue el orden: Co(II) < Cu(II) < Mn(II) <

Zn(II) \ll Cd(II), y los efectos más grandes se observaron para Zn(II) y Cd(II). Para estos dos últimos cationes se identificaron las especies cinéticamente activas que son en ambos casos los complejos 1:1 con el ligante desprotonado. Mediante los estudios de equilibrios en disolución, se asignó la reactividad intrínseca a cada una de estas especies, Tabla 12.2. En la Figura 13.1 se muestran las estructuras propuestas para los complejos de Zn(II) y Cd(II).

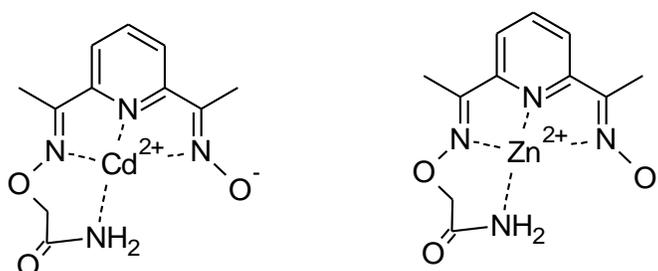


Figura 13.1 Estructuras propuestas para los complejos cinéticamente activos de Hdapam con Cd(II) y Zn(II).

La primera definición del efecto alfa se refiere a “nucleófilos que contienen un heteroátomo, con al menos un par de electrones no compartido adyacente al átomo nucleofílico y que, debido a ello, exhiben una reactividad nucleofílica inusualmente grande comparada con nucleófilos comunes de basicidad similar” [Edwards 1962, Green 1958]. De acuerdo a esta definición, no es claro qué esperar cuando se coordina el heteroátomo alfa con un catión metálico ya que la reactividad del nucleófilo debe modificarse por dos razones. Primero, aumentar porque el pK_a del nucleófilo coordinado disminuye y entonces la fracción desprotonada aumenta y en consecuencia la reactividad es mayor a un menor valor de pH. Segundo, podría disminuir la reactividad ya que el par de electrones del heteroátomo adyacente al centro nucleofílico está coordinado por lo que debería comportarse como un nucleófilo cuya reactividad sea proporcional a su basicidad.

La reactividad observada se corroboró de varias formas: estudiando el efecto de la concentración de los cationes metálicos, el efecto del pH para una disolución 1:1

metal:ligante y encontramos que todos los datos son congruentes y nos llevan a determinar los mismos valores de pK_a de los complejos y las mismas constantes de oximinólisis. Cuando colocamos los valores de pK_a y las constantes de oximinólisis para el NFA para los complejos de Cd(II) y Zn(II) con Hdapam en las coordenadas de Brønsted (Figura 13.2) y los comparamos con otros oximatos (Figura 3.5) y algunos otros complejos metálicos de otras oximas, se observa que su reactividad está por encima de la reactividad de los aniones oximato, pero no caen dentro de la correlación para los otros complejos de estructura similar. Una de las cosas más notables que se observa en la Figura 13.2 es que, para el caso de los oximatos coordinados, no parece existir un efecto de nivelación como sucede en el caso de los oximatos libres. Adicionalmente es importante hacer notar que la reactividad de varios de estos complejos son del mismo orden que la reactividad de algunas enzimas naturales hacia NFA.

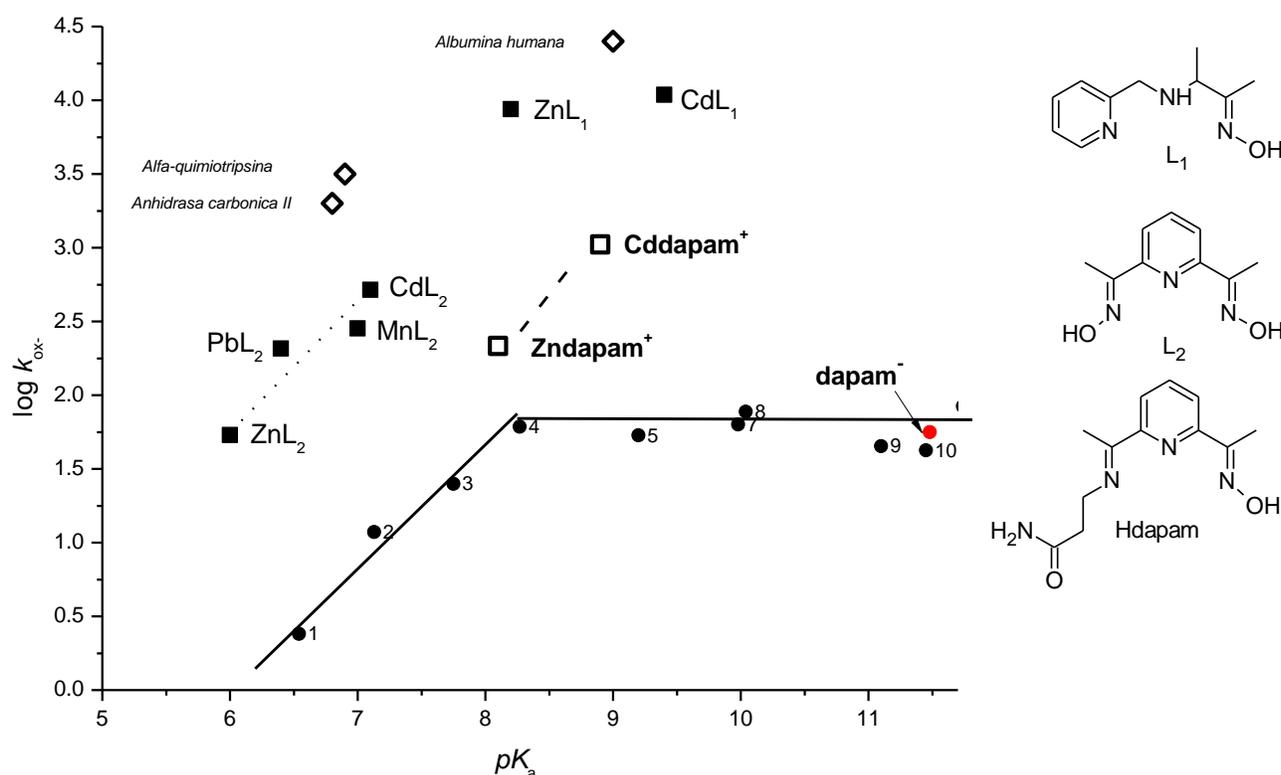
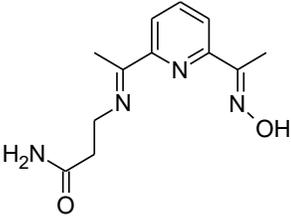
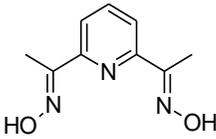
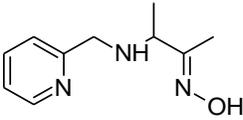


Figura 13.2 Coordenadas de Brønsted para algunas oximas coordinadas con L₁= H₂dpd L₂ = HOxAp_y, Hdapam; (●) son valores para oximatos de la Tabla 3.1, Figura 3.5. Y algunas enzimas todos frente a la hidrólisis de NFA.

Respecto al efecto alfa, experimentalmente encontramos que la reactividad de los complejos es incluso mayor que la reactividad correspondiente a tener toda la oxima en su forma aniónica libre (dapam⁻) en disolución; este incremento es de más de un orden de magnitud (ver Tabla 13.2 primera columna renglones 2, 5 y 8) y no nos deja duda de que es mayor que la reactividad del oximato libre. Por lo tanto el hecho de que los complejos metal-oximato también se comporten como α -nucleófilos no puede explicarse con el argumento de que el par de electrones adyacentes al átomo nucleofílico cede densidad electrónica al átomo nucleofílico. Hasta la fecha, la explicación que se ha dado del efecto alfa para nucleófilos aniónicos, congruente con nuestros resultados, se relaciona con el desbalance en la solvatación del nucleófilo y complejo en el estado de transición. De esta manera, pensamos que el papel de los cationes metálicos es reducir el efecto de solvatación sobre el nucleófilo aniónico, ya que los complejos metal-oximato son nucleófilos catiónicos.

Tabla 13.2 Comparación de la reactividad frente a NFA de complejos de Zn(II) y Cd(II) de H₂dapd, HOxApy y Hdapam así como sus constantes de formación y de acidez.

			
	Hdapam	H ₂ dapd*	HOxApy**
pK_{aLH}	11.48	11.3	11.74
k_L^-	56 M ⁻¹ s ⁻¹	130 M ⁻¹ s ⁻¹	84 M ⁻¹ s ⁻¹
$\log K_{Zn(L)}^+$	5.51	4.6	9.4
pK_{aZnLH}	7.96	6	8.2
k_{ZnL}^+	215 M ⁻¹ s ⁻¹	53 M ⁻¹ s ⁻¹	8700 M ⁻¹ s ⁻¹
$\log K_{Cd(L)}^+$	5.00	4.08	6.8
pK_{aCdLH}	9.01	7.1	9.4
k_{CdL}^+	1050 M ⁻¹ s ⁻¹	518 M ⁻¹ s ⁻¹	10900 M ⁻¹ s ⁻¹

*[Yatsimirsky, 1998] ;** [Gómez-Tagle, 2013]

Los complejos de la piridín oxima H_2dapd , caen en una línea paralela a la de los aniones oximato que exhiben una reactividad proporcional a su basicidad, pero son aproximadamente dos órdenes de magnitud más reactivos que los aniones oximato. El complejo de $Zn(II)$ de la oxima $HOxAPy$ sigue esta tendencia, pero al ser más básico que los complejos con H_2dapd , su reactividad es más de tres órdenes mayor (3.5 en unidades logarítmicas), mientras que el complejo de $Cd(II)$ se encuentra en la zona de nivelación pero exhibe una reactividad dos órdenes mayores que la de los aniones oximato libres. Por su parte, los complejos oximato estudiados en este trabajo parecen seguir la tendencia de los oximatos que tienen una reactividad proporcional a su basicidad, pero la presencia del catión metálico no permite que exhiban un efecto de nivelación en la reactividad.

Es importante resaltar que no se observa el efecto de nivelación en las coordenadas de Brønsted para los complejos de los oximatos por lo que se puede esperar una reactividad mayor o menor, dependiendo de que tanto acidifica el catión al ligante. Se ha discutido que el efecto de nivelación es debido a la solvatación del ion oximato por tener una alta densidad de electrones, y al coordinarse parte de esa densidad electrónica disminuye, ya que el nucleófilo pasa de estar cargado negativamente, $[dapam^-]$ a estar cargado positivamente $[Mdapam^+]$. Por esto nos inclinamos a pensar que cuando se trata de complejos oximato son los efectos de solvatación del nucleófilo los que predominan en el llamado "efecto alfa".

Sin embargo, también hay ciertas tendencias cuando se trata del mismo oximato con diferentes metales. En este caso, una de las razones de las diferencias en la reactividad parece ser la dureza o blandura de los cationes. En general, la reactividad observada es mayor para los cationes metálicos más blandos y por lo tanto debería seguir el orden $Mn(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) < Zn(II) < Cd(II)$, y lo que se observa es algo muy cercano, y este efecto está contrapuesto con que las

constantes de formación por el contrario son menores para los cationes metálicos blandos.

Tres aspectos muy importantes que se pueden analizar para los complejos son los siguientes. Primero, que los valores de pK_a para las piridín oximas de la Tabla 13.2 tienen valores muy cercanos y que sus constantes de oximinólisis frente a NFA difieren como máximo por dos veces cayendo dentro de la zona de nivelación en las coordenadas de Brønsted para oximatos. Segundo, parece existir una fuerte relación entre el valor de la constante de formación del complejo con la reactividad. Es decir que debe existir un valor óptimo para la constante de formación pues si es demasiado grande (como en el caso de HOxAPy con Zn(II)) la reactividad empieza a caer, si es intermedia (como HOxAPy con Cd(II)) se observa mayor reactividad esterolítica. Cuando se tienen dos constantes de formación del mismo orden (H_2dapd con Cd(II) y Zn(II)), se observa mayor reactividad para la especie con mayor valor de pK_a . La reactividad de los complejos de Hdapam tiene un mayor balance con constantes de formación intermedias y mayor basicidad que los complejos de H_2dapd . Tercero, aparentemente para las tres oximas la constante de formación del complejo es menor para cadmio que para zinc, pero la constante de esterólisis es mayor para cadmio que para zinc también para las tres oximas.

Aunque las constantes de segundo orden para la esterólisis de NFA obtenidas con los complejos oximato de Hdapam, son menores que las constantes para las enzimas más evolucionadas (con límite difusional para su reactividad) como la albumina humana (constante mayor a $10^4 M^{-1}s^{-1}$), son del orden de algunas como la alfa quimiotripsina y la anhidrasa carbónica II ($10^3 M^{-1}s^{-1}$) y mucho mayores que para otros complejos metal-oximato reportados, con lo cual puede descartarse la idea de que al coordinarse un alfa nucleófilo con un catión metálico mediante su par de electrones alfa, debe perder su reactividad como nucleófilo.

Finalmente, no nos cabe duda de que los compuestos de coordinación con α -nucleófilos se presentan como una excelente opción para desarrollar “enzimas esterolíticas artificiales” en condiciones muy cercanas a las fisiológicas. Aunque queda mucho aun por investigar, en particular el efecto de solvatación sobre los complejos piridín oximato y la reactividad esterolítica hacia otros sustratos como ésteres fosfato o fosfonato, las aplicaciones que de estos sistemas se pueden derivar son numerosas.

14. Conclusiones

El ligante Hdapam se comporta como un α -nucleófilo frente a la esterólisis del NFA. El estudio cinético con Dapydam nos permitió corroborar que en ausencia del grupo oxima no hay reactividad. La reactividad esterolítica se atribuye al grupo funcional oxima, la correlación de las constantes de esterólisis con la concentración de dapam^- demostró que ésta es la especie cinéticamente activa.

La introducción del grupo acetamida mejora ligeramente la solubilidad tanto para el Hdapam como para sus compuestos de coordinación con respecto a su precursor, H_2dapd .

Las constantes de formación de los complejos con el ligante protonado son pequeñas (del orden de $100\text{-}1000\text{ M}^{-1}$) pero se incrementan notablemente para el ligante desprotonado (del orden de $100,000\text{ M}^{-1}$). Esto se puede explicar en términos de densidad electrónica, ya que los cationes se comportan como electrófilos, al estar desprotonado el ligante hay una mayor atracción.

Los complejos del ligante Hdapam con Zn(II) y Cd(II) forman únicamente complejos 1:1 metal:ligante debido a que el ligante es tetradentado y difícilmente se coordinan dos ligantes al mismo centro metálico. Estos complejos presentan

una reactividad esterolítica mucho mayor a la del oximato libre (20 con Cd(II) y 4 con Zn(II) veces).

Los complejos del ligante Hdapam con Zn(II) y Cd(II), Zndapam⁺ y Cddapam⁺, operan de modo catalítico ya que bajo algunas condiciones de reacción la especie activa se encontraba en una concentración hasta 1000 veces menor a la del sustrato NFA, y sin embargo la hidrólisis del sustrato es completa.

La constante de oximinólisis para el complejo de Cd(II) es del orden de $1000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la cual cae dentro del orden de reactividad para algunas enzimas naturales frente al mismo sustrato, NFA.

15. Glosario

Desbalance El término de “desbalance” (imbalance) se usa para denotar que los parámetros que caracterizan los procesos de formación o ruptura de los enlaces para una reacción, cambian con relación a la coordenada de reacción para el Estado de Transición de acuerdo al Principio de Sincronización Imperfecta [Bernasconi 1985].

Esterólisis Hidrólisis de un éster en su correspondiente ácido y alcohol

Constante de oximinólisis Se refiere a la constante de velocidad de hidrólisis de un sustrato, pero específicamente con una oxima.

α -nucleófilo Es un nucleófilo con al menos un par de electrones libres adyacentes al centro nucleofílico y que presenta una desviación positiva frente a las coordenadas de Brønsted que relacionan la nucleofilia con la basicidad.

Efecto de nivelación Para el caso de las piridin oximas con valores de pK_a mayores a 8, es un máximo donde deja de aumentar la nucleofilia conforme aumenta el pK_a

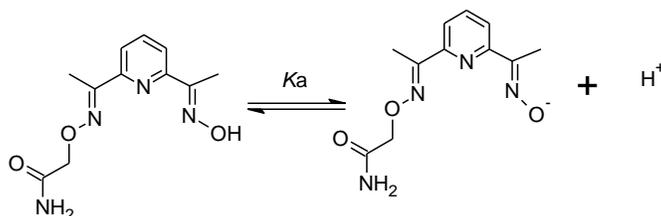
Régimen catalítico Es cuando la especie que actúa como catalizador reacciona tan rápido como se forma, por lo que no hay una variación considerable en su concentración

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

16. Apéndice

(A) Modelo para la disociación ácida del grupo oxima

Para calcular el valor de la constante de disociación ácida del ligante Hdapam, se considero el siguiente equilibrio



$$K_a = \frac{[\text{dapam}^-][\text{H}^+]}{[\text{Hdapam}]} \quad (1)$$

Realizando un balance de masas

$$[\text{Hdapam}]_0 = [\text{Hdapam}] + [\text{dapam}^-] \quad (2)$$

Considerando la absorbancia de la disolución, de acuerdo a la Ley de Beer-Lamber, para una celda de 1 cm de paso óptico está dada por:

$$\text{Abs} = \epsilon_1 [\text{Hdapam}] + \epsilon_2 [\text{dapam}^-] \quad (3)$$

Despejando del balance de masas la oxima protonada, $[\text{Hdapam}]$, y sustituyéndola en la ecuación 3 se obtiene se tiene:

$$\text{Abs} = \epsilon_1 ([\text{Hdapam}]_0 - [\text{dapam}^-]) + \epsilon_2 [\text{dapam}^-] \quad (4)$$

Despejando de la ecuación 1, $[\text{dapam}^-]$ y sustituyendo en la ecuación 4, y asociando términos se obtiene la ecuación 5.

$$\text{Abs} = \epsilon_1 [\text{Hdapam}]_0 + (\epsilon_2 - \epsilon_1) \left(\frac{K_a [\text{Hdapam}]}{[\text{H}^+]} \right) \quad (5)$$

Sustituyendo en el balance de masa por el oximato [dapam⁻] de la ecuación (1)

$$[\text{Hdapam}]_0 = [\text{Hdapam}] + \frac{K_a[\text{Hdapam}]}{[\text{H}^+]} = [\text{Hdapam}] \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)$$

$$[\text{Hdapam}]_0 = \frac{[\text{Hdapam}]}{\left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}\right)} \quad (6)$$

Finalmente, sustituyendo la ecuación (6) en (5) y reacomodando la expresión se obtiene la ecuación 7

$$\text{Abs} = \epsilon_1[\text{Hdapam}]_0 + (\epsilon_2 - \epsilon_1) \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \left\{ \frac{[\text{Hdapam}]_0}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}} \right\}$$

$$\text{Abs} = \frac{\epsilon_1[\text{Hdapam}]_0 \left[1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right] + (\epsilon_2 - \epsilon_1) \frac{K_a[\text{Hdapam}]_0}{[\text{H}^+]}}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}}$$

$$\text{Abs} = \frac{\epsilon_1[\text{Hdapam}]_0 + \epsilon_2[\text{Hdapam}]_0 \frac{K_a}{[\text{H}^+]}}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}} \quad (7)$$

En su forma logarítmica y sustituyendo el producto del coeficiente de absorptividad y la concentración por la absorbancia se obtiene la ecuación:

$$\text{Abs} = \frac{A_{L^-} + A_0 * 10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (8) \quad \text{Ecuación 4}$$

(B) Determinación de k_{obs} a partir de método integral

La constante de rapidez para la reacción de esterólisis del NFA se calcula a partir de una ecuación cinética de segundo orden, la cual es la siguiente:

$$\frac{d[NF^-]}{dt} = k [NFA] [dapam] \quad (9)$$

En donde se considera que para ambas especies el orden de reacción es uno y $[dapam]$ es la concentración de la oxima libre o coordinada con iones metálicos. Tanto en presencia de cationes metálicos como en ausencia, la oxima funciona bajo 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 NF^- será:

$$\frac{d[NF^-]}{dt} = k_{obs} [NFA] = -\frac{d[NFA]}{dt} \quad (10)$$

$$\int \frac{d[NFA]}{[NFA]} = -k_{obs} dt \quad (11)$$

$$[NFA] = [NFA]_0 e^{(-k_{obs} t)} \quad (12)$$

Con el correspondiente balance de masas del NFA presente, tenemos:

$$[NFA] = [NFA]_0 - [NF^-] \quad (13)$$

Sustituyendo de la ecuación 13, $[NFA]_0$ en la ecuación 12 y despejando $[NF^-]$, obtenemos una dependencia en función de la concentración de $[NFA]_0$:

$$[NF^-] = [NFA]_0 - [NFA]_0 e^{(-k_{obs} t)} \quad (14)$$

$$[NF^-] = [NFA]_0 (1 - e^{(-k_{obs} t)}) \quad (15)$$

Considerando la ley de Beer-Lambert que relaciona proporcionalmente el producto del coeficiente de absorción, la concentración y la longitud atravesada por la luz en el medio con la absorbancia:

$$A = \epsilon l C \quad (16)$$

Teniendo en cuenta que se utilizó una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm de longitud y siguiendo la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm nos queda la siguiente ecuación:

$$A^{400} = \epsilon_{\text{NF}^-}^{400} [\text{NF}^-] \quad (17)$$

Considerando lo anterior se despeja de la ecuación 17 la concentración del $[\text{NF}^-]$ y se sustituye en la ecuación 15. Posteriormente despejamos la absorbancia a la longitud de 400nm y nos arroja la ecuación siguiente:

$$A^{400} = \epsilon_{\text{NF}^-}^{400} [\text{NFA}]_0 (1 - e^{(-k_{\text{obs}} t)}) \quad (18)$$

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

$$A^{400} = A_{\infty}^{400} (1 - e^{(-k_{\text{obs}} t^{\infty})}) \quad (19)$$

Sin embargo la lectura se realiza a un tiempo (t_0), de forma que habrá una concentración inicial del producto, debida al tiempo de transformación no monitoreado igual a (A_i) la cual contribuye adicionalmente como se observa a continuación :

$$A^{400} = A_i + \Delta A_{\infty}^{400} (1 - e^{(-k_{\text{obs}} t)}) \quad (20) \quad \textbf{Ecuación 5}$$

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

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

La rapidez inicial de oximinólisis del NFA para tiempos cortos, sigue la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{d[NF^-]_0}{dt} = k [NFA]_0 [Hdapam] \quad (21)$$

Si cumple la ley de Beer-Lambert para el cambio de $[NF^-]$:

$$\frac{d[NF^-]}{dt} = \frac{d(A_{NF^-} / \epsilon_{NF^-})}{dt} = \frac{1}{\epsilon_{NF^-}} \frac{d(A_{NF^-})}{dt} \quad (22)$$

Si sustituimos en la Ecuación 22 y consideramos tiempos de conversión muy cortos obtenemos la Ecuación 23

$$\left(\frac{1}{\epsilon_{NF^-}} \frac{d(A_{NF^-})}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = k_{obs} [NFA]_0 \quad (23)$$

Donde $k_{obs} = k [Hdapam]_0$. Para tiempos pequeños la ecuación corresponde a una línea recta. Por lo que se puede considerar que la rapidez de reacción inicial será:

$$v_0 = \left(\frac{dA_{NF^-}}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \quad (24)$$

De modo que al sustituir v_0 de la ecuación 24 en la ecuación 23 se obtiene:

$$\frac{1}{\epsilon_{NF^-}} v_0 = k_{obs} [NFA]_0 \quad (25)$$

$$k_{obs} = \frac{v_0}{\epsilon_{NF^-} [NFA]_0} = \frac{v_0}{\Delta A_\infty} \quad (26) \quad \text{Ecuación 6}$$

(D) Constante de oximinólisis

En la esterólisis del NFA en presencia del ligante Hdapam, la actividad depende de la concentración del ion oximato que a su vez depende del pH al que se realicen las determinaciones.



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

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{ox}}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}} [\text{dapam}^-] \quad (27)$$

Considerando $k_{\text{obs}} = k'_{\text{ox}} [\text{dapam}^-]_0$ se sustituye en la ecuación 19 y se despeja k'_{ox} , se obtiene:

$$k'_{\text{ox}} = \frac{k_{\text{ox}}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}} \quad (28 \quad \text{Ecuación 7})$$

Y en su forma logarítmica se obtiene la ecuación lineal, donde la pendiente es igual a la constante de oximinólisis intrínseca o independiente del pH:

$$\log k'_{\text{ox}} = \log k_{\text{ox}} - \log \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_a} \right) \quad (29)$$

(E) Ajuste no lineal de las titulaciones espectrofotométricas

El ajuste para las titulaciones espectrofotométricas metal- ligante considera el respectivo balance de masa, la concentración total de ligante, $[L]_T$ y la concentración total de metal $[M]_T$ son:

$$[L]_T = [L] + [ML]$$

$$[M]_T = [M] + [ML]$$

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

Considerando que las especies que absorben en el rango UV-vis, son únicamente el ligante, el metal y el complejo ($Abs_T = Abs_M + Abs_L + Abs_{ML}$), además que 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 $[M]_T \approx [M]$ se puede llegar a la siguiente ecuación:

$$Abs = \frac{(\epsilon_L + \epsilon_{ML} K_{ML} [M]_T) [L]_T}{1 + K_{ML} [L]_T} \quad (30)$$

Es necesario considerar el balance de masas sin simplificaciones ya que no puede asumirse un exceso permanente de metal ni del ligante, tal como ocurre en algunas titulaciones espectrofotométricas realizadas. Por lo que se obtiene una ecuación no lineal que considera tanto las concentraciones iniciales de las especies, como una diferencia de los coeficientes de absorción del complejo y del ligante. De dicha ecuación se puede obtener como un parámetro de ajuste el valor de K_{ML} :

$$Abs = Abs_L + 0.5 \Delta \epsilon_{ML-L} \left([L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} - \sqrt{\left[[L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} \right]^2 - 4[L]_0[M]_0} \right) \quad (31)$$

De esta ecuación se puede obtener una ecuación similar, donde la propiedad medida no es la absorbancia sino el desplazamiento químico y el delta de coeficientes de absorción es sustituido por una constante, característica para

cada sistema, pero sin significado físico. Así se puede calcular la constante formación del complejo en con datos de desplazamientos, por RMN.

$$\delta = \delta_L + 0.5(Cte_{ML-L}) \left([L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} - \sqrt{\left[[L]_0 + [M]_0 + \frac{1}{K_{ML}} \right]^2 - 4[L]_0[M]_0} \right) \quad (32)$$

Se introducen al programa *Origin Lab 8.5.0* ambas ecuaciones para ser utilizadas en el ajuste de datos experimentales. Tratamiento propuesto en "Principles and Methods in Supramolecular Chemistry", [Schneider, Yatsimirsky 2000].

(F) Determinación de la k_{ox} y pK_a de Hdapam a partir de k_{corr} en función del pH.

Tal como se definió anteriormente k_{obs} es una suma de contribuciones del OH^- $dapam^-$

$$k_{obs} = k_{OH^-} [OH^-] + k_{ox} [dapam^-] \quad (33)$$

$$k_{corr} = k_{obs} - k_{OH^-} [OH^-] = k_{ox} [dapam^-] \quad (34)$$

Tomando la constante de disociación ácida del ligante Hdapam

$$K_a = \frac{[H^+][dapam^-]}{[Hdapam]} \quad (35)$$

Realizando un balance de masas

$$[Hdapam]_0 = [Hdapam] + [dapam^-] \quad (36)$$

De la ecuación 35 se despeja $[Hdapam]$

$$[Hdapam] = \frac{[H^+][dapam^-]}{K_a} \quad (37)$$

Sustituyendo en el balance de masa por el oximato $[dapam^-]$ de la ecuación (35)

$$[\text{Hdapam}]_0 = \frac{[\text{H}^+][\text{dapam}^-]}{K_a} + [\text{dapam}^-] = [\text{dapam}^-] \left(\frac{[\text{H}^+]}{K_a} + 1 \right) \quad (38)$$

Despejando $[\text{dapam}^-]$ de la ecuación (38)

$$[\text{dapam}^-] = \frac{[\text{Hdapam}]_0}{\left(\frac{[\text{H}^+]}{K_a} + 1 \right)} \quad (39)$$

Sustituyendo $[\text{H}^+]$ por $10^{-\text{pH}}$ y K_a por $10^{-\text{p}K_a}$ en la ecuación (39)

$$[\text{dapam}^-] = \frac{[\text{Hdapam}]_0}{\left(\frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{p}K_a}} + 1 \right)} \quad (40)$$

$$[\text{dapam}^-] = \frac{[\text{Hdapam}]_0}{(10^{\text{p}K_a - \text{pH}} + 1)} \quad (41)$$

Sustituyendo la expresión 41 (concentración del anión oximato) en la expresión 34 se obtiene la dependencia de k_{corr} en función del pH, de la constante de oximinólisis, k_{ox} , y del $\text{p}K_a$ de la oxima, que corresponde a la Ecuación 4b.

$$k_{\text{corr}} = \frac{k_{\text{ox}}[\text{Hdapam}]_0}{(10^{\text{p}K_a - \text{pH}} + 1)} \quad (42 \text{ Ecuacion 4b})$$

17. Bibliografía

- Abele, E.; Abele, R.; Lukevics, E. "Pyridine Oximes: Synthesis, reactions, and biological activity (Review)" *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **39** (7), 825-851(2003).
- Antonijevic, B.; Stojiljkovic, M. P. "Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning" *Clin. Med. Rev.* **5**, 71–82 (2007).
- Bernasconi, C. F. "The principle of imperfect synchronization. I. Ionization of carbon acids", *Tetrahedron* **41**, 3219-3234 (1985)
- Bertini, I.; Luchinat, C. The Reaction Pathways of Zinc Enzymes and Related Biological Catalysts, in *Bioinorganic Chemistry*, Bertini I.; Gray H. B.; Lippard, S. J.; Valentine, J. S. Editores, University Science Books, California, Estados Unidos, (1994)
- Breslow, R. "Biomimetic Chemistry. Centenary lecture." *Chem. Soc. Rev.* **1**, 553-580 (1972).
- Breslow, R.; Chipman, D. "Mixed metal complexes as enzyme models. I. Intracomplex nucleophilic catalysis by an oxime anion", *J. Am. Chem.Soc.*, **18**, 4195-4196 (1965).
- Bruice, T. C.; Lapinski, R. "Imidazole Catalysis. IV. The Reaction of General Bases with p-Nitrophenyl Acetate in Aqueous Solution" *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2265 (1958).
- Budka, J.; Hampl, F.; Liska, F. "Micellar nickel(II)-2-pyridineketoxime complexes as powerful catalysts of the cleavage of carboxylic acid esters in weakly acidic conditions" *J. Mol. Catal. A Chem.* **104**, 201–204 (1996).
- Bühlmann, P. P.; Badertscher, M. "Structure Determination of Organic Compounds" *Ed. Springer* (2009).
- Buncel, E.; Cannes, C.; Chatrousse, A.P.; Terrier, F. "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 (2002).
- Buncel, E.; Cannes, C.; Chatrousse, A.-P.; Terrier, F. "Reactions of Oximate α -Nucleophiles with Esters: Evidence from Solvation Effects for Substantial Decoupling of Desolvation and Bond Formation" *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8766-8767 (2002).

- Chakravorty, A. "Structural chemistry of transition metal complexes of oximes" *Coord. Chem. Rev.*, **13** (1), 1-46 (1974).
- Coleman, J.; Vallee, B. "Metallocoarboxypeptidase-Substrate Complexes" *Biochem.* **1**, 1083-1092 (1962).
- Dixon, J. E.; Bruice, T. C. "alpha. Effect. V. Kinetic and thermodynamic nature of the .alpha. effect for amine nucleophiles" *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2052-2056 (1972)
- Dixon, J. E.; Bruice, T. C. "alpha. Effect. IV. Additional observation on the .alpha. effect employing malachite green as substrate" *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6592-6597 (1971).
- Dixon, J. E.; Bruice, T. C. "alpha. Effects. III. Reaction of malachite green with primary amines, methoxylamine, and hydrazines" *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3248-3254 (1971).
- Edwards, J. O.; Pearson, R. G. The Factors Determining Nucleophilic Reactivities *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 16-24 (1962).
- Fina, N. J.; Edwards, J. O. "The alpha effect. A review", *Int. J. Chem. Kinetic* **5**, 1-26 (1973).
- Gómez-Tagle, P.; Lugo-González, J. C.; Yatsimirsky, A. K. "Oximate metal complexes breaking the limiting esterolytic reactivity of oximate anions" *Chem. Commun.* **49**, 7717-9 (2013).
- Hoz, S.; Buncl, E. "The α -Effect: A Critical Examination of the Phenomenon and Its Origin", *Isr. J. Chem.* **26**, 313-319 (1985).
- Hoz, S.; Buncl, E. "The α -effect a critical examination of the phenomenon and its origin" *Israel J. Chem.* **26**, 313-319,(1985)
- Hupe, D.J.; Jencks, W.P. "Nonlinear structure-reactivity correlations. Acyl transfer between sulfur and oxygen nucleophiles" *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 451 (1977)
J. Am. Chem. Soc., **82**, 1778 (1960)
- Jencks, W.P. Carriuolo, J. "Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters"
- Kukushkin, V. Y. ; Pombeiro, A. J. L. "Oxime and oximate metal complexes: unconventional synthesis and reactivity" *Coord. Chem. Rev.* **181**, 147-175 (1999).
- Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. "Activation of Oximic Nucleophiles by Coordination of Transition Metal Ions" *J. Org. Chem.* **1**, 1045-1050 (2000).
- Martell, A.E.; Smith, R.M.; "Critical Stability Constants", Springer New York, 1990

- Milios, C. J.; Stamatatos, T. C.; Perlepes, S. P. "The coordination chemistry of pyridyl oximes" *Polyhedron* **25**, 134–194 (2006).
- Namli, H.; Azaz A. D.; Kazak, C. "Synthesis, characterization, crystal structure and biological activity of the cobalt(IV) complex of 2,6-diacetylpyridine dioxime: [Co(dapdo)₂]" *Transit. Met. Chem.* **32**, 266–270 (2007).
- Özdemir, N; Dayan, O. "Copper(II) and cobalt(II) complexes of 2,6-diacetylpyridine bis" *J. Struct. Chem.* **53**, 253–261 (2012).
- Suh, J. "Model Studies of Metalloenzymes Involving Metal Ions as Lewis Acid Catalysts" *Acc. Chem. Res.* **25**, 273-279 (1992).
- Suh, J.; Cheong, M.; Han, H. "Multifunctional catalysis by metal complexes" *Bioorg. Chem.* **12**, 187-196 (1984).
- Suh, J.; Han, H. "Zinc ion catalyzed ester hydrolysis of o-acetyl-2acetylpyridine ketoxime: bimolecular participation of hydrozinc (II) ion" *Bioorg. Chem.* **12**, 177-187(1984).
- Tazdher, G.; Dreos, R.; Felluga, A. "Intramolecular and intermolecular O-H-O hydrogen bond in some nickel(II) complexes with tridentate amino-oxime ligands" *Inorganica Chim. Acta* **355**, 361–367 (2003).
- Terrier, F.; Degorre F.; Kiffler D.; Laloi, M. "The effect of solvation on the reactivity of α -nucleophiles in aqueous solution. 1. Oximate anions" *Bull. Soc. Chem.Fr.* **4**, 415 (1988).
- Terrier, F.; Le Guével, E.; Chatrousse, P.; Moutiers, G.; Buncel, E. "The levelling effect of solvational imbalances in the reactions of oximate alpha-nucleophiles with electrophilic phosphorus centers. Relevance to detoxification of organophosphorus esters" *Chem. Commun.* **14**,600–1 (2003).
- Terrier, F.; MacCormack P.; Kizilian E.; Hallé J.C.; Demerseman P.; Guir F.; Lion C.; "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 (1991).
- Um, I.-W.; Lee, E.-J.; Buncel E. "Solvent Effect on the α -Effect for the Reactions of Aryl Acetates with Butane-2,3-dione Monoximate and p-Chlorophenoxide in MeCN-H₂O Mixtures" *J. Org. Chem.* **66**, 4859-4864 (2001).
- Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. "Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions" *Acc. Chem. Res.* **32**, 485–493 (1999).

- Wolfe, S.; Schlegel, H. "Theoretical studies of S_N^2 transition states, the alpha effect" *Tetrahedron Letters*. **23**, 615-618 (1982).
- Wong, L.; Radic Z.; Hosea, N. "Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis" *Biochemistry* **39**, 5750-7 (2000).
- Yatsimirsky, A. K.; Gómez-Tagle, P.; Escalante-Tovar, S.; Ruiz-Azaura, L. "Kinetics and mechanism of ester hydrolysis by metal complexes of 2,6-diacetylpyridine dioxime" *Inorganica Chim. Acta* **273**, 167-169(1998).