

00585



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA ELECTRONICA
ENTRE METALOPROTEINAS Y COMPUESTOS DE
COORDINACION DE DERIVADOS
BENCIMIDAZOLICOS.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**DOCTORA EN CIENCIAS
(QUIMICA INORGANICA)**
P R E S E N T A :
Q. AGUEDA ELENA CENICEROS GOMEZ



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Antonio Campero Celis
Primer vocal	Dr. Anatoli K. Iatsimirski
Segundo vocal	Dra. Rosalinda Contreras Theurel
Tercer Vocal	Dr. Manuel Fernando Rubio Arroyo
Secretario	Dra. Noráh Barba Behrens
Primer suplente	Dra. Laura María Gasque Silva
Segundo suplente	Dr. José Federico del Río Portilla

Lugar donde se desarrolló el trabajo:

Laboratorio 214, Departamento de Química Inorgánica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Silvia Castillo B.

Dra. Silvia E. Castillo Blum

Sustentante:

Agueda Ceniceros

Q. Agueda Elena Ceniceros Gómez

A Daniel

A Gerardo

A mis padres

Agradecimientos

Tengo que agradecer a tantas personas que de una u otra manera formaron parte en la realización de esta tesis que espero no olvidar a alguien.

- Un agradecimiento muy especial a Silvia asesora y gran amiga.
- A todos los que fueron, son y serán siempre mis compañeros del Lab. 214, en especial a Vanesaa, Ziflali, Conchita, Paty Fierro y Sandra (Toxqui) gracias por todo.
- A Yamilet una grandiosa amiga que tuve mucha suerte en encontrar.
- A todos mis amigos (en especial Q's 91) que compartieron esta etapa de mi vida.
- A mi familia y a mi nueva familia por todo su apoyo y cariño.
- A la Dra. Noráh Barba por todo el apoyo durante estos años.
- Al Dr. Blas Lotina por su apoyo en especial para el aislamiento de las proteínas.
- A La Dra. Rosalinda Contreras por su gran apoyo y asilo durante la huelga lo que permitió que continuará trabajando.
- Al Dr. Sylvain Bèrnes y al Dr. H. Nöth por la resolución de las estructuras cristalinas.
- Al Dr. Federico del Rio y al Dr. Armando Ariza por la realización de los experimentos de RMN de la plastocianina.

- Al jurado por la revisión del trabajo y sus valiosos comentarios.
- A Marisela Gutiérrez y Rosa Isela del Villar Morales por los espectros de IR y RMN.
- A la Dra Marieta Tuena de Gómez-Poyou y al Dr. Diego González Halpern por el préstamo del equipo de ultrafiltración.
- Al Dr. Antonio Peña por los ensayos realizados en su equipo "stopped flow".
- Al Prof. Geoff Sykes por recibirme en su laboratorio y enseñarme las técnicas de aislamiento de las proteínas.
- Al Prof. M. Ejdebäk por su obsequio de plastocianina sobreexpresada.
- A los proyectos DGAPA IN222096 y CONACyT 25564E.
- A DGEF y CONACyT por las becas otorgadas para la realización de los estudios de doctorado.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México la que me ha brindado una gran educación.

Abreviaturas

k_{el}	coeficiente de transmisión electrónica
ν_n	frecuencia de movimiento nuclear en el estado de transición
[AB]	aducto donador: aceptor o precursor
^{13}C	carbono trece
2amb	2-(aminometil)bencimidazol
2gb	2-guanidinobencimidazol
2pb	2-(2'-piridil)bencimidazol
4,7-DPSfen	4,7-difenil-4'-sulfonato-1,10-fenantrolina
4tb	2-(4-tiazolil)bencimidazol
A	donador
acac	acetilacetato
Ala	alanina
Asp	aspartato
B	aceptor
bbimpy	2,6-bis(bencimidazolil)piridina
bpy	bipiridina
Calc.	calculado
Co-1	$[\text{Co}(\text{bbimpy}-\text{H})_2]\text{OH}$
Co-2	$[\text{Co}(\text{2pb})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
Co-3	$[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Co-4	$[\text{Co}(\text{2gb})_3](\text{CCl}_3\text{COO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Co-5	$[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Co-6	$[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]\text{Cl}(\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Co-7	$[\text{Co}(\text{2amb})_3]\text{Cl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
COSY	Espectroscopía de correlación (Correlated Spectroscopy)
Cp	ciclopentadienilo
Cr-1	$[\text{Cr}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{ZnCl}_4) \cdot \text{CH}_4\text{O}$
Cr-2	$[\text{Cr}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Cr-3	$[\text{Cr}_2(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Cr-4	$[\text{Cr}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Cr-5	$[\text{Cr}(\text{bbimpy})\text{Cl}_3] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$
Cr-6	$[\text{Co}(\text{4tb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 1.5\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
Cr-7	$[\text{Co}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Cys	cisteína
Dipic	dipicolinato
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
en	etilendiamina
Enc.	encontrado
λ	energía de reorganización
E°	potencial normal
fac	isómero facial
Fd	ferredoxina
Fe-1	$[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$

Fe-2	[Fe(ntb)Cl ₂]Cl•3H ₂ O
Fe-3	[Fe(bbimpy)Cl ₃]•3H ₂ O
Fe-4	[Fe(4tb) ₃]Cl ₃
Fe-5	[Fe(2pb) ₂ Cl ₂]Cl•H ₂ O
FeCp ₂ ⁺	ferrocenio
fen	fenantrolina
FNR	ferredoxina-NADP reductosa
FS I	fotosistema I
FS II	fotosistema II
Gly	glicina
HETCOR	correlación heteronuclear (Heteronuclear Correlation)
His	histidina
H _{rp}	acoplamiento electrónico
I	fuerza iónica
IR	infrarojo
J	constante de acoplamiento
K	constante de equilibrio de la formación del precursor
k ₁	constante de rapidez de la reacción de formación
k _B	constante de Boltzmann
k _{calcd}	constante de rapidez calculada
k _d	constante de rapidez de la reacción de disociación
k _{exp}	constante experimental de segundo orden
k _{Inh}	constante de asociación del inhibidor a la proteína
k _{obsd}	constante de rapidez observada
k _{TE}	constante de rapidez de la reacción de transferencia electrónica
k _{TE}	constante de rapidez inversa de la reacción de transferencia electrónica
Leu	leucina
mer	isómero meridional
Met	metionina
ntb	tris(2-bencimidazolilmetil)amina
Ox	oxidante
P680	pigmento P680
P700	pigmento P700
PCu	plastocianina
Phe	fenilalanina
ppm	partes por millón
PQH ₂	plastoquinona
py	piridina
Red	reductor
RMN	resonancia magnética nuclear
RPE	resonancia paramagnética electrónica
T	temperatura
t	tiempo
tmpa	tris(2-piridilmetil)amina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tyr	tirosina

UV-Vis	ultravioleta-visible
Val	valina
ΔG^\ddagger	energía libre de Gibbs de activación
ΔG^\ddagger	energía libre de Gibbs de la barrera energética de la transferencia electrónica
ΔG°	energía libre de Gibbs de la reacción
ΔH^\ddagger	entalpía de activación
ΔS^\ddagger	entropía de activación
μ_{eff}	momento magnético efectivo
ν_i	transición electrónica

Índice

Resumen	i
Abstract	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Reacciones de transferencia electrónica	3
2.1.1 Transferencia electrónica en sistemas biológicos	8
2.2 Plastocianina	12
2.3 Ferredoxina	16
2.4 Estudios cinéticos en reacciones de transferencia electrónica en metaloproteínas	19
2.4.1 Estudios cinéticos de transferencia electrónica en plastocianina	20
2.4.2 Estudios cinéticos con ferredoxinas [2Fe-2S] de cloroplastos	22
2.5 Síntesis de compuestos de coordinación con ligantes imidazólicos	25
3. Objetivos	27
4. Sección Experimental	28
4.1 Reactivos	28
4.2 Equipos y material	29
4.3 Aislamiento y purificación de metaloproteínas	30
4.3.1 Aislamiento a partir de hojas de espinaca	30
4.3.2 Aislamiento a partir de hojas de perejil	31
4.3.3 Separación de PCu y Fd	31
4.3.4 Purificación de plastocianina y ferredoxina	32
4.4 Síntesis de compuestos de coordinación	33
4.4.1 Síntesis de los compuestos de cobalto(III) con ligantes imidazólicos	33
4.4.2 Síntesis de los compuestos de cromo(III) con ligantes imidazólicos	36
4.4.3 Síntesis de los compuestos de hierro(III) con ligantes imidazólicos	38
4.5 Estudios de estabilidad de los compuestos de coordinación en disolución	39
4.6 Estudios cinéticos de la transferencia electrónica entre las metaloproteínas y los compuestos de coordinación de derivados bencimidazólicos	39
4.6.1 Reacciones de transferencia electrónica	39
4.6.2 Reacciones de inhibición competitiva para la plastocianina	41
4.7 Estudios de RMN para la plastocianina	41

5. Análisis de Resultados y Discusión	42
5.1 Aislamiento, purificación y caracterización de plastocianina y ferredoxina	42
5.2 Síntesis y caracterización de los compuestos de coordinación con ligantes bencimidazólicos	45
5.2.1 Compuestos de coordinación de cobalto(III)	46
5.2.1.1 Caracterización espectroscópica UV-Visible e IR de los compuestos de cobalto(III)	47
5.2.1.2 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de los compuestos de cobalto(III)	50
5.2.1.3 Cristalografía de los compuestos Co-3 y Co-6	64
5.2.1.4 Estructuras de los compuestos de cobalto(III)	68
5.2.2 Compuestos de coordinación de cromo(III)	69
5.2.2.1 Caracterización espectroscópica UV-Visible e IR de los compuestos de cromo(III)	72
5.2.2.2 Cristalografía del compuesto Cr-3	74
5.2.2.3 Estructuras de los compuestos de cromo(III)	77
5.2.3 Compuestos de coordinación de hierro(III)	78
5.2.3.1 Caracterización espectroscópica UV-Visible e IR de los compuestos de hierro(III)	80
5.2.3.2 Estructuras de los compuestos de hierro(III)	81
5.3 Estudios de estabilidad de los compuestos de coordinación en solución	82
5.4 Estudios cinéticos de reacciones de transferencia electrónica en plastocianina	85
5.4.1 Influencia del medio de reacción	85
5.4.2 Reacciones de transferencia electrónica entre PCu y compuestos de coordinación de derivados bencimidazólicos	96
5.4.3 Reacciones de inhibición competitiva en la transferencia electrónica en PCu(I)	101
5.5 Estudios de resonancia magnética nuclear en plastocianina de espinaca	113
5.6 Estudios cinéticos de reacciones de transferencia electrónica en ferredoxina (Fd)	121
5.6.1 Influencia del medio de reacción	121
5.6.2 Reacciones de transferencia electrónica entre Fd y compuestos de coordinación de derivados bencimidazólicos	127

6. Conclusiones	136
7. Referencias	137
Anexo I	142
Resumen de la determinación estructural del compuesto [Co(2gb) ₃]Cl(NO ₃) ₂	143
Resumen de la determinación estructural del compuesto [ContbCl]Cl(NO ₃)	146
Resumen de la determinación estructural del compuesto [Cr ₂ (μ-OH) ₂ (2gb) ₄](ClO ₄) ₄	151
Artículos publicados	156

Resumen

En esta tesis se presenta el estudio de las reacciones de transferencia electrónica entre dos metaloproteínas pertenecientes a la cadena fotosintética y diversos compuestos de coordinación con ligantes derivados del bencimidazol.

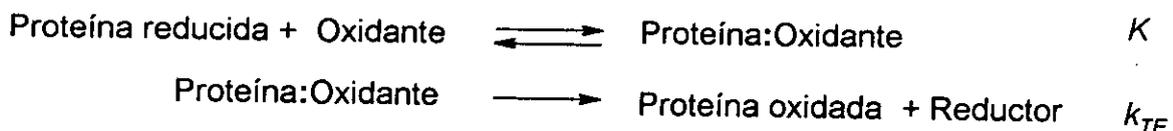
El trabajo se puede dividir en dos partes principales: en la primera parte se realizó la síntesis y caracterización de nuevos compuestos de coordinación con los iones metálicos Co(III), Cr(III) y Fe(III) utilizando diversos ligantes derivados del bencimidazol; y por último, una vez teniendo las metaloproteínas y los compuestos de coordinación puros y caracterizados se realizó el estudio cinético de las reacciones de transferencia electrónica entre la plastocianina o ferredoxina y los compuestos de coordinación.

El estudio de transferencia electrónica se realizó en dos metaloproteínas pequeñas, simples y no membranales de la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis como son la plastocianina y la ferredoxina. Por lo que se aislaron tanto la plastocianina como la ferredoxina a partir de hojas de espinaca y posteriormente se purificaron por técnicas cromatográficas.

Se sintetizaron y caracterizaron nuevos compuestos de coordinación con los ligantes: 2-guanidinobencimidazol (**2gb**), tris(2-bencimidazolilmetil)amina (**ntb**), 2,6-bis(2-bencimidazolil)piridina (**bbimpy**), 2-(2'-piridil)bencimidazol (**2pb**) y 2-(4-tiazolil)bencimidazol (**4tb**). Los compuestos de coordinación de cobalto(III) son: $[\text{Co}(\text{bbimpy-H})_2]\text{OH}$, $[\text{Co}(\text{2pb})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2$, $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2$, $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$ y $[\text{Co}(\text{2gb})_3](\text{CCl}_3\text{COO})_3$. Los compuestos de coordinación de cromo(III) son: $[\text{Cr}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$, $[\text{Cr}(\text{2gb})_3]\text{Cl}[\text{ZnCl}_4]$, $[\text{Cr}_2(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4$, $[\text{Cr}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, $[\text{Cr}(\text{bbimpy})\text{Cl}_3]$, $[\text{Cr}(\text{4tb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ y $[\text{Cr}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$. Por último, se sintetizaron 3 compuestos de coordinación de hierro(III): $[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$, $[\text{Fe}(\text{4tb})_3]\text{Cl}_3$ y $[\text{Fe}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$. La caracterización en estado sólido se realizó por espectroscopía IR, espectroscopía electrónica, susceptibilidad magnética, análisis elemental y cristalografía de rayos-X para los compuestos $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2$ y $[\text{Cr}_2(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4$. En disolución se llevó a cabo la caracterización de los

compuestos por espectroscopía electrónica y para los compuestos de cobalto(III) por técnicas de RMN.

Para las reacciones de transferencia electrónica entre la plastocianina y ferredoxina y los compuestos de coordinación bencimidazólicos se utilizó como medio de reacción una mezcla de DMSO/H₂O (25%), Tris/HCl pH = 7.0 u 8.0 e I=0.03 M (NaCl). Este medio de reacción no modifica el mecanismo de reacción propuesto para la transferencia electrónica que se presenta a continuación:



La presencia de DMSO acelera de manera importante el paso determinante de la reacción que es la transferencia electrónica. Se obtuvo para la reacción de plastocianina con [Co(fen)₃]³⁺ en DMSO/H₂O $K = 171.8 \text{ M}^{-1}$, $k_{TE} = 88.03 \text{ s}^{-1}$, $\Delta H^\ddagger = 45.7 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta S^\ddagger = -13.7 \text{ J/mol K}$, mientras que para la reacción de ferredoxina con [Co(en)₃]³⁺ $K = 1068.88 \text{ M}^{-1}$, $k_{TE} = 21.3 \text{ s}^{-1}$, $\Delta H^\ddagger = 31.6 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta S^\ddagger = -60 \text{ J/mol K}$.

Los compuestos de coordinación de hierro(III), en las condiciones de reacción empleadas, son oxidantes tanto para la plastocianina reducida como para la ferredoxina reducida; en el primer caso se observa un mecanismo simple de segundo orden de esfera externa, por ejemplo para la reacción de plastocianina con [Fe(2gb)₃]³⁺ a 25°C $k = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y para ferredoxina se observan cinéticas limitantes, por ejemplo para la reacción de ferredoxina con [Fe(2gb)₃]³⁺ $K = 217.6 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 212.3 \text{ s}^{-1}$.

Los compuestos de coordinación de cobalto(III) y cromo(III) son oxidantes para la ferredoxina reducida observándose cinéticas limitantes con constantes de rapidez de segundo orden en el orden de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que frente a la plastocianina son redox inactivos.

Los compuestos de cobalto(III) y cromo(III) son inhibidores de la reacción de oxidación de la plastocianina reducida por $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ observándose un mecanismo de bloqueo total de la proteína y porcentajes de inhibición de la reacción de transferencia electrónica en el intervalo de 25 a 90%. Por ejemplo, el compuesto $[\text{Cr}_2(2\text{gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4$ inhibe 90% la reacción y la constante de asociación del compuesto a la proteína $K_{\text{inh}} = 1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Se realizaron experimentos de RMN de la plastocianina para estudiar el efecto del DMSO en la proteína e identificar el sitio de unión de los compuestos de coordinación. Los resultados muestran que en presencia de DMSO la proteína no se desnaturaliza pero no se identificó el sitio de unión.

Abstract

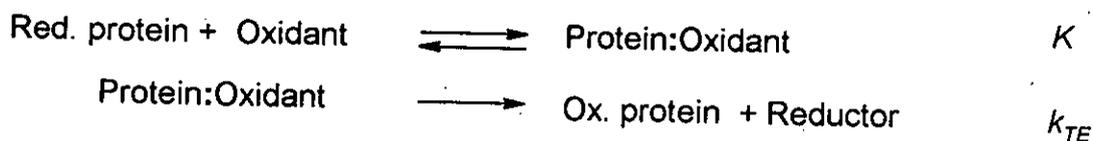
Here we present the results of the study of electron transfer reactions between two metalloproteins, which are part of the photosynthetic chain, and several co-ordination compounds with benzimidazolic ligands.

The study can be divided in two parts: in first instance, the syntheses and characterisation of co-ordination compounds with the metal ions Co(III), Cr(III) and Fe(III) with several benzimidazolic ligands; secondly, the kinetic study of the electron transfer reactions between plastocyanin and ferredoxin with the co-ordination compounds purified and characterised.

Plastocyanin and ferredoxin are two small and non membrane metalloproteins from the photosynthetic chain. They were isolated from spinach leaves and purified by chromatographic techniques.

We synthesised and characterised new co-ordination compounds with the benzimidazolic ligands: 2-guanidinobenzimidazole (**2gb**), tris(2-benzimidazolylmethyl)amine (**ntb**), 2,6-bis(2-benzimidazolyl)-pyridine (**bbimpy**), 2-(2'-pyridyl)benzimidazole (**2pb**) and 2-(4-thiazolyl)benzimidazole (**4tb**). The cobalt(III) co-ordination compounds are: $[\text{Co}(\text{bbimpy-H})_2]\text{OH}$; $[\text{Co}(\text{2pb})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2$, $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2$, $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$ and $[\text{Co}(\text{2gb})_3](\text{CCl}_3\text{COO})_3$. The chromium(III) compounds are: $[\text{Cr}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$, $[\text{Cr}(\text{2gb})_3]\text{Cl}[\text{ZnCl}_4]$, $[\text{Cr}_2(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4$, $[\text{Cr}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, $[\text{Cr}(\text{bbimpy})\text{Cl}_3]$, $[\text{Cr}(\text{4tb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ and $[\text{Cr}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$. Finally, the iron(III) co-ordination compounds are: $[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$, $[\text{Fe}(\text{4tb})_3]\text{Cl}_3$ and $[\text{Fe}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$. Solid state characterisation was made by IR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, magnetic moments, elemental analyses and X-ray crystallography for $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2$ and $[\text{Cr}_2(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4$. In solution the compounds were characterised by UV-Vis spectroscopy as well as NMR techniques for the cobalt(III) compounds.

The reaction medium used for the electron transfer reactions between plastocyanin or ferredoxin and the benzimidazolic co-ordination compounds was DMSO/H₂O (25% v/v), Tris/HCl pH = 7.0 or 8.0 and I = 0.03 M (NaCl). The reaction medium does not modify the proposed mechanism for the electron transfer:



The DMSO accelerates the electron transfer step. We obtained for the reaction between plastocyanin and [Co(phen)₃]³⁺ in DMSO/H₂O $K = 171.8 \text{ M}^{-1}$, $k_{TE} = 88.03 \text{ s}^{-1}$, $\Delta H^\ddagger = 45.7 \text{ kJ/mol}$ and $\Delta S^\ddagger = -13.7 \text{ J/mol K}$, and for reaction of ferredoxin with [Co(en)₃]³⁺ $K = 1068.88 \text{ M}^{-1}$, $k_{TE} = 21.3 \text{ s}^{-1}$, $\Delta H^\ddagger = 31.6 \text{ kJ/mol}$ and $\Delta S^\ddagger = -60 \text{ J/mol K}$.

Iron(III) compounds are oxidants to both reduced plastocyanin and ferredoxin; for plastocyanin the reaction follows a second order rate law, the rate constants obtained for example using [Fe(2gb)₃]³⁺ is $k = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C while for ferredoxin we observed the limiting kinetics $K = 217.6 \text{ M}^{-1}$ and $k_{TE} = 212.3 \text{ s}^{-1}$.

Cobalt(III) and chromium(III) co-ordination compounds behave as oxidants against reduced ferredoxin and followed limiting kinetics with second order rate constants in the range of $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Cobalt(III) and chromium(III) co-ordination compounds behave as redox inactive against reduced plastocyanin, but they are inhibitors of the reaction between plastocyanin and [Co(fen)₃]³⁺. The Co(III) and Cr(III) compounds totally block plastocyanin and inhibited the electron transfer in the range of 25 –90%. For example, [Cr₂(2gb)₄(μ-OH)₂](ClO₄)₄ inhibited 90% the electron transfer and $K_{inh} = 1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

The NMR study of reduced plastocyanin showed that the protein does not denature in DMSO/H₂O (25:75), but we could not identify the binding site for the co-ordination compounds to the plastocyanin.

1. Introducción

En nuestro grupo de investigación, hemos observado que ciertos compuestos de coordinación con iones metálicos ($M^{2+} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}, \text{Zn}$) y ligantes derivados de imidazoles (p. ej. 2-guanidinobencimidazol, 4-metil-5-imidazolcarboxilato de etilo) inhiben actividades fotosintéticas. Se ha investigado el o los sitios específicos de acción de dichos compuestos. A partir de los resultados a nivel biológico obtenidos de experimentos realizados en cloroplastos se ha concluido que algunos compuestos de coordinación que utilizan como ligantes derivados del imidazol tienen actividad herbicida. Se ha clasificado a los compuestos de cobre(II) con el ligante 4-metil-5-imidazolcarboxilato de etilo como inhibidores de la reacción de Hill, mientras que los compuestos de coordinación del 2-guanidinobencimidazol con cobalto(II) se comportan como desacoplantes.^{1,2} Al estudiar el efecto de compuestos de coordinación de iones Co(III) y Cr(III) determinamos que se comportaban como inhibidores de la reacción de Hill y el blanco se encuentra entre la plastocianina y el complejo citocromo b_6f .²

Es importante tratar de comprender qué función inhibitoria realizan a nivel molecular, y por otro lado explicar a qué se deben las diferencias de acción entre los varios compuestos dependiendo del ion metálico central y de los ligantes que contengan.

Con el objeto de profundizar en el entendimiento del efecto que tienen dichos compuestos de coordinación en la inhibición de las diversas actividades fotosintéticas, se estudiarán reacciones entre las metaloproteínas simples encargadas del transporte electrónico en la cadena fotosintética, la plastocianina y la ferredoxina, con compuestos de coordinación de derivados imidazólicos (Figura 1.1).

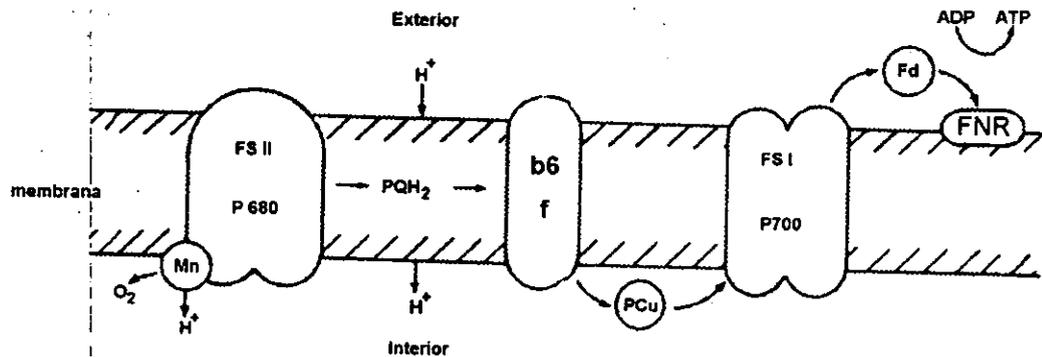


Figura 1.1. Localización de las metaloproteínas en la cadena fotosintética.
FSII: fotosistema II, FSI: fotosistema I, P680: pigmento P680, P700: pigmento P700, b₆f: complejo citocromo b₆f, PQH₂: plastoquinona, FNR: ferredoxina-NADP reductasa, PCu: plastocianina y Fd: ferredoxina.

En estas moléculas biológicas pequeñas se han llevado a cabo innumerables estudios de los principios fundamentales que gobiernan la transferencia electrónica entre proteínas. Cabe resaltar que estas proteínas son no membranales lo que facilita el manejo experimental.

Por otro lado, cada una se encuentra a un nivel diferente en la cadena fotosintética: la PCu se localiza entre el FSII y FSI, mientras que la Fd es la encargada de transferir los electrones del FSI al complejo NADP-reductasa (figura 1.1); por lo que los estudios realizados sobre estas metaloproteínas darían una información global del posible proceso de inhibición de los compuestos de coordinación en las actividades fotosintéticas.

Los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que la función inhibitoria en las actividades fotosintéticas de algunos compuestos ensayados a nivel de cloroplastos es la de recibir electrones de la cadena transportadora; sin embargo, no se puede descartar el hecho de que puedan por ejemplo, unirse a alguna proteína de la cadena transportadora de electrones bloqueando su actividad.

importante en el control de los procesos naturales, refleja el reconocimiento de los substratos *in vivo*. La constante de rapidez k_{TE} expresa la magnitud de las contribuciones de las energías de activación debidas a las barreras intrínsecas Franck-Condon de los centros donador y aceptor. Para procesos a larga distancia k_{TE} también depende de la distancia a la que ocurre la transferencia electrónica. La barrera Franck-Condon es la energía que se requiere para ajustar las configuraciones nucleares del reactivo a la del estado de transición, se considera generalmente una propiedad intrínseca del sistema.

La gran distancia a través de la cual ocurre la transferencia electrónica en los sistemas biológicos ha llevado a la utilización y desarrollo del concepto de tuneleo como alternativa al traslape directo de orbitales entre los centros donador y aceptor. Para explicar las reacciones de transferencia electrónica donde $k_{el} \ll 1$ se requiere tomar en cuenta el movimiento nuclear desde un tratamiento mecánico cuántico, introduciendo los términos de tuneleo electrónico y nuclear. En el desarrollo mecánico cuántico está involucrado el cálculo de la constante de rapidez la energía de acoplamiento electrónico H_{rp} , que es el elemento de matriz que describe el acoplamiento electrónico entre el estado electrónico de los reactivos con el de los productos.⁵

El tuneleo electrónico ocurre cuando los estados de reactivos y productos poseen la misma configuración nuclear en el punto de intersección, por lo que aunque el acoplamiento es pequeño existe una probabilidad de que ocurra la transferencia electrónica. El tuneleo nuclear ocurre aunque el sistema no se encuentre en el punto de intersección pero las superficies se encuentran cercanas por lo que la transferencia ocurre.⁵

Para proteínas que poseen el centro metálico cercano a la superficie, es razonable esperar que sea posible el traslape, entre orbitales con ciertos reactivos redox y las proteínas, dando lugar a una trayectoria favorable para la transferencia electrónica.

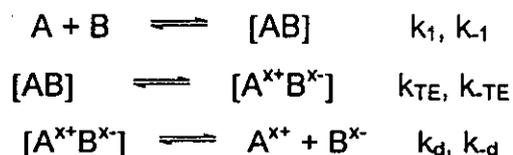
La química redox de metaloproteínas simples como citocromos, plastocianina y ferredoxina se ha estudiado de una manera extensa utilizando

técnicas químicas.^{3,4} Estas metaloproteínas se aíslan de diversas fuentes biológicas; tales como bacterias, algas o plantas superiores.

Se tiene un gran avance en la comprensión de la termodinámica y cinética de algunas reacciones de transferencia electrónica entre estas metaloproteínas simples gracias a avances experimentales y teóricos, aunque es evidente que varios aspectos de estos procesos aún necesitan ser explicados.⁴

El estudio de reacciones de transferencia electrónica en medio homogéneo con compuestos inorgánicos simples ha dado información cinética sobre el mecanismo de reacción. En un gran número de reacciones con reactantes inorgánicos que siguen un mecanismo de esfera externa, se observa un comportamiento cinético limitante y se observan desviaciones significativas a la cinética de segundo orden, lo que sugiere que el mecanismo de transferencia se lleva a cabo en varios pasos.

Una reacción homogénea de transferencia electrónica, que involucre una metaloproteína y un complejo inorgánico con propiedades óxido-reductoras requiere varios pasos para transferir el electrón de la proteína al complejo inorgánico. Se postula que el esquema de reacción mínimo debe involucrar: i) la difusión de los reactantes dando lugar a una interacción molecular entre ambos formándose un complejo precursor [AB], donde la distancia para la transferencia electrónica es óptima, ii) transferencia electrónica para formar el complejo [A^{x+}B^{x-}], y finalmente iii) la disociación del complejo sucesor para dar lugar a los productos.⁴



Esquema I. Mecanismo de reacción para la transferencia electrónica.

Del esquema de reacción I se pueden obtener varias leyes de rapidez límite. Por ejemplo, si la rapidez de transferencia electrónica es mucho mayor que la formación del complejo precursor [AB] se obtiene que $k_{\text{obsd}} \approx k_1$, la ley de rapidez sería equivalente a la de un proceso bimolecular de segundo orden. Por otro lado, si la rapidez de transferencia electrónica es el paso determinante de la reacción se obtiene que $k_{\text{obsd}} \approx k_1 k_{\text{TE}} / k_{-1}$.

Desde un punto de vista teórico la aplicación de la teoría de Marcus lleva a las siguientes conclusiones para que la transferencia electrónica en sistemas biológicos ocurra: la transferencia electrónica debe ocurrir a una distancia menor de 20 Å; el medio por el cual ocurre la transferencia debe ser propicio; el cambio de energía libre debe ser favorable y la transferencia electrónica no ocurrirá si el centro metálico se ve envuelto en un cambio estructural importante en la reacción redox.

Se ha concluido a través de varios estudios que para que una proteína posea un sitio de transferencia de electrones ideal es necesario lo siguiente:⁴

La geometría alrededor del ion metálico sea generada por el plegamiento de la proteína, lo que no permite reacomodos mayores al ocurrir el cambio en el estado de oxidación. Además, que el ion metálico se encuentre inmerso dentro de la proteína por lo que la posibilidad de que ocurran reacciones sobre el ion metálico debido a la presencia de moléculas pequeñas es mínima, se considera que la esfera de coordinación del ion metálico es inviolable. Por último, se observa que los ligantes alrededor del ion metálico en las proteínas de transferencia electrónica parecen ser seleccionados para facilitar la rápida transferencia electrónica, ya sea disminuyendo la carga central del metal o induciendo el bajo espín sobre el ion metálico; por ejemplo sulfuro e imidazoles.

2. 2 Plastocianina

La plastocianina (PCu) es una proteína azul de cobre de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de 10 500 g/mol. Contiene únicamente un sitio activo de cobre azul o tipo I, con sus características espectroscópicas

inusuales en su estado oxidado (cobre(II)), como son la absorción intensa en la región visible del espectro electromagnético, lo que da lugar al intenso color azul; además del acoplamiento hiperfino pequeño que se presenta en el espectro de resonancia paramagnética electrónica.⁶ Las plastocianinas han sido aisladas de una amplia variedad de plantas superiores y algas. En todos los casos poseen un solo centro de cobre tipo I unido a una cadena polipeptídica sencilla.

Hasta el momento se han secuenciado un número considerable de plastocianinas y se muestra que un gran número de residuos aminoácidos se conserva, en particular en las plastocianinas de plantas superiores.⁶ El balance de aminoácidos cargados en la secuencia aminoácida en la PCu a pH 7, resulta en una estimación de la carga total de la proteína de alrededor de -9 en su estado oxidado.

Freeman y colaboradores informaron la estructura de rayos-X de la PCu de álamo *Populus Nigra* (Figura 2.2).^{7,8}

La estructura es de forma cilíndrica con dimensiones de 40 X 32 X 28 Å y el sitio de enlace del metal se encuentra 6 Å dentro de la proteína. El interior de la proteína es de carácter hidrofóbico mientras que los aminoácidos cargados y polares se localizan de manera asimétrica en la superficie de la proteína dándole carácter hidrofílico. En el lado que contiene al átomo de cobre no se encuentran aminoácidos cargados, por el contrario, se trata de una superficie hidrofóbica que comprende los residuos aminoácidos 10, 12, 35, 36, 90, 91 y 92. Las proteínas poseen por el contrario, regiones cargadas negativamente en las posiciones 42-45 y 59-61. Estas regiones así como los residuos unidos al cobre His37, His87, Cys84 y Met92 se conservan en gran medida en plastocianinas de diferentes fuentes.⁶

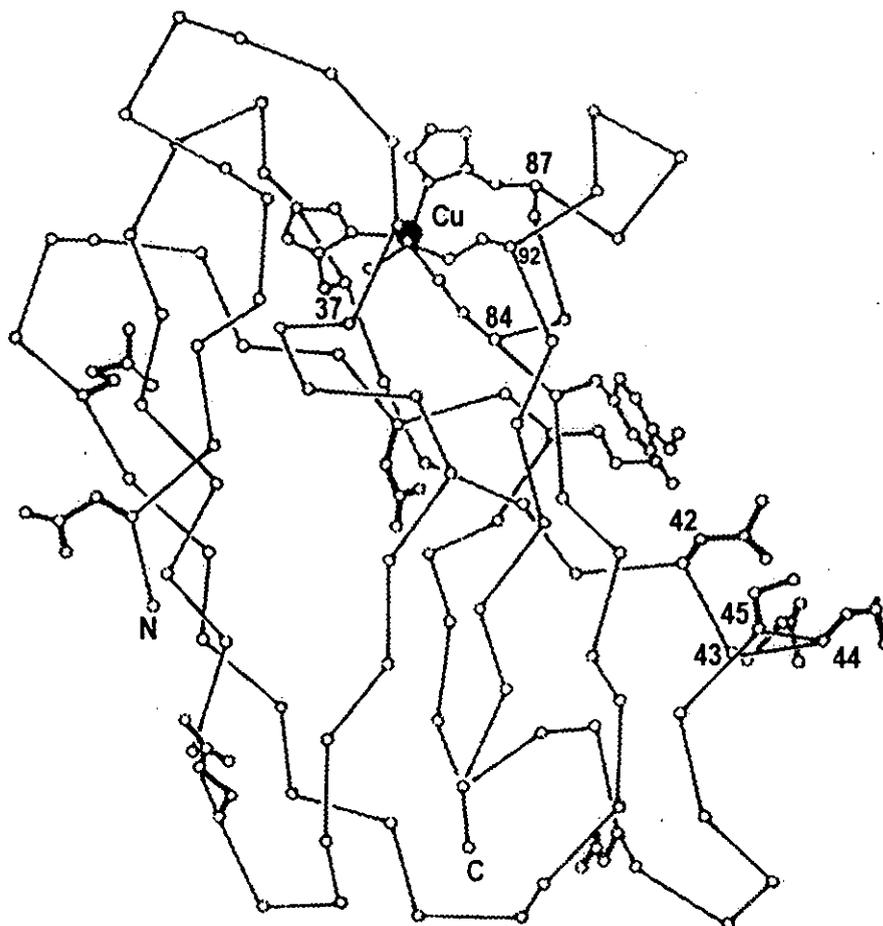


Figura 2.2 Estructura de plastocianina *Populus nigra*.⁸

El sitio activo consiste de un átomo de cobre y cuatro aminoácidos (His 37, His 87, Cys 84 y Met 92) de la cadena polipeptídica coordinados en un arreglo tetraédrico distorsionado. Dos de los ángulos de enlace del átomo de cobre difieren más de 20° de un tetraedro regular. La distancia de los dos enlaces Cu-N de los imidazoles de las histidinas y el enlace tiolato Cu-S(Cys) se consideran distancias normales (aproximadamente 2 Å), pero la distancia de enlace tio-eter Cu-S(Met) de 2.90 Å es bastante larga. Esta distancia inusual parece ser la responsable de la conservación de la estructura del sitio activo al llevarse a cabo la transferencia electrónica (Figura 2.3).⁷

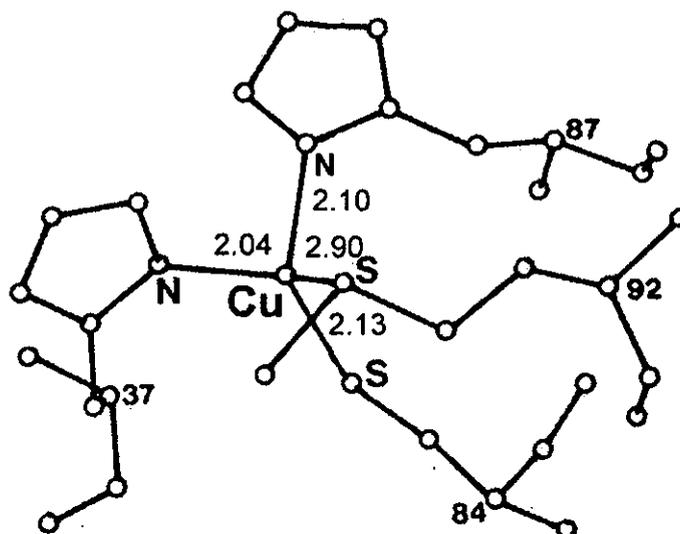


Figura 2.3 Sitio activo de la PCu

Este ambiente inusual para el átomo de cobre(II) explica las propiedades espectroscópicas de la proteína. Se ha encontrado que la absorción intensa alrededor de 600 nm se debe a una transferencia de carga cisteína-S(σ)-Cu(π). Los datos de resonancia paramagnética electrónica indican una distorsión rómbica a partir de una geometría axial, lo que es consistente con un ambiente tetraédrico distorsionado.⁶

Recientemente se han informado estructuras cristalográficas tridimensionales de la plastocianina aislada de cianobacterias, el alga verde *Enteromorpha prolifera*,⁹ así como de la proteína aislada de plantas superiores como el caso de la espinaca *Spinacia Oleracea*¹⁰ mostrándose en todos los casos la misma estructura tridimensional y sitio activo.

El potencial de oxido-reducción de la PCu es relativamente alto comparado con el del ion acuoso $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, lo que refleja el estado entáxico en el que se encuentra el ion metálico debido al ambiente distorsionado impuesto por la proteína, dando lugar a una estabilización del estado reducido cobre(I). Los valores del potencial se encuentran entre 347 y 395 mV dependiendo del origen de la proteína. Los estados de oxidación del ion metálico cobre involucrados en el ciclo redox en la transferencia de electrones en la cadena fotosintética son 1+ y 2+.

La PCu, es una molécula móvil localizada en el interior del tilacoide que se encarga del transporte de electrones entre los fotosistemas II y I en plantas superiores y algas durante el proceso de la fotosíntesis. Más específicamente, transfiere electrones del citocromo *f* al pigmento P700⁺ el cual es un componente del fotosistema I.¹¹ Existe una considerable asimetría en la distribución de la carga por lo que se postula que los complejos inorgánicos catiónicos y aniónicos utilizan diferentes sitios de enlace con la proteína. Se han propuesto dos sitios para la transferencia electrónica en PCu, el primero de ellos cercano al ion cobre y el otro por la región ácida formada por los residuos 42-45.^{11, 12}

2.3 Ferredoxina

Las ferredoxinas más simples son proteínas hierro-azufre que contienen un cúmulo [2Fe-2S] donde los átomos puente de azufre son lábiles. Las ferredoxinas se encuentran en diversos sistemas biológicos simples y complejos donde ocurren transferencias electrónicas.¹³

La ferredoxina (Fd) en los organismos fotosintéticos funciona como acarreador de electrones en los sistemas fotosintético y respiratorio. Específicamente la Fd es el aceptor electrónico final del fotosistema I, al ser reducida interactúa con la proteína ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) y una flavoproteína; catalizando la reducción del NADP⁺ a NADPH. La Fd es una proteína pequeña de peso molecular aproximadamente de 10 000 g/mol que consiste en un centro donde dos hierros no hemo se encuentran puenteados por dos sulfuros [2Fe-2S]; cada hierro se coordina además en un arreglo tetraédrico a 2 cisteínas de la cadena polipeptídica de la proteína. La estructura del complejo se puede formular como: [Fe₂S₂(SR)₄]³⁻ en su estado reducido. A través de resultados espectroscópicos se concluye que el estado oxidado comprende dos Fe(III) de alto espín no equivalentes; mientras que en el estado reducido se tiene un Fe(II) y un Fe(III) ambos de alto espín. Durante la transferencia electrónica en la cadena fotosintética, no importando la presencia de dos átomos metálicos, solamente es transferido un electrón por cada centro.⁴

El potencial de reducción de la Fd es muy bajo aproximadamente -420 mV. De la secuencia aminoácida se observa una carga negativa total de la proteína estimada en -17 para su estado reducido a $\text{pH} \approx 7$.

Se han resuelto las estructuras de rayos-X para varias ferredoxinas entre ellas la del alga azul *Spirulina plantesis*¹⁴ (figura 2.4); cabe resaltar de la estructura que los dos átomos de hierro se localizan a una distancia aproximada de 5 \AA de la superficie. Los datos espectroscópicos indican que el átomo de hierro más cercano a la superficie, el coordinado a los residuos Cys41 y Cys46, es el que participa en la transferencia electrónica. Lo anterior implica que el otro átomo de hierro posee un valor de E° mucho más negativo. El cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ es plano y la distancia Fe-Fe es de 2.72 \AA lo que es una evidencia de la interacción metal-metal. Cabe resaltar de la estructura una protuberancia sobre la superficie molecular de las dos cisteínas 41 y 46 que se coordinan a un átomo de Fe. El centro $[2\text{Fe-2S}]$ se encuentra predominantemente en una región hidrofóbica. Comparaciones de las secuencias de aminoácidos entre ferredoxinas de cloroplastos de diversos organismos como son algas verde-azules y plantas superiores indican que la cavidad de enlace del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]$ y los residuos vecinos se conservan en gran medida.¹⁵

La proteína oxidada es silenciosa a RPE y de color café-rojizo intenso, el color se ve disminuido en su estado reducido. En su estado reducido es paramagnética, mostrando un espectro de RPE a baja temperatura característico para un electrón desapareado (valor de g promedio < 2).

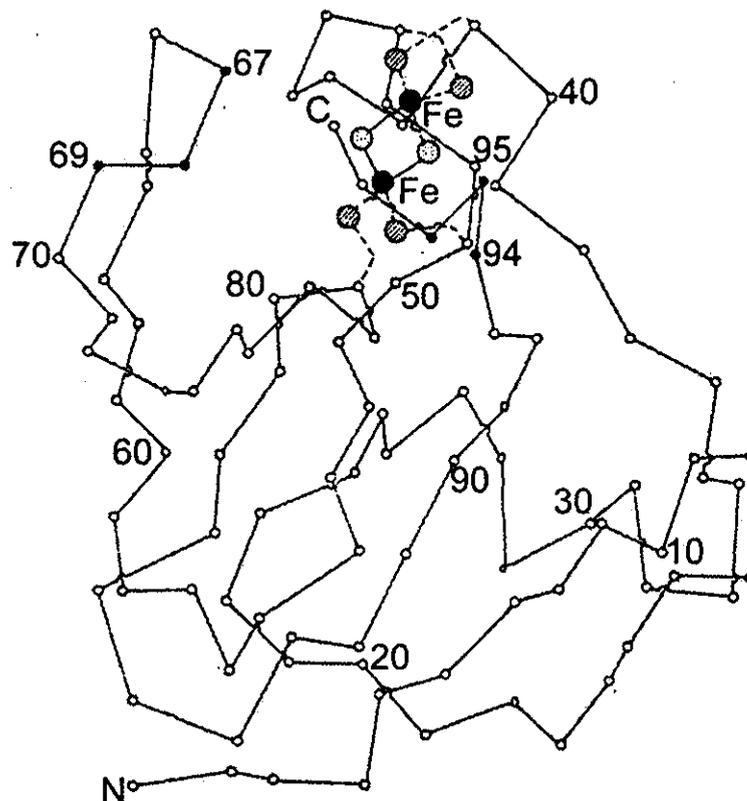


Figura 2.4 Estructura de ferredoxina de *Spirulina Plantesis*.¹⁴

A partir de espectroscopía Mössbauer ¹³ se concluye que el estado oxidado del centro hierro-azufre está constituido por dos átomos de Fe(III) de alto espín los cuales no son equivalentes, como lo indica el ensanchamiento del espectro, además en la presencia de un campo magnético no ocurre ninguna perturbación en el espectro, indicación de que el estado basal es diamagnético, provocado por un acoplamiento antiferromagnético a través de los puentes disulfuro S²⁻. En el estado reducido, las resonancias Mössbauer son debidas a los átomos discretos Fe(II) y Fe(III), indicando la localización del electrón desapareado en uno de los átomos de Fe.

En los centros **Fe-S** la habilidad de cambiar rápidamente entre dos estados de oxidación juega un papel importante en la transferencia electrónica local. Consideraciones teóricas muestran que los requerimientos de energía de activación global para el proceso de transferencia electrónica incluyen

contribuciones de la energía de reorganización para ajustar las configuraciones nucleares de los reactantes a la del estado de transición. La reorganización mínima del núcleo involucrado requiere poca energía de activación, por lo que se facilita la transferencia de electrones en los centros **Fe-S**.

Se realizaron estudios de cristalografía de rayos-X en el centro $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$ de la proteína *Chromatium HiPIP* (High Potential Iron-Sulphur Protein) en sus dos estados de oxidación. Los resultados indican que el cúmulo $[4\text{Fe-4S}]$ se contrae al oxidarse del nivel 2+ al 3+. Cambios importantes en las distancias interatómicas ocurren en la dirección de cuatro enlaces Fe-S paralelos donde ocurre una contracción de 0.16 Å (2.38 a 2.22 Å). En un segundo grupo de enlaces paralelos Fe-S ocurre una contracción promedio de 0.08 Å (2.33 a 2.25 Å). En la dirección ortogonal restante se observa una ligera expansión de 0.03 Å (2.25 a 2.28 Å). El efecto global se observa como el acercamiento entre dos caras 2Fe-2S opuestas.¹³

2.4 Estudios cinéticos en reacciones de transferencia electrónica en metaloproteínas.

Debido a la distancia, aproximadamente 10 Å, a la que se encuentran embebidos los sitios activos dentro de las proteínas, la transferencia electrónica se da a larga distancia, por lo que la rapidez de transferencia electrónica, aunque se trata de sistemas biológicos, es relativamente baja.

Desde finales de los años 70 se han informado en la literatura numerosas investigaciones de reacciones entre pequeños agentes redox y proteínas, ya que el uso de los reactivos sintéticos de estructura y reactividad conocida en lugar de los donadores o aceptores naturales facilita la interpretación de los resultados.^{3, 4}

El mecanismo que se aplica en los estudios de reacciones químicas redox homogéneas entre metaloproteínas y pequeñas moléculas inorgánicas en medios acuosos amortiguados se representa por el esquema I. Se observa la

formación del complejo precursor en una reacción en equilibrio (K_1) anterior a la transferencia electrónica, si la transferencia electrónica es el paso limitante se obtiene que $k_{obsd} = K_1 k_{TE}$.

Los resultados cinéticos de las reacciones de transferencia electrónica entre metaloproteínas y complejos inorgánicos sugieren que las metaloproteínas poseen la capacidad de proporcionar un mecanismo de transferencia electrónica sin importar que desde el punto de vista electrostático la interacción sea desfavorable, ya que se trata de interacciones entre especies altamente cargadas con carga neta del mismo signo. Por otro lado, se observa que utilizan diferentes sitios de asociación del complejo inorgánico para la transferencia electrónica dependiendo de su naturaleza.¹²

2.4.1 Estudios cinéticos de transferencia electrónica en plastocianina.

Se informan un número considerable de reacciones redox entre PCu y complejos inorgánicos así como con otras metaloproteínas entre ellas los citocromos *f* y *c*.^{16,17}

Los estudios de transferencia utilizando complejos inorgánicos simples se han realizado con los siguientes compuestos: $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$,¹⁸ $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$,¹⁹ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$,¹⁹ $[\text{Co}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$,²⁰ $[\text{Co}(\text{dipic})_2]^-$,²¹ $[\text{Co}(4,7\text{-DPSfen})_3]^{3-}$ ²² y $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$,¹⁹ entre otros. En un número considerable de reacciones se ha observado un comportamiento cinético limitante y se ha detectado una desviación importante de una cinética de segundo orden lo que sugiere un mecanismo redox de varios pasos. El comportamiento limitante se ha interpretado en términos de un mecanismo en el cual ocurre la asociación del oxidante o reductor con la proteína (K) seguida de la transferencia electrónica (k_{TE}).

Se ha postulado, debido a la considerable asimetría de la distribución de carga en la PCu, que los reactivos aniónicos y catiónicos utilizan distintos sitios

de unión a la proteína. Se postula que los complejos aniónicos se unen por el lado norte cercano a la His87, mientras que los complejos catiónicos se unen a la proteína por el lado este (figura 2.5).¹²

Por medio de estudios de resonancia magnética nuclear se ha identificado el principal sitio de unión de los compuestos catiónicos como: un sitio cercano a los residuos ácidos 42-45, conocido como el lado este o sitio ácido. Por otro lado, se ha demostrado que el área hidrofóbica cercana al residuo aminoácido His87 es el sitio preferido de los complejos aniónicos.²³ De estudios cinéticos se ha observado que la reacción de $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ se ve bloqueada por el complejo redox inactivo $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$,¹⁹ estudios de RMN muestran que el complejo $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ afecta el sitio hidrofílico por lo que se concluye nuevamente que el sitio de unión de los compuestos catiónicos es el lado este.²³

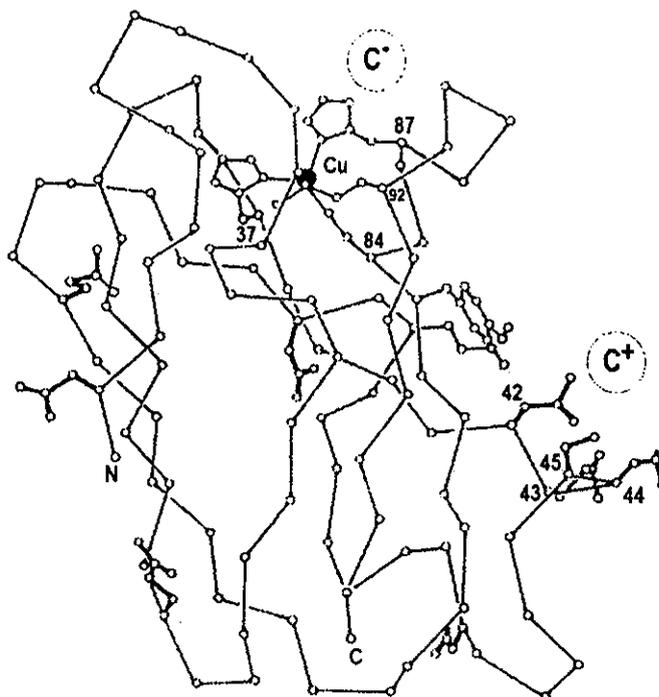


Figura 2.5. Estructura de plastocianina mostrando los sitios de unión de compuestos catiónicos C+ y aniónicos C-.

2.4.2 Estudios cinéticos con ferredoxinas [2Fe-2S] de cloroplastos.

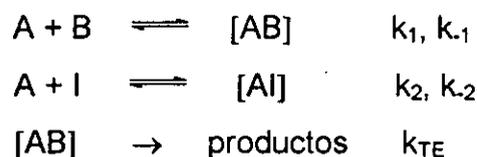
El bajo potencial de reducción característico de las ferredoxinas de cloroplastos impone restricciones experimentales sobre las reacciones con compuestos redox. Existe una limitación a la selección de agentes reductores suficientemente caracterizados a pH fisiológicos, con potenciales alrededor de -400 mV o menores, como es el caso del ditionito. El bajo potencial de reducción de la ferredoxina impone restricciones para la selección de agentes reductores, ya que deben poseer potenciales de reducción alrededor de -400 mV o menores. En el estudio cinético de la reacción de reducción de Fd con el ditionito, la ley de rapidez tiene una dependencia de $[\text{S}_2\text{O}_4]^{1/2}$.²⁴ Por otro lado, muchos de los oxidantes de un electrón comunes poseen potenciales de reducción relativamente altos y pequeñas barreras energéticas cinéticas para la transferencia electrónica. En consecuencia las reacciones de oxidación de las ferredoxinas reducidas son frecuentemente demasiado rápidas para estudiarse por medio de técnicas de flujo.

Los compuestos de coordinación de cobalto(III), en particular con ligantes donadores por nitrógeno, poseen potenciales de reducción bajos facilitando los estudios de reacciones de oxidación de ferredoxinas reducidas. Además de que una característica de las especies de cobalto(III) es que son inertes a la sustitución y que existe un amplio intervalo de tipos estructurales de compuestos sintetizables en forma pura, lo que permite investigar los efectos de factores como la carga y el tipo de ligante en la interacción con la proteína y la transferencia electrónica. Se han utilizado diversos oxidantes inertes a la sustitución que varían en carga y tipo de ligante como por ejemplo: $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$,²⁵ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$,²⁵ $[\text{Co}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$,²⁶ $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$,²⁵ $[\text{Co}(\text{EDTA})]^-$,²⁵ $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_6]^{4+}$,²⁶ y $[\text{Co}(\text{acac})_3]$.²⁶

Los estudios cinéticos de transferencia electrónica entre Fd y complejos inorgánicos han llevado a la conclusión de que existe un solo sitio de unión entre

los complejos inorgánicos y la metaloproteína donde se puede llevar a cabo la transferencia electrónica. En complejos catiónicos se observa una dependencia muy marcada de la constante de asociación K con la carga del oxidante,²⁵ lo que significa que el sitio funcional posee carga negativa. De la secuencia de aminoácidos se observan dos regiones negativas, la región aminoácida 67-69 y la 94-96 además de que el centro $Fe_2S_2(SR)_4^{3-}$ también es negativo y las Cys-41 y Cys-46 coordinadas al centro se encuentran expuestas. Los complejos aniónicos y neutros no muestran cinéticas limitantes lo que indica que no ocurre una asociación anterior a la transferencia electrónica; además el inhibidor de Cr(III) catiónico acelera la reacción en el caso de los complejos aniónicos y tiene efecto parcial en los neutros. Estos resultados indican que se presenta un solo sitio de asociación de todos los oxidantes a la proteína.¹⁵

De importancia considerable para entender el mecanismo de la transferencia electrónica entre metaloproteínas y los complejos inorgánicos son los estudios realizados utilizando complejos inorgánicos cargados pero inactivos a la transferencia electrónica. Por ejemplo los complejos inactivos de metales inertes con carga positiva como Cr^{3+} , Co^{3+} y Pt^{4+} ¹³ son capaces de asociarse a la metaloproteína en el mismo sitio que el reactivo redox activo con carga positiva, esta reacción de asociación competitiva da lugar a un mecanismo de bloqueo para la reacción con oxidantes que posean carga positiva.



Esquema II Mecanismo de inhibición de la transferencia electrónica.

Estudios sobre la asociación de los complejos inorgánicos a las metaloproteínas realizados por RMN 1H nos proporcionan una evidencia del mecanismo propuesto tanto para la transferencia electrónica como para la

inhibición, ya que se manifiesta la formación del aducto proteína-complejo metálico anterior a la transferencia electrónica, además de evidenciar el uso de diferentes sitios de asociación. Por ejemplo, para la ferredoxina el espectro de ^1H RMN muestra un desplazamiento y ensanchamiento paramagnético de los residuos Tyr82 y Tyr25, cercanos a los residuos aniónicos Asp22, Asp23 y Asp62 (figura 2.6), debido a la presencia de $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, se ha demostrado que inhibe la transferencia electrónica, disminuyendo la rapidez de reacción entre la ferredoxina y los complejos activos redox cargados positivamente. En contraste, la adición del compuesto redox inactivo de $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$ no tiene efecto alguno en la región aromática del espectro de ^1H RMN, lo que indica que la asociación del anión a la ferredoxina no ocurre en la misma región que en el caso de los cationes o no ocurre asociación alguna.^{4, 27} Hasta el momento no se ha determinado la ruta de la transferencia electrónica pero en todos los casos se trata de transferencia electrónica de largo alcance aproximadamente con distancias de 15 Å.²⁷

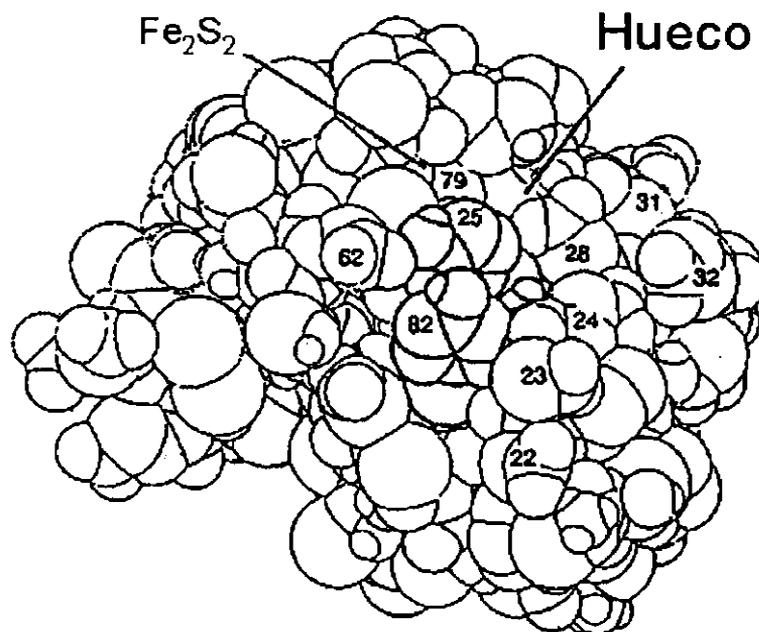


Figura 2.6 Estructura de la Fd de *A. Variabilis*, mostrando el sitio de unión.

2.5 Síntesis de compuestos de coordinación con ligantes imidazólicos.

El imidazol es un representante típico de un gran grupo de ligantes heterocíclicos con nitrógeno como átomo donador. El imidazol y sus derivados son componentes, como ligantes, de un gran número de moléculas con importancia biológica y principalmente debido a esto es que la química de coordinación de estas moléculas se ha desarrollado y sigue desarrollándose de manera extensa. Los compuestos de coordinación con derivados bencimidazólicos han llamado la atención ya que han servido de modelos de la estructura, así como de la reactividad de los iones metálicos en diversos sistemas biológicos.^{28-32.}

Por otro lado, se ha observado que diversos compuestos derivados del imidazol presentan actividades biológicas. Se ha demostrado que los derivados del imidazol poseen actividades biocidas por lo que son ampliamente utilizados en las industrias farmacéuticas y agroquímicas.^{30, 33} Además es conocido que los bencimidazoles muestran una gran variedad de propiedades farmacológicas como son antiinflamatoria, antimalaria, antihelmíntica, antiviral, antitumoral, anticonvulsiva y antifungal.³⁰ El tiabendazol, 2-(4-tiazolil)bencimidazol, es un conocido agente antihelmíntico, antimicótico y fungicida.³³

Se ha informado la síntesis y caracterización de compuestos de coordinación con una gran variedad de ligantes derivados del bencimidazol como son: el tris(2-bencimidacilmetil)amina, ligante polibencimidazólico tetradentado tripoidal, el 2-aminometilbencimidazol, el tiazolilbencimidazol, el 2-guanidinobencimidazol y el 2-(2'-piridil)bencimidazol como ligantes bidentados y el 2,6-bis(bencimidazolil)piridina como ligante tridentado por mencionar algunos. La mayoría de estas síntesis se realizaron con iones metálicos de transición lábiles como son: Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Cd^{2+} .²⁸⁻³³

En cuanto a compuestos de coordinación de ligantes imidazólicos y los iones metálicos Fe(III), Co(III) y Cr(III) se encuentra informados en la literatura un número pequeño de síntesis.^{28, 34-42}

Existe un número limitado de publicaciones de complejos de cromo(III) con el imidazol o sus derivados.³⁴ En su mayoría estos informes se tratan de compuestos utilizando el imidazol como ligante monodentado. Sin embargo, en 1971 se informó la síntesis de compuestos de coordinación mixtos de Cr^{3+} con los ligantes imidazólicos bidentados 2-guanidinobencimidazol y el 2-(2'-piridil)imidazol, además de la síntesis del compuesto tris(2-guanidinobencimidazol)cromo(III) a partir del compuesto $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{NCS})_6]$.³⁵

Nishida en 1980³⁶ informa la obtención de compuestos de coordinación de Fe^{3+} y el ligante tris(2-bencimidazolilmetil)amina. Buchanan en 1993²⁸ sintetizó un compuesto dinuclear de hierro(III) con puentes oxo con el ligante tripoidal polibencimidazólico tris(2-bencimidazolilmetil)amina con el objeto de modelar proteínas no hemo como la hemeritina. En 1995 y 1996 Palaniandavar informa la síntesis de compuestos mixtos de Fe(III) utilizando ligantes bencimidazólicos tridentados como análogos de dioxigenasas.^{37, 38} En la década de los ochenta se realizan estudios importantes sobre el llamado fenómeno de entrecruzamiento de espín, un grupo importante de compuestos que presentan dicho fenómeno son los compuestos de hierro(II) con ligantes nitrogenados heterocíclicos, como son los ligantes 2-(2'-piridil)bencimidazol y el 2,6-bis(bencimidazolil)piridina.^{39, 40} Durante el desarrollo de estos estudios se sintetizan compuestos de hierro(III) con los ligantes 2,6-bis(bencimidazolil)piridina y el 2,6-bis(N-metilbencimidazolil)piridina y se estudió la química redox así como los espectros de resonancia paramagnética electrónica.

Es hasta 1996 que se informa la síntesis de compuestos de Co(III) con ligantes bencimidazólicos, en este caso se tratan del 2-aminometilbencimidazol y su derivado 2-(-N-metilaminometil)bencimidazol. La síntesis se realiza a partir de una sal de Co(II) y su posterior oxidación, o alternativamente, a partir de la sustitución de ligantes en el compuesto de coordinación $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$.⁴¹ Más recientemente en 1998 se informa la síntesis de otro compuesto de Co(III) con el ligante 5-metil-2-(1-metilbencimidazol2-il)piridina.⁴²

3 Objetivos

- Sintetizar y caracterizar compuestos de coordinación con los iones metálicos **Co(III)**, **Cr(III)** y **Fe(III)** utilizando los ligantes bencimidazólicos: 2-guanidinobencimidazol **2gb**, *tris*(2-bencimidazolilmetil)amina **ntb**, 2-(aminometil)bencimidazol **2amb**, 2-(4-tiazolil)bencimidazol **4tb**, 2-(2'-piridil)bencimidazol **2pb** y 2,6-*bis*(bencimidazolil)piridina **bbimpy**.

- Entender el mecanismo de acción de los compuestos de coordinación de derivados de imidazoles que inhiben las actividades fotosintéticas, para lo cual se requiere:
 - ⇒ Aislar y purificar plastocianina y ferredoxina de plantas superiores.

 - Realizar el estudio cinético en las reacciones de transferencia electrónica en las metaloproteínas PCu y Fd y los compuestos de coordinación con ligantes derivados del imidazol.

 - ✓ Determinar a partir de RMN el sitio de unión de los compuestos bencimidazólicos, utilizando los compuestos de Cr(III), para evidenciar el sitio de unión en la PCu.

4. Sección Experimental

4.1. Reactivos.

Tris	Aldrich
Acetona técnica	
NaCl	Aldrich
$K_3[Fe(CN)_6]$	Aldrich
K_2HPO_4	Baker
KH_2PO_4	Sigma
Resina dietilaminoetil celulosa DE52	Whatman
Resina Sephadex G-75	Sigma
HCl concentrado	Mallinckrodt
Sacarosa comercial	
Ascorbato de sodio	Aldrich
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	Aldrich
Metanol	Aldrich
Metanol anhidro	Aldrich
$(NH_4)_2CO_3$	Aldrich
H_2O_2 al 30% v/v	Aldrich
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Aldrich
2-guanidinobencimidazol (2gb)	Aldrich
Solución HCl 1.029 N	Aldrich
$CrCl_3$ anhidro	Aldrich
Zn^0 granalla	Aldrich
Ditionito de sodio	Aldrich
DMSO	Aldrich
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Aldrich
$FeCl_3$ anhidro	Aldrich
$NaHCO_3$	Aldrich
Tris(bencimidazolilmetil)amina (ntb)	Aldrich

HNO ₃ concentrado	Aldrich
CCl ₃ COOH	Aldrich
Hg ⁰	Merck
H ₂ SO ₄ concentrado	Aldrich
1,10 fenantrolina (fen)	Aldrich
HClO ₄	Malincrodt
CrCl ₂	Aldrich
NaClO ₄	Aldrich
2,6-bis(bencimidazolil)-piridina (bbimpy)	Aldrich
2-(4-tiazolil)bencimidazol (4tb)	Aldrich
2-(2'-piridil)bencimidazol (2pb)	Aldrich
clorhidrato de 2-aminometilbencimidazol (2amb)	Aldrich
NaOH	Aldrich
Cr metálico	Aldrich

Todos los reactivos fueron de grado analítico a excepción de la sacarosa comercial y la acetona técnica. En todos los casos los reactivos se utilizaron sin ulterior purificación.

4.2 Equipos y material.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en un analizador elemental Fisons Instruments EA 1108 (CHNS-O), utilizando sulfanilamida y acetanilida como estándares de calibración.

Los espectros de IR (4000-400 cm⁻¹) se obtuvieron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier Perkin-Elmer 1600.

Los datos de difracción fueron colectados en 2 difractómetros: un difractómetro automático Siemens P4/PC y un difractómetro Siemens Smart-CD usando radiación monocromática de Mo-K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Las estructuras fueron resueltas utilizando el programa SHELXTL.⁴³

Los espectros electrónicos en disolución se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible HP8452A en el intervalo de 190 a 800 nm.

Los espectros de reflectancia difusa se obtuvieron en un espectrofotómetro Cary 5E en el intervalo de 40000 a 4000 cm^{-1} .

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en equipos Varian 300 y 400MHz así como en equipos JEOL 300 y 400 MHz.

Las mediciones de susceptibilidad magnética se realizaron en una balanza Johnson Matthey DG8 5HJ utilizando el método de Gouy, determinando el momento magnético por el método de Evans.

Los estudios cinéticos se realizaron en un equipo "Stopped Flow" Applied Photophysics modelo SW18. Con un baño de recirculación marca Endocal RTE-110 para mantener las temperaturas (± 0.1 °C).

Los espectros de RMN de ^1H para el estudio de la plastocianina se realizaron en un equipo Varian de 500MHz.

4.3 Aislamiento y purificación de metaloproteínas.

En este proyecto se desarrollaron técnicas para aislar ferredoxina y plastocianina de hojas de plantas superiores, modificando técnicas informadas en la literatura.⁴⁴⁻⁴⁷

El aislamiento y purificación de estas metaloproteínas se realiza de manera simultánea y utilizando una gran cantidad de materia prima. Todos los procedimientos se realizan a temperatura de 0-4 °C dentro de un cuarto frío.

4.3.1 Aislamiento a partir de hojas de espinaca.

Se parte de 10 kg de hojas de espinaca frescas lavadas, drenadas y sin tallo. Se empacan en lotes de 1 kg y se refrigeran hasta que son utilizadas.

a) Extracción de cloroplastos.

Se extraen en primer lugar los cloroplastos y para ello se homogeneizan las hojas en lotes de 1 kg con 900 g de hielo picado, 100 mL de solución amortiguadora Tris/HCl (1 M) pH ≈ 7 y 1 L de una solución de sacarosa/NaCl

(0.6 M/0.075 M) utilizando una licuadora de 4 L. El homogeneizado se filtra a través de varias capas de telas tipo gasa; el filtrado es entonces centrifugado por 10 min a 10 000 r.p.m. y se descarta el sobrenadante. Los cloroplastos que contienen las metaloproteínas son entonces resuspendidos en solución amortiguadora Tris/HCl (0.5 M) pH \approx 7.

b) Extracción de las metaloproteínas.

La extracción de las metaloproteínas se realiza adicionando lentamente con agitación constante acetona helada (-20 °C) hasta un 35 % del volumen total, con lo cual se rompe el cloroplasto, liberándose las proteínas. Los fragmentos de cloroplasto se retiran por centrifugación y se recupera el sobrenadante. Las metaloproteínas, en el sobrenadante, son entonces precipitadas al agregar acetona helada (-20 °C) hasta un 80 % del volumen total, el precipitado formado se deja reposar por 4 horas.

4.3.2 Aislamiento a partir de hojas de perejil.

a) Extracción directa de las metaloproteínas.

Se homogeneizan las hojas en lotes de 1 kg utilizando 900 g de hielo picado, 100 mL de solución amortiguadora Tris/HCl (1 M) pH \approx 7 y 1 L de acetona helada (-20 °C). El homogeneizado se filtra a través de varias capas de telas; el filtrado es entonces centrifugado por 7 min a 8 000 r.p.m. El sobrenadante se recupera y se trata con un volumen de acetona (-20 °C) equivalente a 1.2 veces el volumen del sobrenadante. El precipitado formado se deja reposar por 4 horas.

4.3.3 Separación de PCu y Fd.

En ambos casos el precipitado café claro se resuspende en solución amortiguadora Tris/HCl (0.06 M) pH \approx 7. El resuspendido se dializa por 6 horas

aproximadamente con el mismo buffer previamente desgasificado para remover impurezas de bajo peso molecular.

La separación de las proteínas se realiza por medio de cromatografía de intercambio aniónico ya que ambas metaloproteínas poseen carga negativa. La PCu tiene carga de -9 y la Fd de -18 en sus estados reducidos, a pH 7.

El dializado café-rojizo se centrifuga para remover cualquier material insoluble y se carga en una columna DE52 (resina de intercambio aniónico) previamente equilibrada en Tris/HCl (0.06 M) pH \approx 7. La columna se equilibra al eluir la columna con 3 veces el volumen del buffer correspondiente, con respecto al volumen de resina, previamente a la carga de las proteínas.

La PCu se eluye en primer lugar por la solución amortiguadora anterior que contiene NaCl 0.2 M. La PCu es eluida en su estado reducido por lo que su presencia se verifica adicionando $K_3[Fe(CN)_6]$ lo que da una coloración verde-azulosa.

La Fd oxidada se eluye por la misma solución amortiguadora previamente degasificada, conteniendo NaCl 0.5 M.

4.3.4 Purificación de plastocianina y ferredoxina.

La PCu aislada se reduce con ascorbato de sodio, se adiciona un volumen de H_2O destilada fría equivalente al triple del volumen de la solución que contiene la proteína. La proteína diluida se carga en una columna DE52 equilibrada con solución de fosfatos (20 mM) pH \approx 7.0. Se eluye la proteína con una solución amortiguadora de fosfatos (0.15 M) pH 7.0, su presencia se prueba oxidándola con $K_3[Fe(CN)_6]$. En su forma oxidada se adiciona un volumen de H_2O destilada fría equivalente al triple del volumen de la proteína. La PCu oxidada se carga nuevamente a otra columna DE52 y se eluye con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M) pH 7.0. El eluido de la columna anterior se concentra por ultrafiltración, en un equipo de ultrafiltración Amicon y utilizando

una membrana YM5, a un volumen aproximado de 30 mL. Por último, utilizando la PCu concentrada se lleva a cabo una filtración en gel (Sephadex G-75).

La ferredoxina se purifica únicamente por medio de una columna cromatográfica de filtración en gel (Sephadex G-75) en condiciones anaerobias. Anteriormente a esta columna la Fd es concentrada por medio de ultrafiltración.

4.4 Síntesis de compuestos de coordinación.

Se sintetizaron y caracterizaron por medio de espectroscopía IR, análisis elemental, susceptibilidad magnética, espectroscopía electrónica en estado sólido y disolución y resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C (Co(III)) los compuestos de coordinación con los ligantes 2-guanidinobencimidazol (**2gb**), tris(2-bencimidazolmetil)amina (**ntb**), 2-(aminometil)bencimidazol (**amb**), 2-(4-tiazolil)bencimidazol (**4tb**), 2-(2-piridil)bencimidazol (**2pb**) y 2,6-bis(2-bencimidazolil)piridina (**bbimpy**) y los iones metálicos Co^{3+} , Cr^{3+} y Fe^{3+} para utilizarse como oxidantes o inhibidores para las reacciones de transferencia electrónica de la PCu y la Fd.

4.4.1 Síntesis de los compuestos de cobalto(III) con ligantes imidazólicos.

Para realizar dichas síntesis se parte de los compuestos $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$ o $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ cuyas síntesis se encuentran informadas en la literatura.^{48, 49}

$[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$. Se disuelve en 60 mL de H_2O 0.21 mol (20 g) de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y se le adiciona a la disolución anterior 60 mL de NH_4OH concentrado. Se mezcla con agitación con una disolución de 0.052 mol (15 g) de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 30 mL de H_2O . Posteriormente se agregan lentamente y con agitación 8 mL de H_2O_2 al 30% v/v. Se evapora la solución a un volumen entre 90 y 100 mL sin permitir que la solución ebulle. Durante la evaporación se agregan porciones de 5g de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. La solución caliente se filtra para retirar

impurezas solubles y el compuesto filtrado se enfría y se lava con H₂O y etanol. Rendimiento: 25.86%

Na₃[Co(CO₃)₃]-3H₂O. A 50 mL de una solución de 0.1 mol (29.1 g) de Co(NO₃)₂·6H₂O y 10 mL de H₂O₂ al 30% v/v se le adiciona gota a gota y con agitación a una solución fría de 0.5 mol (42 g) de NaHCO₃ en 50 mL de H₂O. Se deja reposar 1 hora con agitación a 4° C. El precipitado se filtra y lava con agua fría y etanol. Rendimiento: 75%.

[Co(fen)₃](ClO₄)₃. Se sintetizó el compuesto [Co(fen)₃](ClO₄)₃ informado previamente en la literatura.⁵⁰ La síntesis se llevó a cabo por medio de un procedimiento alterno partiendo de Na₃[Co(CO₃)₃]-3H₂O como materia prima. Una solución acuosa de 3 mmol (0.540 g) de 1,10-fenantrolina con 3 mL de HNO₃ concentrado se adicionan con agitación a una suspensión de 1 mmol (0.361 g) de Na₃[Co(CO₃)₃]-3H₂O en H₂O. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 4 horas. La solución se deja enfriar y precipita el compuesto al agregar NaClO₄. El compuesto amarillo se filtra y lava con H₂O y etanol. Rendimiento 65%.

[Co(bbimpy-H)₂](OH). Una solución de 2 mmol (0.622 g) de bbimpy en 50 mL de etanol caliente se adiciona a una suspensión de 1 mmol (0.249 g) de [Co(NH₃)₄CO₃]NO₃; se agregan 2 mL de HCl 1.029 N. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 7 horas. El precipitado amarillo se filtra al vacío y lava con etanol. Rendimiento 73 %.

[Co(2pb)₂(NO₃)](NO₃)₂·C₂H₆O. Se disuelven en etanol 3.3 mmol (0.390 g) de 2pb con 3 mL de HNO₃ concentrado y se adicionan con agitación a una suspensión de 1 mmol (0.361 g) de Na₃[Co(CO₃)₃]-3H₂O en etanol. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 4 horas. Se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente y el compuesto amarillo se filtra al vacío y lava con etanol. Rendimiento 47.6%.

[Co(2gb)₃]Cl(NO₃)₂•H₂O Una solución de 4 mmol (0.700 g) de 2gb en 30 mL de metanol se adiciona a una suspensión de 1 mmol (0.249 g) de [Co(NH₃)₄CO₃]NO₃ se agregan 2 mL de HCl 1.029 N. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 7 horas. El precipitado rojizo se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 85.6%.

[Co(2gb)₃](CCl₃COO)₃•H₂O. Se disuelven en metanol 3 mmol (0.525 g) de 2gb y se adicionan con agitación a una suspensión de 1 mmol (0.361 g) de Na₃[Co(CO₃)₃]•3H₂O en metanol. Se utiliza CCl₃COOH. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 6 horas. El precipitado rojizo se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 64.5%.

[Co(2gb)₃]Cl₃•3H₂O. Se disuelven por separado en 30 mL de metanol 1mmol (0.237 g) de CoCl₂•3H₂O y 5 mmol (0.875 g) de 2gb. Se mezclan las soluciones y se calienta a reflujo por 5 horas. Se obtiene un precipitado rosa el cual se aísla y lava con metanol. Rendimiento:64.2%.

[Co(ntb)Cl]Cl(NO₃)₃•3H₂O. Una solución de 1 mmol (0.400 g) de ntb en 30 mL de metanol se adiciona a una suspensión de 1 mmol (0.249 g) de [Co(NH₃)₄CO₃]NO₃ se agregan 2 mL de HCl 1.029 N como catalizador. La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 24 horas. Se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente y el compuesto violeta se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 72.4%.

[Co(2amb)₃]Cl₃•2H₂O. Esta síntesis se encuentra informada en la literatura por Mc Fayden.⁴¹ Una solución de 4.5 mmol (1 g) del clorhidrato dihidratado del 2 aminometilbencimidazol (2amb) en 13 mL de H₂O se neutraliza con 0.305 g de NaOH y se adiciona con agitación a una solución acuosa de 1.5 mmol (0.36 g) de CoCl₂•2H₂O. A la mezcla anterior se le adiciona carbón

activado y 10 mL de metanol. Se burbujea aire por 6 horas. El compuesto se aísla por filtración y se lava con H₂O y metanol. Rendimiento: 75.6%.

4.4.2 Síntesis de los compuestos de cromo(III) con ligantes imidazólicos.

[Cr(2gb)₃]Cl(ZnCl₄)·CH₄O y **[Cr(2gb)₃]Cl₃·4H₂O**. 1 g (6.3 mmol) de CrCl₃ anhidro se suspende en 50 mL de metanol anhidro se agregan 10 mg de granalla de Zn e inmediatamente se adiciona con agitación una solución de 3.3 g (18.9 mmol) de 2gb en metanol anhidro. Se agita la mezcla reaccionante por 5 min y se calienta a 40 ° C por 5 horas. Inmediatamente se forma un precipitado rosa oscuro el cual se filtra y lava con metanol **[Cr(2gb)₃]Cl(ZnCl₄)·CH₄O**. El disolvente de las aguas madres se deja evaporar a temperatura ambiente y se obtiene un compuesto rosa el cual se aísla y lava con metanol **[Cr(2gb)₃]Cl₃·4H₂O**. Rendimientos: **[Cr(2gb)₃]Cl(ZnCl₄)·CH₄O** 2.4% y **[Cr(2gb)₃]Cl₃·4H₂O** 95.2%.

[Cr₂(2gb)₄(μ-OH)₂](ClO₄)₄·5H₂O. Esta reacción se realiza en condiciones anaerobias, en línea de vacío. En primer lugar es necesario preparar una solución 1 M de Cr(H₂O)₆²⁺. La solución de cromo(II) se prepara con 10 mmol (1.22 g) de CrCl₂ anhidro en 10mL de HClO₄ 2M desgasificado. La síntesis se realiza con una solución de 3 mmol (0.525 g) de 2gb en metanol la cual es desgasificada y se le agrega con agitación 1 mL de la solución acuosa de cromo(II). La solución morada obtenida se oxida con aire y se le agrega 2 g de NaClO₄. Rendimiento 48.1%.

[Cr(ntb)Cl₂]Cl·3H₂O. Se coloca 1mmol (0.158 g) de CrCl₃ anhidro en el filtro dedal de un extractor Soxhlet junto con una pequeña porción de una amalgama Zn-Hg previamente activada en H₂SO₄ diluido. En el matraz se coloca 1 mmol (0.400 g) de ntb en 60 mL de metanol anhidro. Se burbujea N₂ por 10 min antes de iniciar el calentamiento. Se comienza la extracción del CrCl₃ como una solución verde que reacciona con el ligante, cuando todo el CrCl₃ ha sido

extraído se continúa el reflujo 1 hora. El precipitado verde se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 42.3%.

[Cr(bbimpy)Cl₃] \cdot 1/2H₂O. Se coloca 1mmol (0.158 g) de CrCl₃ anhidro en el filtro dedal de un extractor Soxhlet junto con una pequeña porción de una amalgama Zn-Hg previamente activada en H₂SO₄ diluido. En el matraz se coloca 2 mmol (0.622 g) de bbimpy y 60 mL de etanol anhidro caliente. Se burbujea N₂ por 10 min antes de iniciar el calentamiento. Se comienza la extracción del CrCl₃ como una solución verde que reacciona con el ligante, cuando todo el CrCl₃ ha sido extraído se continúa el reflujo 1 hora. El precipitado verde se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 92.6%.

[Cr(4tb)₂Cl₂]Cl \cdot 1.5C₂H₆O. Se coloca 1mmol (0.158 g) de CrCl₃ anhidro en el filtro dedal de un extractor Soxhlet junto con una pequeña porción de una amalgama Zn-Hg previamente activada en H₂SO₄ diluido. En el matraz se coloca 3 mmol (0.603 g) de 4tb y 60 mL de etanol anhidro. Se burbujea N₂ por 10 min antes de iniciar el calentamiento. Se comienza la extracción del CrCl₃ como una solución verde que reacciona con el ligante, cuando todo el CrCl₃ ha sido extraído se continúa el reflujo 1 hora. El precipitado gris se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 91%.

[Cr(2pb)₂Cl₂]Cl \cdot 2H₂O. Se coloca 1mmol (0.158 g) de CrCl₃ anhidro en el filtro dedal de un extractor Soxhlet junto con una pequeña porción de una amalgama Zn-Hg previamente activada en H₂SO₄ diluido. En el matraz se coloca 3 mmol (0.582 g) de 2pb y 60 mL de etanol anhidro caliente. Se burbujea N₂ por 10 min antes de iniciar el calentamiento. Se comienza la extracción del CrCl₃ como una solución verde que reacciona con el ligante, cuando todo el CrCl₃ ha sido extraído se continúa el reflujo 1 hora. El precipitado verde se filtra y lava con metanol. Rendimiento: 49.5%.

4.4.3 Síntesis de los compuestos de hierro(III) con ligantes imidazólicos.

[Fe(DMSO)₆](NO₃)₃⁵¹. Se calienta una solución de 2 g de Fe(NO₃)₃·6H₂O en 50 mL de DMSO seco hasta la formación de un precipitado amarillo claro. El compuesto se aísla y seca al vacío. Rendimiento: 69%.

[Fe(2gb)₃](NO₃)₃. Para realizar dicha síntesis se parte del compuesto [Fe(DMSO)₆](NO₃)₃ se disuelve 1 mmol (0.710 g) del compuesto en 15 mL de acetonitrilo anhidro y se le adiciona una solución de 3 mmol (0.525 g) de 2gb en 30 mL de acetonitrilo anhidro. Se mezclan ambas soluciones y se calienta a reflujo por 24 horas en condiciones anhidras, utilizando una trampa de CaCl₂. El compuesto amarillo precipita y se aísla por medio de filtración. Rendimiento: 83.7%.

[Fe(ntb)Cl₂]Cl·3H₂O. Se disuelve 0.808 mmol (0.329 g) de ntb en 15 mL de etanol. A la solución se le agrega con agitación una solución de 0.814 mmol (0.220 g) de FeCl₃·6H₂O en 10 mL de etanol. De la solución roja se aísla un compuesto rojo por evaporación del disolvente a temperatura ambiente. Rendimiento: 48.2%.

[Fe(bbimpy)Cl₃]·3H₂O. Se disuelve 1 mmol (0.162 g) de FeCl₃ anhidro en 20 mL de acetonitrilo seco. Esta solución se le agrega con agitación y calentando a una suspensión de 2 mmol (0.622 g) de bbimpy en 30 mL de acetonitrilo seco. Se deja enfriar la solución con agitación y el precipitado café formado se deja reposar 1 hora. El compuesto se filtra y lava con acetonitrilo seco. Rendimiento: 37%.

[Fe(4tb)₃]Cl₃. Se disuelve 1 mmol (0.162 g) de FeCl₃ anhidro en 20 mL de acetonitrilo seco. Se adiciona con agitación y calentando una solución de 3 mmol (0.603 g) de 4tb en 30 mL de acetonitrilo seco. Se deja enfriar la solución con agitación y el precipitado café formado se deja reposar 1 hora. El compuesto se filtra y lava con acetonitrilo seco. Rendimiento: 30.5%.

[Fe(2pb)₂Cl₂]Cl·H₂O. Se disuelve 1 mmol (0.162 g) de FeCl₃ anhidro en 20 mL de acetonitrilo seco. Se adiciona con agitación y calentando una solución de 3 mmol (0.582 g) de 2pb en 30 mL de acetonitrilo seco. Se deja enfriar la solución con agitación y el precipitado café formado se deja reposar 1 hora. El compuesto se filtra y lava con acetonitrilo seco. Rendimiento: 32%.

4.5 Estudios de estabilidad de los compuestos de coordinación en disolución.

Se preparan 10 mL de una disolución 1 mM de cada uno de los compuestos de coordinación en una mezcla de DMSO/H₂O 10% o 50% v/v según sea su solubilidad. El pH se fija en 7.0 con buffer Tris/HCl 10mM y NaCl 0.1 M. El espectro electrónico se obtiene en un equipo Hewlett Packard HP8452 en el intervalo de 200 a 800 nm, a una temperatura fija de 25 °C ± 0.1.

4.6 Estudios cinéticos de la transferencia electrónica entre las metaloproteínas y los compuestos de coordinación de derivados bencimidazólicos.

4.6.1 Reacciones de transferencia electrónica.

Una vez que se tienen las metaloproteínas puras se realiza el estudio cinético mediante técnicas de mezclado rápido y flujo detenido ("*stopped-flow*"). Se observa el efecto que tienen nuestros compuestos de coordinación de derivados imidazólicos en las metaloproteínas en su forma reducida.

Parte de la PCu utilizada en los estudios cinéticos fue un obsequio del Prof. M. Ejdebäk de la Universidad de Göteborg en Suecia. Obtenida por la sobreexpresión del gen en *Escherichia Coli*.

Condiciones experimentales utilizadas para las reacciones con la PCu:

- Solución amortiguadora de Tris/HCl (20 mM) pH=7.0 y 8.0, fuerza iónica constante, $I = 0.03$ M (NaCl). Solución DMSO/H₂O al 25% v/v.
- Metaloproteína en su forma reducida (exceso ditionito (Na₂S₂O₄)), concentración de la proteína aproximadamente 10^{-5} M
- Se dializa la proteína para eliminar el exceso de reductor, de esta manera se evitan reacciones secundarias.
- Condiciones de pseudo-primer orden. Exceso de oxidante (compuestos de coordinación de los derivados bencimidazólicos). Se varía la concentración del oxidante.
- Técnicas de mezclado rápido (*stopped-flow*). Equipo Applied Photophysics. La constante observada k_{obs} se calcula para $\lambda = 600$ nm.
- Se varía la temperatura en el intervalo de 19 °C a 30 °C.

Condiciones experimentales utilizadas para las reacciones con la Fd:

- Se trabaja en condiciones anaerobias absolutamente libre de O₂. La Fd, se desnaturaliza al contacto con el O₂ rompiéndose los puentes disulfuro.⁵²
- Solución amortiguadora Tris/HCl (20mM) pH 8, fuerza iónica constante $I = 0.03$ M (NaCl).
- Metaloproteína en su forma reducida (exceso ditionito), concentración de la proteína aproximadamente 10^{-5} M
- Condiciones de pseudo-primer orden. Exceso de oxidante (compuestos de coordinación de los derivados bencimidazólicos). Se varía la concentración del oxidante.

- Técnicas de mezclado rápido (*stopped-flow*). Equipo Applied Photophysics. La constante observada k_{obs} se calcula para $\lambda = 422$ nm.
- Se varía la temperatura en el intervalo de 19° C a 30 ° C.

4.6.2 Reacciones de inhibición competitiva para la plastocianina.

Se utilizan las mismas condiciones experimentales que en las reacciones de transferencia electrónica manteniendo la temperatura constante en 25 ± 0.1 °C.

Se utilizan diversas concentraciones del compuesto redox inactivo (inhibidor) siempre en exceso con respecto al oxidante $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$.

4.7 Estudios de RMN para la plastocianina.

La PCu se reduce con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y se intercambia el buffer en H_2O por una solución amortiguadora de fosfatos (30 mM) a pH=7.0 en 99.8% D_2O por medio de ultrafiltración en un equipo Amicon utilizando una membrana YM5. La concentración final de la PCu reducida es aproximadamente 1.5 mM.

En primer lugar se adquiere el espectro de RMN ^1H de la proteína reducida, posteriormente se le adiciona con una micropipeta DMSO- d_6 hasta un 22% v/v y se adquiere nuevamente el espectro. Por último, se le adiciona a esta disolución de proteína mediante una micropipeta 0.3 mol equivalente (5 μL) de $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$, de una solución 0.05 M en DMSO- d_6 . Se adquiere nuevamente el espectro de RMN ^1H .

5. Análisis de Resultados y Discusión

5.1 Aislamiento, purificación y caracterización de Plastocianina (PCu) y Ferredoxina (Fd).

La PCu no se obtiene de manera comercial, por otro lado la Fd se puede adquirir de Aldrich pero no suficientemente pura y a un alto costo; por lo tanto es importante contar con métodos rápidos y convenientes para el aislamiento de estas metaloproteínas.

Durante el desarrollo del proyecto de investigación se utilizaron dos métodos de aislamiento, en el primer método las metaloproteínas se aíslan a partir de 10 kg de hojas de perejil frescas; en el segundo método se utilizaron 10 kg de hojas de espinaca frescas.

El primer método utilizado se basa en el aislamiento informado por Plesnicar y Bendall en 1970,⁴⁵ en este procedimiento se utiliza 1 L de acetona (-20 °C) por kilo de hojas lavadas. Por lo que se utilizan por aislamiento aproximadamente 15 L de acetona; lo que eleva de manera importante el costo de la preparación y el riesgo, ya que el aislamiento se realiza en el cuarto frío el cuál no posee ventilación adecuada. Adicionalmente, se obtuvo un bajo rendimiento en el aislamiento ya que en este método se utiliza una extracción inicial con acetona, la cual además de las proteínas extrae diversos componentes membranales como son lípidos, clorofilas y carotenoides los cuales interfieren en las columnas cromatográficas y en la detección de las proteínas; por lo que son necesarios varios procedimientos de cromatografía de intercambio aniónico para la purificación.

El método utilizado en este proyecto para el aislamiento de la PCu y Fd a partir de hojas de espinaca posee una diferencia importante con respecto al aislamiento a partir de hojas de perejil ya que en este caso no se utiliza 1 L de acetona por kilo de hojas, dado que en primer lugar se aíslan los cloroplastos en solución acuosa y posteriormente se realiza el rompimiento de la membrana del

cloroplasto al agregar acetona (-20°C) hasta una concentración de 35% v/v. La extracción de los cloroplastos evita la contaminación, por los diversos componentes membranales, clorofilas, etc., de la Fd y PCu aisladas.

El procedimiento utilizado es una modificación a los informados por Borchert en 1970⁴⁴ y Morand en 1993.⁴⁷ En el método informado en 1970, se realiza por vez primera el aislamiento simultáneo de Fd y PCu dando buenos rendimientos, la modificación realizada a este método radica en que durante la extracción de cloroplastos no se utilizó Triton X-100 como se informa en cambio se utiliza una solución de sacarosa/Cl⁻ como en el método informado en 1993 por Monrad, las modificaciones al método de Monrad realizadas se encuentran en la purificación, ya que en nuestro caso se utiliza cromatografía de intercambio aniónico como lo informa Borchert en lugar de la precipitación por (NH₄)₂SO₄.

Con este procedimiento se aíslan simultáneamente las dos metaloproteínas eluyéndose en primer lugar la PCu, con una carga negativa de 9 a pH aproximado de 7, utilizando una concentración de cloruros del eluyente de 0.2 M y posteriormente al aumentar la concentración de cloruros del eluyente a 0.5 M la Fd, con una carga negativa de 17 a un pH aproximado de 7, eluye.

El aislamiento a partir de hojas de espinaca frescas resultó ser el más conveniente a nuestra infraestructura obteniéndose un mayor rendimiento y pureza de las metaloproteínas.

Una vez realizado el aislamiento de la Fd y PCu se llevó a cabo su purificación por medio de columnas de cromatografía, en primer lugar por medio de una resina DE52 de intercambio aniónico y por último se concentra la proteína por ultrafiltración a un volumen menor a 10 mL y se carga en una columna de filtración en gel, donde la separación se lleva a cabo por tamaños. La concentración final de las metaloproteínas puras es aproximadamente 5×10^{-5} M. El rendimiento aproximado fue de 1.5 mg de proteína pura por kilogramo de hoja.

La caracterización y verificación de la pureza de la PCu se realiza por medio de espectroscopia UV-Visible. En el espectro electrónico de la PCu(II) de espinaca a pH = 7 se observa un máximo de absorción en 597 nm ($\epsilon = 4.9 \times 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹), además de una relación de absorción de máximos $A_{278}/A_{597} = 1.69$ ^{11, 19}.

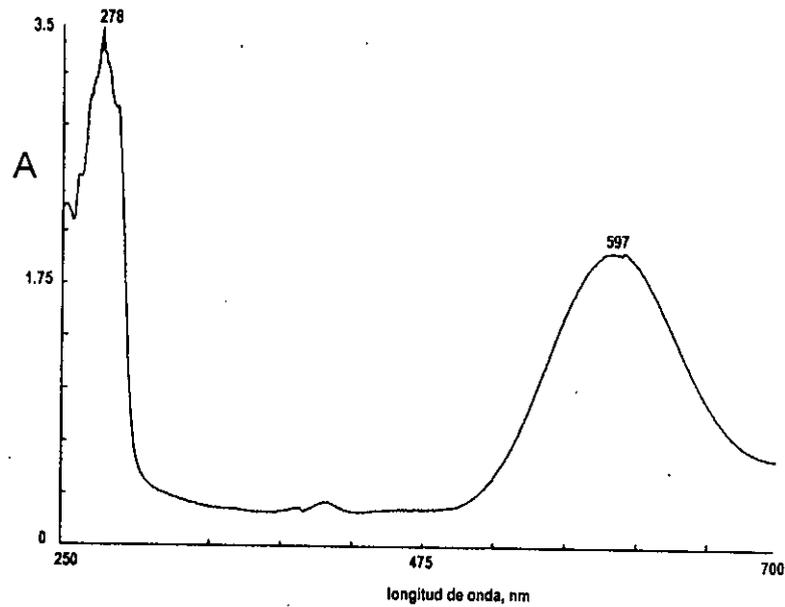


Figura 5.1 Espectro UV- visible de la plastocianina de espinaca.

La Fd de espinaca se caracteriza y verifica su pureza de la misma manera, por espectroscopia UV-Visible ya que en el espectro electrónico se observa una banda de absorción cuyo máximo está en 277 nm ($\epsilon = 14.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y una relación de absorción de picos $A_{422}/A_{277} = 0.61$.²⁵

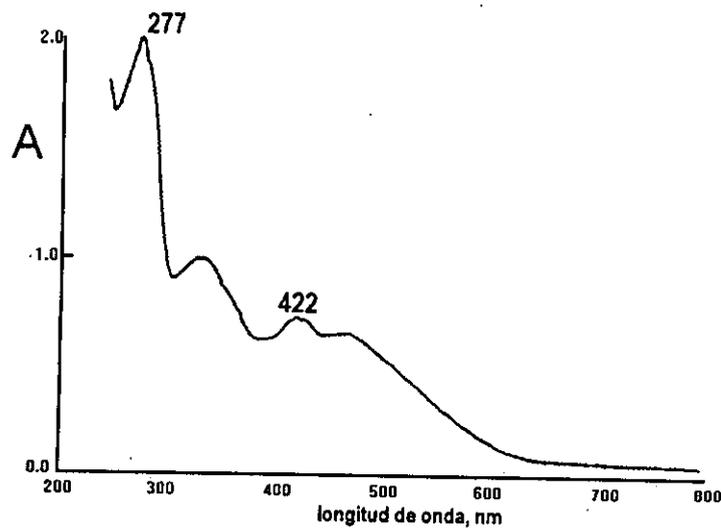
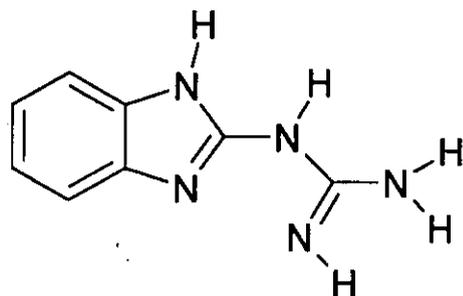


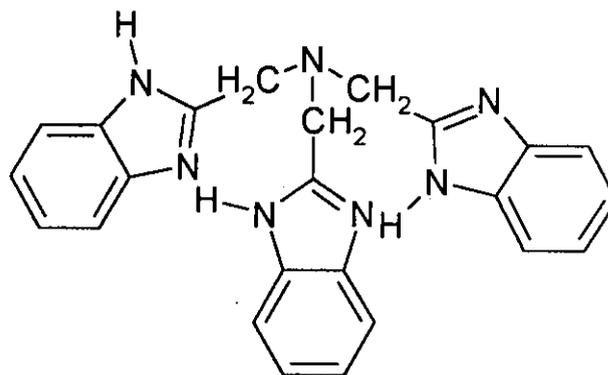
Figura 5.2. Espectro UV-Visible de la ferredoxina de espinaca.

5.2 Síntesis y caracterización de los compuestos de coordinación con ligantes bencimidazólicos.

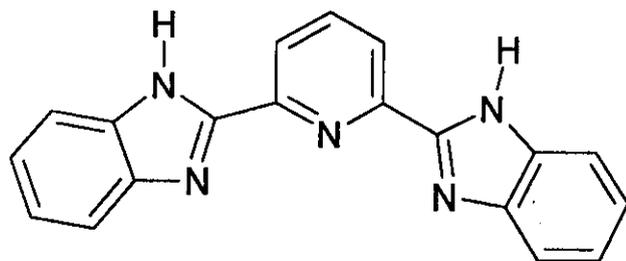
Los derivados bencimidazólicos y sus compuestos de coordinación han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas.²⁸⁻³² Este estudio se ha llevado a cabo de manera extensa ya que los compuestos derivados del imidazol poseen actividades biológicas; por ejemplo los bencimidazoles sustituidos en la posición 2 presentan una importante actividad como antivirales.^{31, 53}



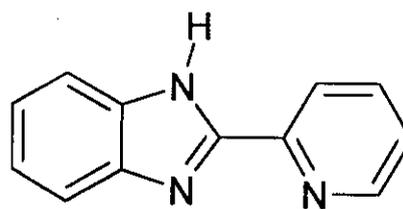
2-guanidinobenzimidazol
(2gb)



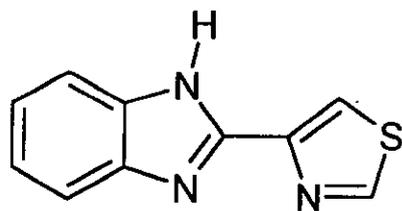
Tris(2-benzimidazolilmetil)amina
(ntb)



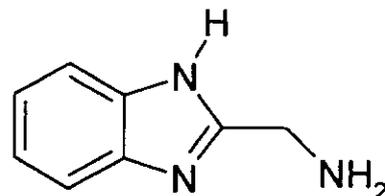
2,6-Bis(2-benzimidazolil)piridina
(bbimpy)



2-(2'piridil)benzimidazol
(2pb)



2-(4-tiazolil)benzimidazol
(4tb)



2-(aminometil)benzimidazol
(2amb)

Figura 5.3. Estructuras de los ligantes bencimidazólicos utilizados

5.2.1 Compuestos de coordinación de cobalto(III).

En la literatura se encuentran un número reducido de informes de compuestos de coordinación con ligantes bencimidazólicos y el ion metálico Co(III). Se informan compuestos derivados del 2-aminometilbencimidazol,⁴¹ 2(N-metilaminometil)bencimidazol,⁴¹ así como con el 5-metil-2-(metilbencimidazoli)piridina.⁴²

Durante la realización de este proyecto, en las síntesis se utilizaron como materias primas: cloruro de cobalto(II), $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$ ó $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. En la literatura se informa que la ruta óptima para realizar la síntesis de compuestos de cobalto(III) es a partir de cobalto(II) y su posterior oxidación utilizando O_2 o H_2O_2 como oxidantes. Esta ruta sólo tuvo éxito cuando se utilizaron 2gb ó 2amb como ligantes. Con el resto de los ligantes la oxidación del compuesto de coordinación de cobalto(II) con O_2 ó H_2O_2 llevó a productos de descomposición, posiblemente de polimerización.⁵⁴ Es necesario por lo tanto partir de un compuesto de cobalto(III) y realizar la sustitución de los ligantes. En este proyecto se utilizaron dos compuestos de cobalto(III) que poseen en su esfera de coordinación carbonatos, los cuales son fácilmente sustituibles en presencia de H^+ , de esta manera se evita la posterior oxidación de los compuestos de Co(II). A partir de estas rutas de síntesis se obtuvieron 7 compuestos de coordinación de cobalto(III). En el caso de los ligantes bbimpy y ntb es posible partir de cualquiera de los dos compuestos de cobalto(III), mientras que el ligante 2pb reaccionó únicamente con el triscarbonatocobalto(III); pero 2gb y 2amb reaccionaron por cualquiera de las tres rutas obteniéndose el mismo catión pero con diferentes aniones.

Los compuestos de coordinación de Co(III) se caracterizaron utilizando IR, susceptibilidad magnética, espectroscopía electrónica, análisis elemental y adicionalmente se utilizó RMN ^1H y ^{13}C , además de difracción de rayos-X.

Los análisis elementales y las fórmulas propuestas para cada compuesto a partir del análisis se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Fórmulas mínimas y análisis elementales de los compuestos de cobalto(III)

Compuesto	Análisis Elemental		
	Enc.(Calc.)%		
	C	H	N
Co-1 [Co(bbimpy-H) ₂]OH	65.97(65.52)	3.52(3.59)	20.45(20.12)
Co-2 [Co(2pb) ₂ (NO ₃)](NO ₃) ₂ •C ₂ H ₆ O	45.70(45.83)	3.38(3.55)	18.17(18.50)
Co-3 [Co(2gb) ₃]Cl ₂ (NO ₃)•H ₂ O	39.15(39.20)	4.18(3.97)	30.22(30.47)
Co-4 [Co(2gb) ₃](CCl ₃ COO) ₃ •H ₂ O	33.12(33.18)	2.95(2.69)	19.30(19.36)
Co-5 [Co(2gb) ₃]Cl ₃ •3H ₂ O	40.38(40.63)	4.57(4.69)	29.41(29.61)
Co-6 [Co(ntb)Cl]Cl(NO ₃)•3H ₂ O	43.01(44.12)	4.19(4.17)	18.88(17.15)
Co-7 [Co(2amb) ₃]Cl ₃ •2H ₂ O*	44.47(44.84)	5.27(4.86)	19.63(19.61)

* Compuesto previamente sintetizado por McFadyen *et al* en 1996.⁵⁵

Los momentos magnéticos efectivos de **Co-1**, **Co-2**, **Co-3**, **Co-4**, **Co-5** y **Co-7** confirman que los compuestos de Co(III) son diamagnéticos, es decir se trata de compuestos octaédricos de bajo espín. Se presenta una excepción con el compuesto **Co-6** el cual presenta un momento magnético μ_{eff} de 4.6 M.B. asociado a un compuesto de cobalto(III) o cobalto(II) con geometría pentacoordinada.⁵⁶

5.2.1.1 Caracterización espectroscópica UV-Visible e IR de los compuestos de cobalto(III).

En la tabla 5.2 se presenta la caracterización en estado sólido por espectroscopía electrónica (reflectancia difusa) y espectroscopía infrarroja de los compuestos de cobalto(III).

Tabla 5.2. Datos espectroscópicos de UV-Vis e I.R. de los compuestos de cobalto(III)

Compuesto	UV-Vis.		I.R.			
	ν_1	ν_2	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=N})$	$\delta(\text{N-H})$	$\delta(\text{C-H})$
	cm^{-1}		cm^{-1}			
bbimpy			3055	1599, 1588, 1571	1459	741
Co-1	17 860, 24 509		3050	1605, 1571	1470	735
2pb			3056	1593, 1567	1442, 1400	743
Co-2	23 364		3066	1613, 1592	1461	746
2gb			3140	1648, 1598, 1540	1450	740
Co-3	19 530, 26 110		3190	1666, 1610, 1566	1462	742
Co-4	19 455, 26 380		3149	1676, 1565	1460	744
Co-5	19 493, 25 510		3214	1668, 1602, 1566	1462	754
ntb			3384	1622, 1536	1438	742
Co-6	6 330, 11 235, 17 860 ^a		3386	1623, 1594	1454	746
2amb			3305	1629, 1576	1485	772
Co-7	20 000, 27 027		3424	1618, 1592	1477	745

^a ν_3 **Co-6** es un compuesto pentacoordinado.

Las bandas de absorción observadas en los espectros en estado sólido corresponden a las transiciones que se predicen para los compuestos octaédricos de bajo espín de Co(III). El Co(III) es un ion d^6 , en una geometría octaédrica de bajo espín para el cual hay dos transiciones permitidas por espín $\nu_1: {}^1T_{2g} \leftarrow {}^1A_{1g}$ y $\nu_2: {}^1T_{1g} \leftarrow {}^1A_{1g}$.⁵⁷ En los espectros de los compuestos **Co-1**, **Co-3**, **Co-4**, **Co-5** y **Co-7** se observan 2 bandas de absorción, la primera aparece en la región de 17300 a 20000 cm^{-1} mientras que la segunda se encuentra en la región de 23000 a 27100 cm^{-1} . En el compuesto **Co-2** que contiene al ligante 2pb la segunda transición se traslapa con la banda de transferencia de carga por lo que solamente se asigna ν_1 en 23364 cm^{-1} . El espectro del compuesto **Co-6** presenta 3 transiciones, característica de un compuesto pentacoordinado de Co(III) ($\nu_3: e'' \rightarrow$

e' , $v_2: e'' \rightarrow a_1'$ y $v_1: e'' \rightarrow a_1'$) ó Co(II) ($v_5: {}^4E''(P) \leftarrow {}^4A_2'$, $v_3: {}^4E'(F) \leftarrow {}^4A_2'$ y $v_2: {}^4E''(F) \leftarrow {}^4A_2'$).^{56, 57}

Hasta el momento se han informado un número limitado de compuestos pentacoordinados de Co(III),^{58, 59} éstos se han obtenido utilizando como ligantes bases de Schiff o fosfinas. Los compuestos pentacoordinados han demostrado ser inestables en solución, además de que en la presencia de aire se descomponen para dar compuestos impuros de Co(II) y ligante libre. En el caso del compuesto **Co-6** que contiene el ligante tripóide ntb, se ha observado anteriormente que el ligante ntb tiende a estabilizar estructuras pentacoordinadas,^{56, 60} por lo que en nuestra reacción no se favorece la estabilización del compuesto de Co(III) de bajo espín y ocurre una reducción espontánea resultando en un compuesto de Co(II) ya informado en la literatura.⁵⁶

Las principales vibraciones observadas para los ligantes bencimidazólicos son las que corresponden a las vibraciones $\nu(N-H)$, $\nu(C=C) + \nu(C=N)$; $\delta(N-H)$ y $\delta(C-H)$ del anillo bencimidazólico fuera del plano. En todos los espectros de IR de los compuestos de coordinación de cobalto(III) se observan estas vibraciones desplazadas a mayor energía con respecto a la posición de la vibración en el espectro del ligante libre (tabla 5.2). Las vibraciones observadas en los espectros de IR de los compuestos de coordinación (tabla 5.2), indican que todos los ligantes: bbimpy, 2pb, 2gb, ntb y amb se coordinan por medio del nitrógeno imidazólico. En el caso de los compuestos con los ligantes bbimpy y 2pb, el ligante se coordina además a través del nitrógeno piridínico. La banda de vibración asociada al anillo de la piridina en 1151 cm^{-1} para 2pb se desplaza a mayor energía.^{39, 61} En el compuesto **Co-2** la banda de vibración se observa en 1154 cm^{-1} . En el espectro del bbimpy libre se observa una banda intensa en 1317 cm^{-1} asociada al anillo piridínico, la cual se desplaza a mayor energía y dobletea con la quelatación.³⁹ En el espectro IR del compuesto **Co-1** se observa la banda dobleteada en 1359 y 1323.5 cm^{-1} . En los compuestos de 2gb el ligante se coordina de manera bidentada a través del nitrógeno imidazólico y del grupo guanidino, ya que se observa que la banda de vibración $\nu(NH \cdots N)$ del grupo

guanidino³¹ se desplaza de 3444 cm^{-1} en el ligante libre a 3352 , 3354 y 3338 cm^{-1} en los espectros de los compuestos **Co-3**, **Co-4** y **Co-5** respectivamente. Las vibraciones observadas en el espectro IR indican que el ntb en el compuesto **Co-6** se coordina de manera tetradentada en forma semejante a como ocurre en el caso de los iones metálicos Cu(II), Co(II) y Ni(II), se observa un desplazamiento de las vibraciones asociadas al enlace C=N a mayor energía.^{56, 60} En los espectros de los compuestos **Co-2**, **Co-3** y **Co-6** se observa una banda de vibración en 1384 cm^{-1} debida a la presencia de los nitratos iónicos.

5.2.1.2 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de los compuestos de cobalto(III).

Se realizaron experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C así como las resonancias bidimensionales ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HETCOR para la elucidación de las estructuras de los compuestos de Co(III).

RMN del compuesto Co-1

La estructura de ligante bbimpy así como su numeración se presentan en la figura 5.4. Esta estructura posee un sistema AB₂ correspondiente a la piridina, así como el sistema AA'BB' característico al grupo bencimidazólico.

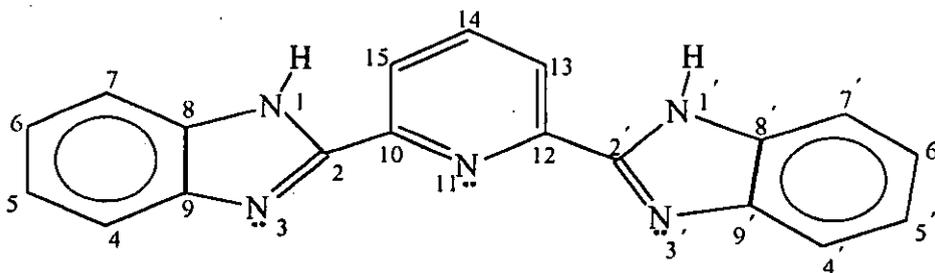


Figura 5.4. Estructura y numeración del bbimpy.

La fórmula propuesta para el compuesto **Co-1** es $[\text{Co}(\text{bbimpy-H})_2]\text{OH}$, en la cual el ligante 2,6-bis(bencimidazolil)piridina se coordina de forma monoaniónica como se ha informado en el caso de Mn(II)^{62} y Cd(II)^{63} utilizando como medio de reacción un disolvente orgánico neutro y prótico (metanol). En general, la desprotonación del anillo bencimidazólico requiere la presencia de una base. El producto de la reacción de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en etanol con bbimpy es un compuesto en que el ligante se encuentra en forma monoaniónica. Por lo tanto, es posible que la coordinación del ion metálico promueva la desprotonación del anillo bencimidazólico. En la síntesis de **Co-1**, se encuentran presentes en el medio de reacción bases de Lewis provenientes de la materia prima: $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$, por lo que el NH_3 libre pudo desprotonar al bbimpy favoreciendo la forma monoaniónica. Otra alternativa es que de la misma manera que en el caso de Mn(III) y Cd(II) al utilizar un disolvente prótico como etanol y en presencia del ion metálico se desprotone el ligante, dando lugar a la forma monoaniónica.

En el espectro de RMN ^1H del ligante libre obtenido en DMSO-d_6 se observan 5 señales. La primera en 13.0 ppm que corresponde a 1-H, el protón ácido del grupo bencimidazólico, esto se confirma al realizar el intercambio con D_2O . Posteriormente se observan 4 señales en la región de 7.2 a 8.5 ppm. Dos señales corresponden al sistema AB_2 de la piridina, la señal doble en 8.33 ppm corresponde a 13-H y 15-H y la señal triple en 8.13 ppm acoplada con la anterior es la correspondiente al 14-H. El sistema AA'BB' de los protones del bencimidazol no se resuelve y se observan dos señales anchas, la primera en 7.72 ppm que corresponde tanto a 4-H como 7-H y la segunda señal en 7.31 correspondiente a 5-H y 6-H. Esta asignación se realiza por medio del espectro bidimensional COSY.

En el espectro de ^{13}C del bbimpy en DMSO-d_6 se observaron las 10 señales esperadas, cuatro de ellas corresponden a los carbonos cuaternarios; C-2 en 151.1, C-10 + C-12 en 148.3, C-9 en 144.7 y C-8 en 134.9 ppm. El resto de las señales se trata de carbonos C-H; C-14 en 139.7, C-13 + C-15 en 121.9, C-4 en 120.3, C-5 en 122.8, C-6 en 124.3 y C-7 en 112.3 ppm. La asignación nuevamente se realiza por medio de resonancia bidimensional HETCOR ^1H - ^{13}C .

El espectro de ^1H de **Co-1** en DMSO-d_6 muestra 8 señales (figura 5.5).

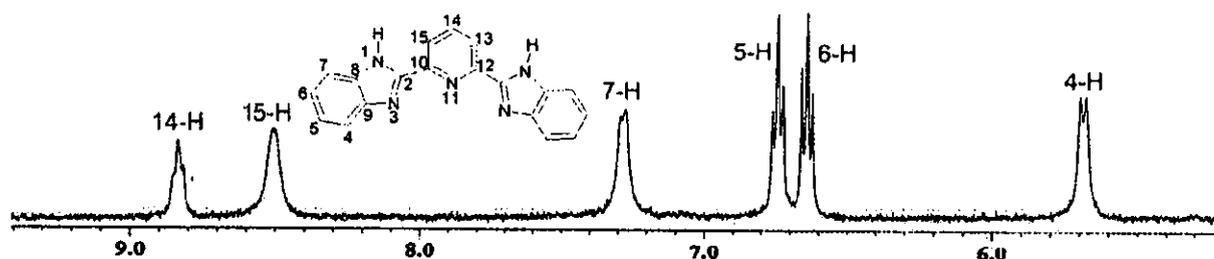


Figura 5.5. Espectro de RMN ^1H para Co-1 en DMSO-d_6 a 300 MHz.

Se observan dos señales anchas de protones ácidos no asignables correspondientes al grupo imidazol y al OH^- en 2.94 y 3.20 ppm. Se observa nuevamente el sistema AB_2 de la piridina desplazado a frecuencias mayores; las señales aparecen en 8.83 y 8.0 ppm para 14-H y 13-H + 15-H respectivamente. Se observa un desplazamiento mayor a frecuencia mayor en el caso del 14-H ya que es el protón que se encuentra en la posición *para* con respecto al sitio de coordinación. El sistema $\text{AA}'\text{BB}'$ del grupo bencimidazólico se resuelve debido a la coordinación y por lo tanto se observan 4 señales. El espectro de RMN ^1H muestra que las señales del sistema bencimidazólico se desplazan a frecuencias menores debido a la coordinación al metal. Es importante resaltar que 4-H se desplaza de manera muy importante ($\Delta\delta = -2.04$ ppm) a frecuencia menor debido a la proximidad de este protón al anillo bencimidazólico del ligante vecino.⁵⁵ La asignación de las señales se realizó por medio del espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -HETCOR las señales se localizan en: 4-H en 5.69, 5-H en 6.74, 6-H en 6.64 y 7-H en 7.27 ppm. En el espectro de RMN de ^{13}C las señales asignadas para el compuesto **Co-1** son: C-14 en 143.63, C-13 + C-15 en 119.3, C-12 + C-16 en 156.42 ppm para el anillo de la piridina, nuevamente al igual que en el caso de la RMN de ^1H el carbono C-14 en la posición *para* al sitio de coordinación del anillo piridínico se desplaza de manera importante a frecuencias mayores. En el caso del bencimidazol C-2 en 165.9, C-4 en 111.43, C-5 en 122.2, C-6 en 120.5, C-7 en 120.34, C-8 en 147.6 y C-9 en 142.0 ppm.

A través de los espectros de RMN se concluye que el ligante bbimpy se coordina de manera monoaniónica ya que los desplazamientos en ^{13}C son equivalentes a los del ligante en su forma desprotonada,⁶⁴ ya que el desplazamiento en RMN ^{13}C depende de la posición del par electrónico libre, los carbonos vecinos a un par libre aparecen 10 ppm a mayor frecuencia que los vecinos a un NH.⁶⁵ En el compuesto Co-1 los carbonos C-8 y C-9 se encuentran aproximadamente en el mismo desplazamiento, lo que indica la deprotonación.

Los carbonos cuaternarios vecinos a los sitios de coordinación, C-2, C-8 y C-10, se desplazan de manera importante a frecuencias mayores poniendo en evidencia la coordinación al metal por medio del nitrógeno piridínico y del nitrógeno imidazólico.

En los espectros se observan las señales correspondientes únicamente a un tipo de ligante coordinado, además de que el ligante a su vez conserva la simetría que poseía en su estado libre, es decir ambos bencimidazoles son equivalentes, debido al plano de simetría que pasa a través del nitrógeno de la piridina. De esto se concluye que se posee una estructura con dos ligantes bbimpy equivalentes coordinados de manera tridentada, este tipo de coordinación se había observado en cadmio(II)⁶³ y en manganeso(II)⁶² los cuales presentan una geometría octaédrica *mer*.

RMN del compuesto Co-2

La estructura de ligante 2pb así como su numeración se presentan en la figura 5.6. Esta estructura posee un sistema ABCD correspondiente a la piridina, así como el sistema AA'BB' característico al grupo bencimidazólico.

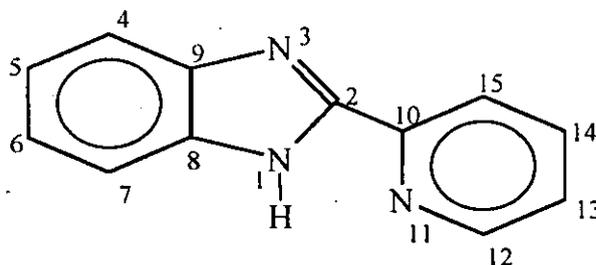


Figura 5.6. Estructura y numeración del 2pb.

En el espectro del ligante se muestran siete señales, la primera de ellas corresponde al protón ácido del grupo bencimidazólico en 13.14 ppm. La asignación de las señales se realizó utilizando los espectros de RMN bidimensional, COSY y HETCOR. Se observan las cuatro señales múltiples esperadas para el sistema de la piridina, un doble que corresponde a 12-H en 8.71 ppm acoplado a un triple correspondiente a 13-H en 7.5 ppm, este último se acopla a otra señal triple correspondiente a 14-H en 7.98 ppm, finalmente se observa un doble en 8.34 ppm asignado a 15-H acoplado con la señal en 7.98 ppm. El sistema del grupo bencimidazólico produce señales múltiples traslapadas las cuales se asignaron por medio de RMN bidimensional. Las señales dobles en 7.70 y 7.56 ppm, se asignan a 4-H y 7-H respectivamente, mientras que las señales triples acopladas se observan en 7.18 y 7.24 ppm y se tratan de los protones 5-H y 6-H respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C se observan las doce señales esperadas para cada átomo de carbono, las cuales se asignaron al igual que en RMN ^1H por medio de RMN bidimensional. Los desplazamientos se muestran en la tabla 5.3

Tabla 5.3. RMN ^{13}C desplazamientos δ (ppm)

	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
2pb	150.7	119.3	121.9	123.1	112.1	134.9

	C-9	C-10	C-12	C-13	C-14	C-15
2pb	143.9	148.5	149.3	124.7	137.5	121.4

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **Co-2** (figura 5.7), se observan un gran número de señales múltiples lo que indica la presencia de varios compuestos. El análisis elemental indica que posiblemente se tratan de isómeros geométricos, los cuales no fue posible separar por medio de técnicas cromatográficas. Es de mencionarse que se observan dos señales, probablemente

asignadas a los protones bencimidazólicos 4-H y 5-H, desplazadas a frecuencias menores en 5.13 y 5.04 ppm, esto debe ser causado por la proximidad de estos protones a la densidad electrónica del anillo aromático del ligante vecino. Se observan adicionalmente varias señales múltiples asignables a protones bencimidazólicos en la región comprendida entre 6.90 y 7.40 ppm. Adicionalmente las señales debidas al grupo piridina se agrupan en señales múltiples en el intervalo de 7.40 a 9.00 ppm (Figura 5.7).

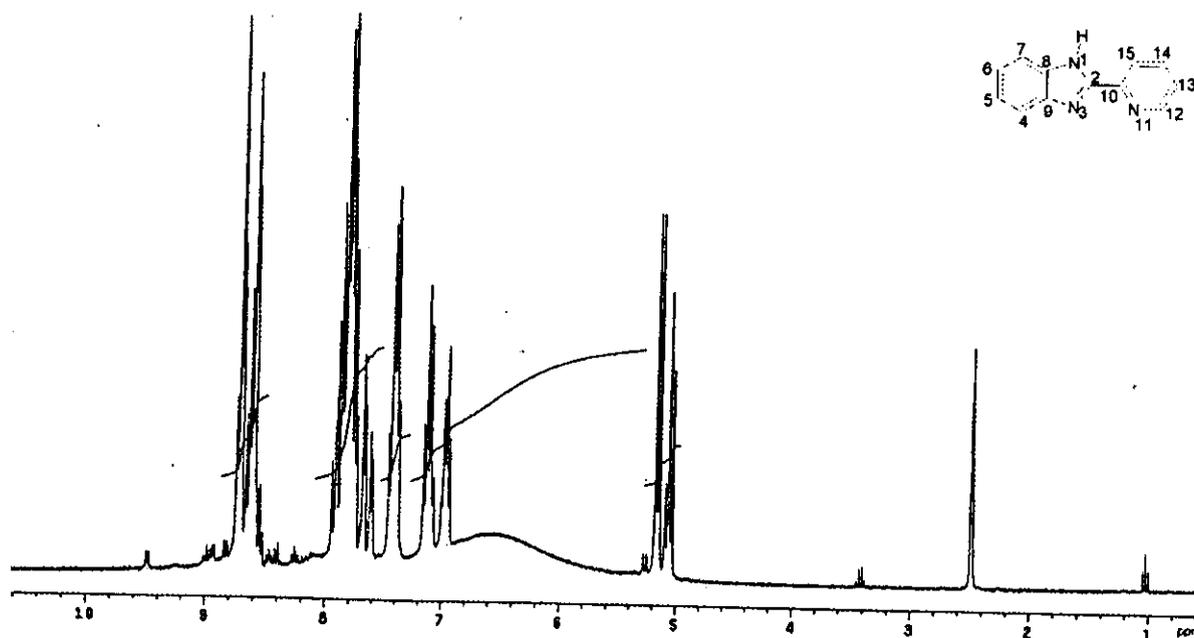


Figura 5.7. Espectro de RMN ^1H para el compuesto Co-2 en DMSO- d_6 a 300 MHz.

En el espectro RMN ^{13}C se observa un espectro más complicado que el esperado ya que se observan grupos de señales para cada átomo de carbono lo que puede indicar al igual que el espectro de RMN ^1H , que se tiene una mezcla de isómeros.

La separación de esta mezcla resulta muy difícil debido a su baja solubilidad y similitud en propiedades físicas y químicas.

Para la estructura del compuesto Co-2 existen tres isómeros geométricos posibles (figura 5.8). Los espectros de resonancia de ^1H y ^{13}C de Co-2 muestran un mayor número de señales que las esperadas para uno de los isómeros

geométricos posibles de **Co-2**. Los isómeros **Co-2(I)** y **Co-2(II)** poseen un eje de simetría C_2 , por lo que se esperan 8 señales en el espectro de resonancia 1H , en el caso del isómero **Co-2(III)** se esperan 16 señales. Los isómeros **Co-2(I)** y **Co-2(II)** presentan la posibilidad de que al coordinarse la molécula el protón $4-H$ se vea protegido por la densidad electrónica del anillo bencimidazólico del ligante vecino. Por lo que una posible explicación es que se tenga la mezcla de al menos dos de los isómeros anteriores y posiblemente se trata de la mezcla de los tres isómeros. Hasta el momento no se tienen muchos informes de que el nitrato se coordine de manera bidentada, pero recientemente se informó de un compuesto utilizando el ligante tris(bencimidazolilmetil)amina y el ion metálico Cd^{2+} en el cual el nitrato se coordina de forma bidentada.⁶⁶

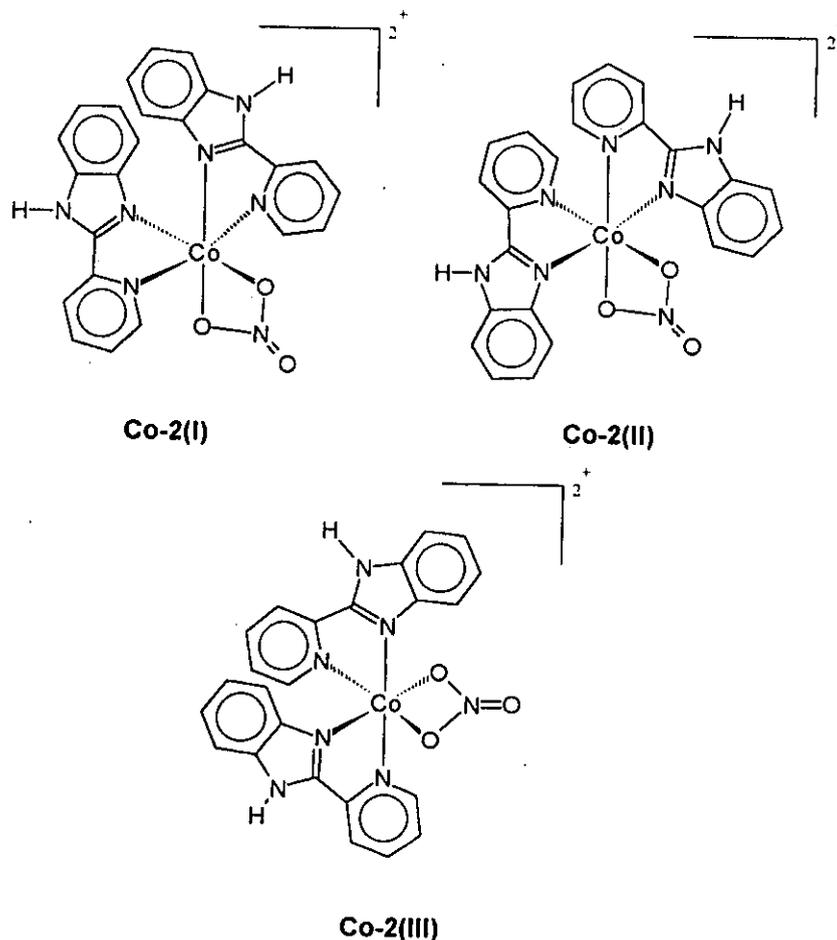


Figura 5.8 Isómeros geométricos de **Co-2**.

RMN de los compuestos Co-3, Co-4 y Co-5

La asignación de los espectros de ^1H y ^{13}C del 2gb la llevaron a cabo anteriormente Andrade-López *et al.*⁶⁷ La estructura y numeración del ligante 2gb se presentan en la figura 5.9.

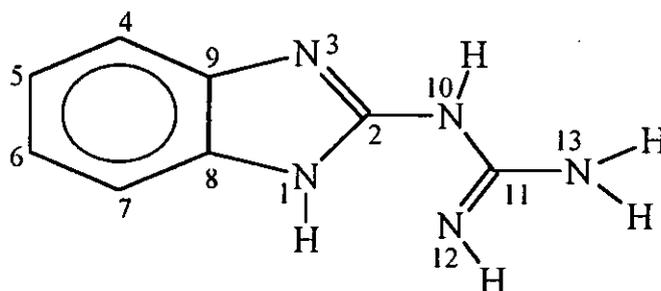


Figura 5.9. Estructura y numeración del 2gb.

En el espectro de RMN ^1H del 2gb se observan dos señales múltiples correspondientes al sistema AA'BB' del grupo bencimidazólico no resuelto, es decir se comporta como un sistema A_2B_2 (tabla 5.4). Se observan dos señales adicionales al sistema bencimidazólico, la primera una señal múltiple en 6.9 ppm correspondiente a los protones del grupo guanidino (10-H, 12-H y 13-H); la segunda en 11.05 ppm que corresponde al protón ácido del grupo imidazol. En el espectro de ^{13}C del 2gb se observan cinco señales algunas de estas señales son muy pequeñas, ya que la molécula se encuentra en varios equilibrios conformacionales y tautoméricos.⁶⁷ Las señales observadas se encuentran asignadas en la tabla 5.5.

Los compuestos **Co-3 a Co-5** contienen 3 moléculas de 2gb coordinadas al cobalto(III), las moléculas de 2gb serán denominadas como A, B y C. Al comparar los espectros de resonancia del 2gb libre con los de los compuestos de coordinación de Co(III), es decir, los compuestos **Co-3, Co-4 y Co-5**, se observa que las señales correspondientes al compuesto se encuentran desplazadas con respecto al ligante libre. La asignación de las señales se llevó a cabo utilizando los

experimentos de resonancia magnética nuclear bidimensional; ^1H -COSY (figura 5.10) y ^1H - ^{13}C -HETCOR (figura 5.11). El espectro de RMN ^1H muestra que las señales de 4-H y 5-H, para la molécula de ligante A, se desplazan a frecuencias menores debido a la proximidad de estos protones a la densidad electrónica del anillo bencimidazólico del ligante vecino.⁵⁵ Adicionalmente se observa en el espectro que el sistema AA'BB' se resuelve debido a la coordinación (tabla 5.4). Las señales de los protones ácidos del grupo imidazol no se observan. Por último las señales de N-H de los grupos guanidino se encuentran en 5.36, 5.26 y 4.84 ppm.

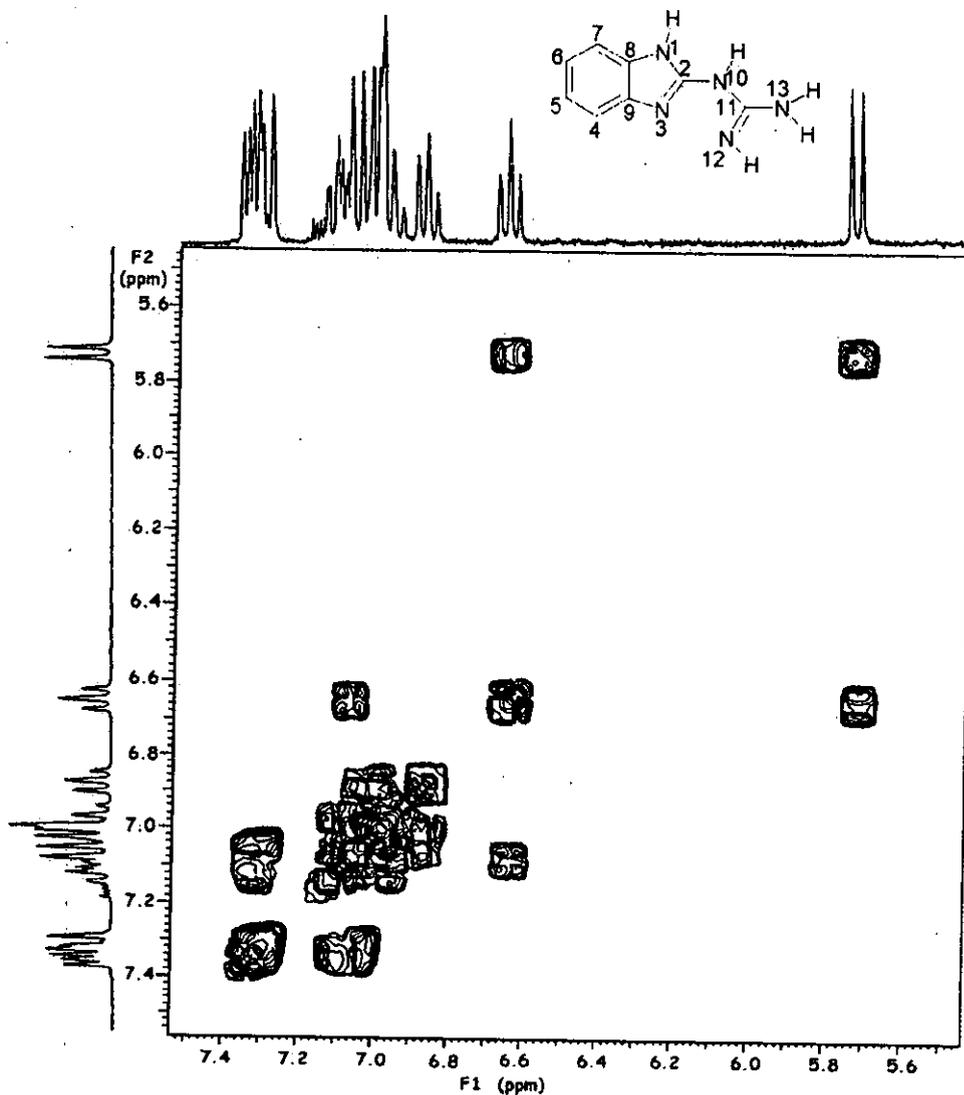


Figura 5.10 Espectro RMN bidimensional COSY de Co-3, DMSO- d_6 400 MHz.

Tabla 5.4: RMN ^1H desplazamientos δ (ppm) de **Co-3**, **Co-4** y **Co-5** en DMSO-d_6 .*

Compuesto	4-HA	5-HA	6-HA	7-HA	4-HB y 4- HC	5-HB y 5- HC	6-HB y 6- HC	7-HB y 7-HC
2gb	7.20	6.92	6.92	7.20				
Co-3	5.60 (d)	6.60 (t)	7.01 (m)	7.34 (m)	7.18 (m) 7.02 (m)	6.98 (m) 6.86 (t)	7.08 (m) 7.06 (m)	7.38 (m)
Co-4	5.52 (d)	6.23 (t)	6.66 (m)	7.11 (m)	7.07 (m) 6.91 (m)	6.68 (m) 6.52 (t)	7.01 (m) 6.78 (m)	7.14 (m)
Co-5	5.56 (d)	6.28 (t)	6.70 (m)	7.10 (m)	7.04 (m) 7.00 (m)	6.75 (m) 6.56 (t)	6.95 (m) 6.92 (m)	7.15 (m)

* Las iniciales A, B y C se refieren a cada uno de los tres ligantes 2gb coordinados al Co(III).

Los espectros de RMN de ^{13}C de estos compuestos de coordinación muestran 24 señales, agrupadas en 8 grupos diferentes (tabla 5.5). Para cada átomo de carbono de la molécula de 2gb existen tres señales en el espectro, lo que concuerda con tres ligantes no equivalentes coordinados al Co(III). Del espectro de ^{13}C es evidenciable el sitio de coordinación del ligante ya que las señales asignadas al C-11 y al C-9, que corresponden a los átomos de carbono directamente enlazados a los átomos de nitrógeno coordinantes, se desplazan de manera importante; a frecuencia menor para C-11 y a mayor para C-9 ($\Delta\delta = -10.32$ y $\Delta\delta = 3.76$ ppm respectivamente). El espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -HETCOR muestra las señales esperadas para el complejo trisquelato asimétrico. Se asignaron las señales de la molécula de ligante A, que se desplazan a frecuencias

menores, utilizando el $^1\text{H-COSY}$ y el $^1\text{H-}^{13}\text{C-HETCOR}$: C-4 en 112.63, C-5 en 120.99, C-6 en 121.34 y C-7 en 111.54 ppm.

Tabla 5.5: RMN ^{13}C desplazamientos δ (ppm) de **Co-3** en DMSO-d_6 .

Compuesto	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-11
2gb	158.90	111.69	119.36	119.36	111.69	135.70	135.70	158.73
Co-3	157.67	115.12	121.07	121.74	112.12	134.15	139.46	148.99
	156.76	114.51	120.99	121.37	111.94	134.22	139.13	148.41
	155.61	112.63	120.91	121.34	111.54	134.30	138.43	148.41

Las señales de las moléculas *B* y *C* se asignaron con los espectros bidimensionales, sin embargo no es posible definir a cuál de las moléculas pertenecen (tabla 5.5).

Es importante mencionar que el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **Co-4** muestra las señales adicionales debidas al anión CCl_3COO^- , el carbono alifático trihalogenado muestra un grupo de señales en 186.70, 185.39 y 184.3 ppm, mientras que el carbono carbonílico presenta un grupo de señales en 203.27, 202.81 y 202.48 ppm.

De los resultados obtenidos se concluye que efectivamente, como se observa en las fórmulas propuestas en la tabla 5.1, todos los compuestos de 2gb, es decir los compuestos **Co-3**, **Co-4** y **Co-5** poseen la misma esfera de coordinación de 3 ligantes 2gb coordinados de forma bidentada.

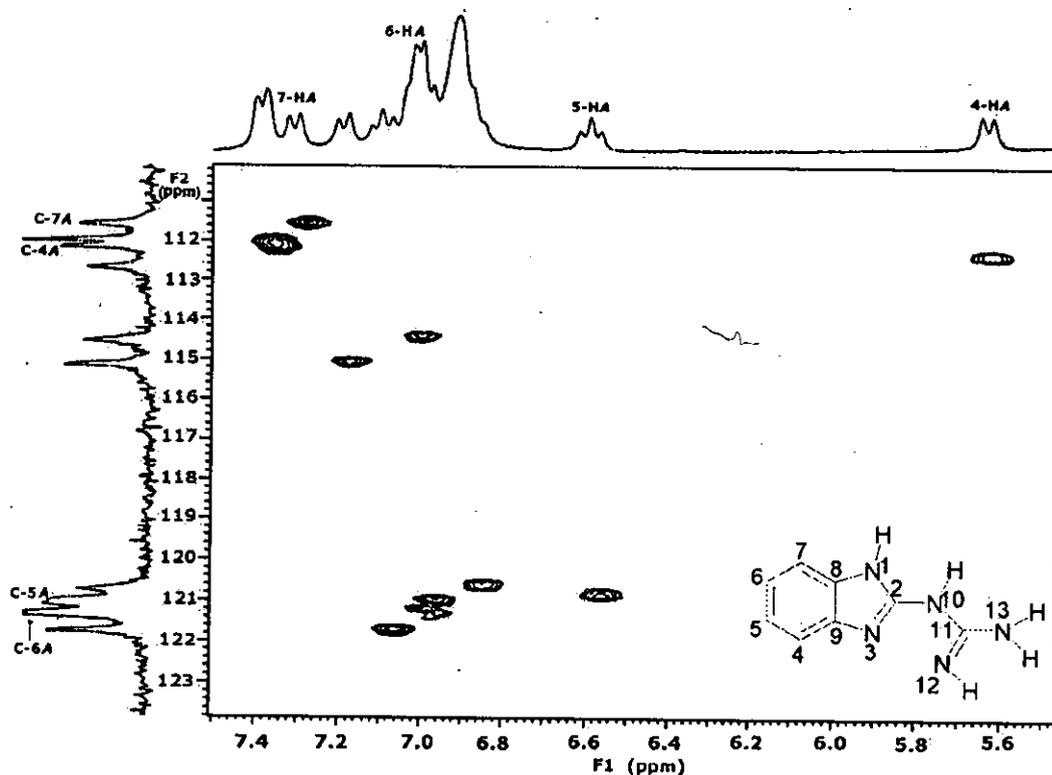


Figura 5.11 Espectro RMN bidimensional HETCOR ^1H , ^{13}C de Co-3, DMSO d_6 400 MHz

Para compuestos octaédricos del tipo $[\text{Co}(\text{2gb})_3]^{3+}$, existen dos isómeros geométricos posibles, el isómero meridional (*mer*) y el facial (*fac*). El isómero *mer* presenta una simetría C_1 , mientras que el isómero *fac* presenta un eje de rotación C_3 . A partir de los resultados de resonancia, el catión $[\text{Co}(\text{2gb})_3]^{3+}$ posee tres ligantes no equivalentes, se concluye por tanto que la estructura de los compuestos corresponde al isómero *mer*.

RMN del compuesto Co-6

Se realizaron experimentos de RMN ^1H y ^{13}C para ayudar en la elucidación de la estructura del compuesto Co-6. Los espectros indican que se trata de un compuesto paramagnético, por lo que en solución se tiene un compuesto de

cobalto(II) y sus espectros de RMN no fueron de utilidad para la elucidación estructural.

RMN del compuesto Co-7

El compuesto **Co-7** fue sintetizado y caracterizado previamente por McFayden, se llevó a cabo la caracterización del compuesto por medio de RMN ^1H , para corroborar que el catión $[\text{Co}(\text{2amb})_3]^{3+}$ aislado se trata únicamente del isómero *fac* como lo informa McFayden.⁵⁵ Los espectros de RMN se obtuvieron en D_2O y DMSO-d_6 . La estructura y numeración del 2amb se presentan en la figura 5.12.

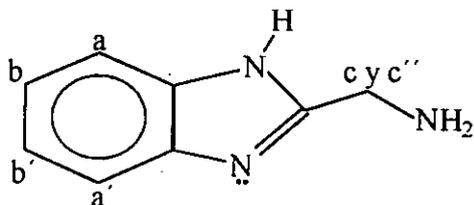


Figura 5.12 Estructura y numeración del 2amb.

Para el sistema AA'BB' de los protones aromáticos en el clorhidrato del 2-(aminometil)bencimidazol se observan solamente dos señales múltiples, mientras que en **Co-7** se resuelve el sistema AA'BB' (figura 5.13 y tabla 5.6). La asignación de las señales se hizo en base en la multiplicidad. En el espectro de RMN ^1H , las señales para Ha' y Hb' se desplazan a campo alto con respecto al ligante libre ya que estos protones quedan dentro de la corriente electrónica del bencimidazol vecino y por lo tanto quedan protegidos. Este efecto ya se había observado en los compuestos con 2gb. Los protones del metileno en el 2amb son equivalentes, dando una señal sencilla en 4.63 ppm. En este compuesto los protones se vuelven diastereotópicos y por lo tanto no equivalentes, resultando en dos señales dobles acopladas en 4.36 y 4.04 ppm.

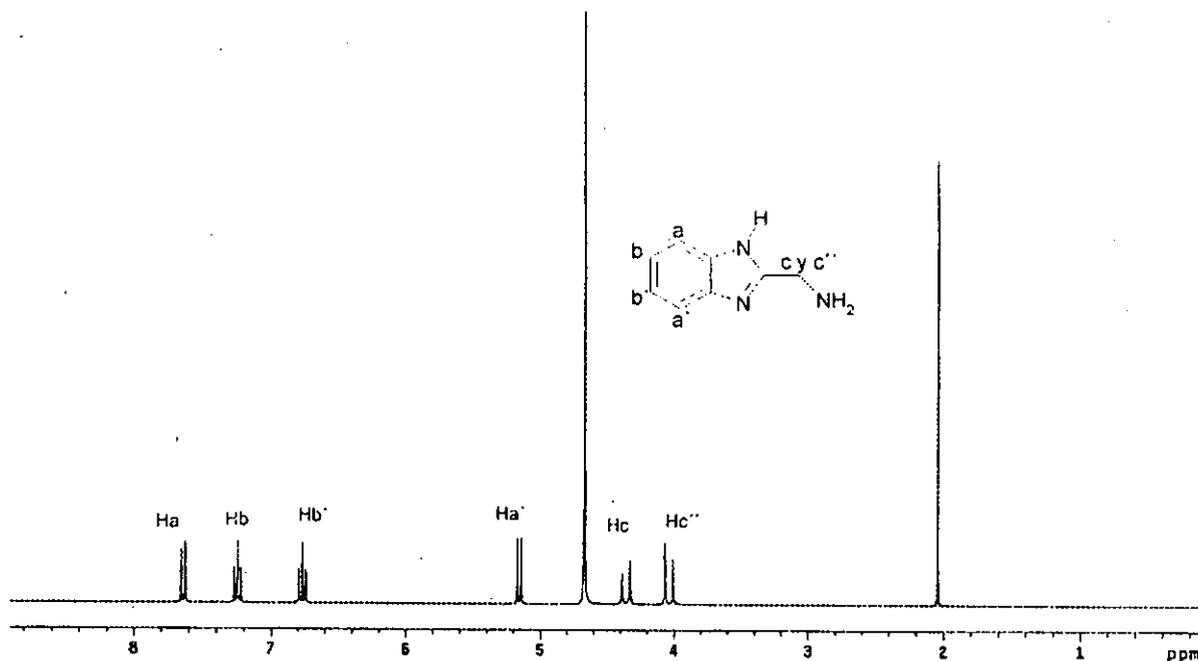


Figura 5.13 Espectro de RMN ^1H de Co-7 en $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz.

Tabla 5.6. RMN ^1H , desplazamientos δ (ppm) compuesto Co-7.

Compuesto	N-H	Ha	Ha'	Hb	Hb'	Hc	Hc'
ligante	9.19	7.8	7.8	7.5	7.5	4.63	4.63
Co-7	-	7.64	5.16	7.25	6.77	4.36	4.04

De los resultados anteriores se concluye que el compuesto sintetizado es $[\text{Co}(\text{2amb})_3]\text{Cl}_3$. Se trata del isómero con simetría C_3 donde los tres ligandos son equivalentes, el isómero *fac* del catión $[\text{Co}(\text{2amb})_3]^{3+}$.

5.2.1.3 Cristalografía de los compuestos Co-3 y Co-6.

Se obtuvieron monocristales de **Co-3** que y **Co-6** por evaporación lenta de metanol a 4 °C. Se midieron los datos de difracción por medio de procedimientos estándares a 173 K para **Co-3** y a 298 K para **Co-6**. Los datos cristalográficos para ambos compuestos se presentan en el Anexo I.

El monocristal obtenido de **Co-3** no corresponde a la fórmula mínima planteada por análisis elemental sino que se trata de $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, donde se observa una relación de aniones diferentes.

Co-3 es el primer compuesto de cobalto(III) y 2gb como ligante caracterizado por medio de difracción de rayos-X. La unidad asimétrica del compuesto **Co-3** contiene un catión, dos nitratos, un cloruro desordenado sobre dos posiciones y una molécula de agua de cristalización. El catión está formado por un ion Co(III) con tres ligantes 2gb coordinados a través de 3 nitrógenos imidazólicos y 3 nitrógenos del grupo guanidino. Las longitudes y ángulos de enlace más importantes se presentan en la tabla 5.7.

La geometría alrededor del metal central es un octaedro ligeramente deformado, con ángulos *trans* en el intervalo de $174.54(11)^\circ$ a $177.48(9)^\circ$ y ángulos *cis* en el intervalo de $86.69(10)^\circ$ a $95.03(10)^\circ$. Las distancias Co-N se encuentran en el intervalo informado para Co(III) aproximadamente 1.93 Å. En el grupo guanidino las distancias C-N del carbono unido a los tres nitrógenos indican que la doble ligadura del grupo imino se encuentra localizada entre el carbono y el nitrógeno coordinado, es decir entre C-11-N-12, C-31-N32 y C-51-N55 para cada uno de los ligantes. Por lo tanto se trata de un enlace π y el carbono se considera con una hibridación sp^2 . Esto lleva consigo una ruptura de la aromaticidad que existe en la molécula de 2gb libre, lo que se refleja en la pérdida de la planaridad de la molécula entre el grupo bencimidazol y el guanidino al estar coordinado el 2gb de manera bidentada. El ángulo diedral entre los planos formados por el

bencimidazol y el guanidino para los tres ligantes está en el intervalo de 20.8° a 36°.

Tabla 5.7: Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para Co-3

Co1-N32	1.914(3)	Co1-N23	1.925(2)
Co1-N52	1.928(3)	Co1-N12	1.929(2)
Co1-N43	1.933(2)	Co1-N3	1.948(2)
N1-C2	1.344(3)	N1-C8	1.387(4)
N21-C22	1.363(3)	N21-C28	1.375(4)
N41-C42	1.353(3)	N41-C48	1.384(4)
N32-Co1-N23	87.88(10)	N32-Co1-N52	177.48(9)
N23-Co1-N52	93.97(10)	N32-Co1-N12	90.38(10)
N23-Co1-N12	90.71(9)	N52-Co1-N12	87.88(10)
N32-Co1-N43	95.03(10)	N23-Co1-N43	90.21(9)
N52-Co1-N43	86.69(10)	N12-Co1-N43	174.54(11)
N32-Co1-N3	89.43(10)	N23-Co1-N3	176.64(10)
N52-Co1-N3	88.67(10)	N12-Co1-N3	87.31(9)
N43-Co1-N3	92.01(9)		

De la estructura resuelta por medio de la técnica de difracción de rayos-X de monocristal se observa que efectivamente alrededor del átomo central, en este caso Co(III), se encuentran coordinadas 3 moléculas del ligante 2gb de manera bidentada, la estructura corresponde al isómero *mer* estando de acuerdo con lo observado en solución en los experimentos de RMN (figura 5.14).

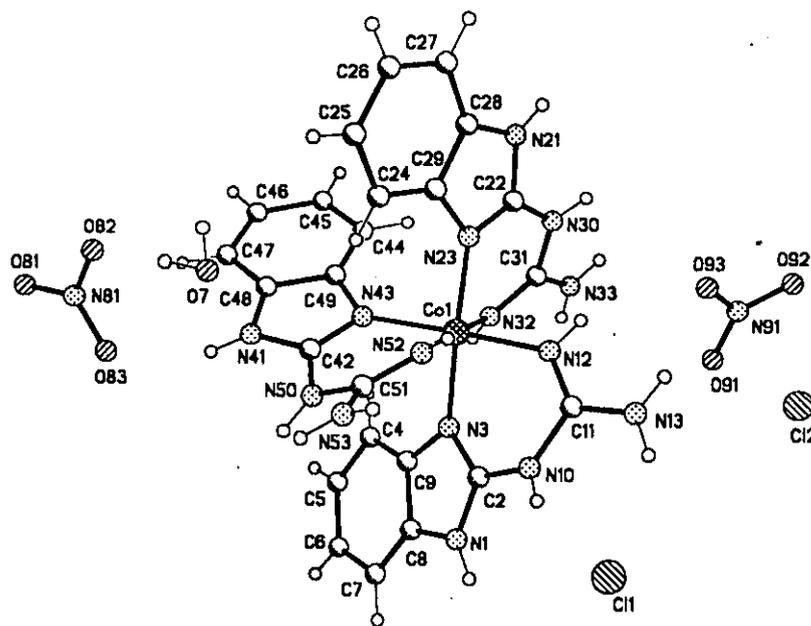


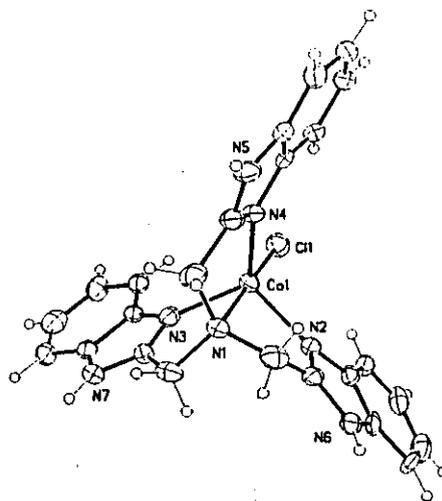
Figura 5.14. Diagrama de ORTEP para Co-3.

En el caso de la estructura resuelta para **Co-6** se observa que se trata de un compuesto pentacoordinado, donde el ntb se comporta de manera tradicional; es decir tetracoordinado, por medio de los tres nitrógenos bencimidazólicos y el cuarto nitrógeno coordinado se trata del nitrógeno central. La quinta posición se encuentra ocupada por un cloruro. La unidad asimétrica muestra dos moléculas químicamente idénticas pero cristalográficamente independientes. Cada catión $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]^{2+}$ cristaliza con un cloruro y un nitrato como aniones. La estructura cristalina posee adicionalmente moléculas de disolvente no coordinadas. La geometría del cobalto es de bipirámide trigonal, las posiciones apicales las ocupan el cloruro y la amina terciaria del ntb (Figura 5.15). El átomo de Co queda fuera del plano formado por los tres nitrógenos imidazólicos coordinados. Las distancias Co-N y Co-Cl se encuentran en el intervalo de 2.035 a 2.390 Å lo que es indicativo de un compuesto de Co(II) más que de Co(III) (Tabla 5.8). Es difícil determinar el estado de oxidación basándose en este estudio de rayos-X ya que se observa un gran desorden para los cloruros y moléculas de agua no coordinadas.

Tabla 5.8: Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para **Co-6**

Co1-N2	2.035(7)	Co1-N3	2.036(6)
Co1-N4	2.037(6)	Co1-Cl1	2.313(3)
Co1-N1	2.390(7)		
Co2-N32	2.034(7)	Co2-N34	2.056(7)
Co2-N33	2.059(7)	Co2-Cl2	2.315(3)
Co2-N31	2.370(7)		
N2-Co1-N3	111.9(2)	N2-Co1-N4	113.8(3)
N3-Co1-N4	117.1(3)	N2-Co1-Cl1	102.4(2)
N3-Co1-Cl1	104.6(2)	N4-Co1-Cl1	105.2(2)
N2-Co1-N1	76.3(3)	N3-Co1-N1	75.8(2)
N4-Co1-N1	75.6(2)	Cl1-Co1-N1	178.68(18)

En conclusión, con base en los resultados de RMN y la difracción de rayos-X el compuesto aislado de la reacción del ntb con cobalto produce un compuesto de Co(II). El compuesto de cobalto(III) es inestable ya que el ntb es un ligante que obliga al metal central a adoptar estructuras pentacoordinadas, las que para Co(III) son inestables; únicamente se encuentran informadas para compuestos con fosfinas que son inestables al aire y humedad.^{58, 59}

**Figura 5.15.** Diagrama de ORTEP para Co-6.

5.2.1.4 Estructuras de los compuestos de cobalto(III).

Lo anteriormente expuesto para los compuestos de cobalto(III) se puede resumir en que las estructuras para cada compuesto son:

[Co(bbimpy-H)₂]₂OH (Co-1) lo que se concluye a partir de espectroscopía electrónica ya que corresponde a un compuesto octaédrico de bajo espín lo que se confirma al ser un compuesto diamagnético. De los resultados de espectroscopía IR y RMN se concluye que el ligante se coordina al metal por medio de los nitrógenos imidazólicos y el nitrógeno piridínico. De los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se concluye que el ligante se encuentra en forma monoaniónica y que ambos ligantes son equivalentes magnéticamente entre sí, de la misma manera se observa la señal del anión hidróxido.

[Co(2pb)₂(NO₃)](NO₃)₂•C₂H₅OH (Co-2) se trata de un compuesto diamagnético que presenta geometría octaédrica. Los sitios de coordinación del ligante son el nitrógeno imidazólico y el piridínico confirmando por espectroscopía IR. Del espectro de RMN ¹H se observa que se trata de una mezcla de compuestos que por el resultado de análisis elemental se puede concluir que se trata de una mezcla de isómeros geométricos.

[Co(2gb)₃]³⁺ (Co-3, Co-4 y Co-5) a partir de los análisis elementales, la espectroscopía electrónica y la medición de susceptibilidad magnética se sabe que en todos los casos se trata de compuestos trisquelato octaédricos de cobalto(III), de bajo espín. Los dos sitios de coordinación del ligante son el nitrógeno imidazólico y el guanidínico lo que se confirma por espectroscopía IR. De los experimentos de RMN se concluye que en disolución se trata únicamente del isómero *mer* del catión [Co(2gb)₃]³⁺, lo cual se confirma en estado sólido al resolver la estructura cristalina por difracción de rayos-X de **Co-3**.

[Co(ntb)Cl]²⁺ (Co-6) los resultados de análisis elemental, espectroscopía electrónica, IR y de susceptibilidad magnética indican que se podría tratar de un compuesto pentacoordinado de cobalto(III) o de cobalto(II). Al resolverse la estructura cristalina se observa que la distancia de enlace Co-N no corresponde a la esperada para un compuesto de cobalto(III) por lo que se concluye que el ntb estabilizó un compuesto de cobalto(II).

[Co(2amb)₃]Cl₃•H₂O (Co-7) los resultados de análisis elemental, espectroscopía electrónica, IR y de RMN indican que se trata del isómero *fac* del compuesto octaédrico de bajo espín previamente sintetizado y caracterizado.^{ref}

5.2.2 Compuestos de coordinación de cromo (III)

Se encuentran informados un número pequeño de compuestos de coordinación de cromo(III) utilizando al imidazol o a sus derivados como ligantes,³⁴ por lo que el desarrollo de investigaciones en esa área es importante.

Se plantearon dos rutas de síntesis diferentes: en la primera se parte de cloruro de cromo(III) anhidro y la reacción de sustitución se realiza en condiciones anhidras (etanol o metanol anhidro); mientras que, en la segunda ruta se parte de cromo(II) en solución acuosa ácida, en primer lugar se realiza la reacción de sustitución en condiciones anaerobias y posteriormente se lleva a cabo la oxidación inmediata con O₂.

Ambas rutas de síntesis dieron lugar al mismo compuesto aislado en el caso de los ligantes bbimpy, ntb, 4tb y 2pb. La reacción donde la pureza y el rendimiento fueron mejores es cuando se parte de cloruro de cromo(III) anhidro y la reacción ocurre en condiciones anhidras para evitar las reacciones de hidrólisis en el cromo(III). En el desarrollo de esta reacción el polímero de CrCl₃ anhidro se

convierte en estructuras monoméricas de CrCl_3 por medio de un extractor Soxhlet utilizando como disolvente etanol o metanol anhidro y como catalizador una amalgama de Zn-Hg, la cual cataliza la reacción de reducción del Cr(III) en el polímero. El CrCl_3 extraído, como una solución verde oscura, reacciona con el ligante que se encuentra en el matraz del extractor.

En la ruta en la que se utilizan condiciones anaerobias, el cromo(II) se encuentra en solución acuosa ácida. La reacción ocurre por medio de una sustitución de ligantes en el Cr(II) y la posterior oxidación del compuesto sustituido con O_2 . En el caso exclusivo del ligante 2gb se obtuvo un compuesto dinuclear con puentes hidroxilo. La síntesis y la caracterización estructural, magnética y espectroscópica de los compuestos dinucleares de cromo(III) con puentes hidroxilo y oxo ha sido ampliamente estudiada desde los años 80.^{68, 69} La formación de los puentes hidroxilo puede deberse a la gran basicidad del 2gb libre ya que el NH_2 del grupo guanidino en el ligante 2gb es una base fuerte con un pK_a calculado por medio del programa ACD labs de 16.97. Comparado con los del resto de los ligantes utilizados que se encuentra el más básico para el ntb $\text{pK}_a = 14.5$ y para el resto pK_a menores o igual a 13.5. Estos cálculos se realizaron utilizando el paquete ACD/ pK_a DB Versión 3.0 para Microsoft Windows. La gran basicidad del 2gb resulta en la desprotonación de las moléculas de H_2O coordinadas al cromo(II) y permite la formación de los puentes hidroxilo, dando como resultado el compuesto dinuclear $[\text{Cr}_2(2\text{gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Los compuestos de coordinación de Cr(III) se caracterizaron utilizando IR, susceptibilidad magnética, espectroscopía electrónica, análisis elemental y difracción de rayos-X. Los análisis elementales, las fórmulas propuestas para cada compuesto a partir del análisis y los momentos magnéticos efectivos se presentan en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Fórmulas, análisis elementales y momentos magnéticos efectivos de los compuestos de cromo(III).

Compuesto	Análisis Elemental			μ_{eff} (M.B.)
	Enc.(Calc.)%			
	C	H	N	
Cr-1 [Cr(2gb) ₃]Cl(ZnCl ₄)•CH ₃ OH	35.20(35.23)	4.47(3.68)	25.38(24.65)	3.9
Cr-2 [Cr(2gb) ₃]Cl ₃ •4H ₂ O	38.13(38.13)	4.15(4.67)	27.16(27.79)	3.9
Cr-3 [Cr ₂ (2gb) ₄ (μ -OH) ₂](ClO ₄) ₄ •5H ₂ O	28.74(28.97)	3.41(3.65)	20.85(21.12)	4.96♦
Cr-4 [Cr(ntb)Cl ₂]Cl•3H ₂ O	44.65(44.56)	4.20(4.67)	14.90(15.16)	3.9
Cr-5 [Cr(bbimpy)Cl ₃]•1/2H ₂ O	48.77(48.51)	2.95(2.80)	14.82(14.90)	3.8
Cr-6 [Cr(4tb) ₂ Cl ₂]Cl•1.5C ₂ H ₅ OH*	41.99(41.63)	3.14(3.83)	13.81(13.87)	3.9
Cr-7 [Cr(2pb) ₂ Cl ₂]Cl•C ₂ H ₅ OH 1/2H ₂ O	51.65(51.71)	4.02(4.17)	13.99(13.92)	3.9

*Análisis elemental de azufre: Enc. (Calc)%: 9.87(10.50). ♦ Momento magnético para el compuesto dinuclear.

Para los compuestos de Cr(III) el μ_{eff} concuerda con el esperado para un compuesto octaédrico con 3 electrones desapareados. El compuesto **Cr-3** presenta un momento de 4.96 M.B. el cual no corresponde al valor esperado ($\mu_{\text{eff}} = 5.4$ M.B.) para un compuesto dinuclear de Cr(III) por lo que se concluye que en la molécula dinuclear existe un acoplamiento magnético. Lo anterior se encuentra en concordancia con lo informado hasta el momento en la literatura donde se indica que los compuestos dinucleares de cromo(III) con puentes hidroxilo y con ligantes tipo amina presentan un comportamiento magnético interesante ampliamente estudiado.⁶⁹ En estos compuestos se presenta un acoplamiento magnético a través de los puentes hidroxilo, en su mayoría se trata de un ligero acoplamiento antiferromagnético informando por ejemplo para el caso del compuesto [Cr₂(μ -OH)₂(tmpa)₂]⁴⁺,⁷⁰ donde tmpa = tris(2-piridilmetil)amina, el momento magnético efectivo es de 3.57 por átomo de cromo que es comparable con el del compuesto **Cr-3** $\mu_{\text{eff}} = 3.6$ por átomo de cromo(III). De mediciones de susceptibilidad magnética en función de temperatura se obtiene que para [Cr₂(μ -OH)₂(tmpa)₂]⁴⁺ el

valor de la constante $J = -15.3 \text{ cm}^{-1}$ es característico de un ligero acoplamiento antiferromagnético.⁶⁹

5.2.2.1 Caracterización espectroscópica UV-Visible e IR de los compuestos de cromo(III).

Para el ion Cr(III) (d^3), en una geometría hexacoordinada se esperan tres transiciones permitidas por espín $v_1: {}^4T_{2g} \leftarrow {}^4A_{2g}$, $v_2: {}^4T_{1g}(F) \leftarrow {}^4A_{2g}$ y $v_3: {}^4T_{1g}(P) \leftarrow {}^4A_{2g}$,⁵⁷ en todos los compuestos se observan las tres transiciones permitidas, por lo tanto se trata de compuestos de cromo(III) octaédricos (Tabla 5.10). Es importante mencionar que las bandas en todos los casos son anchas y no simétricas lo que habla de que se trata de estructuras octaédricas distorsionadas.

Tabla 5.10. Datos espectroscópicos de UV-Vis e I. R. de los compuestos de cromo(III).

Compuesto	UV-Vis.			I.R.			
	v_1	v_2	v_3	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=N})$	$\delta(\text{N-H})$	$\delta(\text{C-H})$
	cm^{-1}			cm^{-1}			
2gb				3140	1648, 1598, 1540	1450	740
Cr-1	20 050, 25 050, 28 650			3190	1666, 1634, 1556	1486	744
Cr-2	19 723, 25 320, 28 010			3190	1668, 1634, 1556	1486	744
Cr-3	17 360, 24 570, 36 100			3194	1667, 1560	1466	749
ntb				3384	1622, 1536	1438	742
Cr-4	16 650, 23 050, 28 580			3384	1622, 1594	1450	744
bbimpy				3055	1599, 1588, 1571	1459	741
Cr-5	16 660, 20 000, 25 000			3068	1607, 1590, 1575	1467	753
4tb				3044	1621, 1577	1453	739
Cr-6	17 860, 23 500, 27 250			3071	1623, 1592	1482	748
2pb				3056	1593, 1567,	1442, 1400	743
Cr-7	17 240, 20 490, 25 970			3072	1608, 1593	1457, 1445	752

Las principales vibraciones observadas para los ligantes bencimidazólicos son las que corresponden a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=N})$; $\delta(\text{N-H})$ y $\delta(\text{C-H})$ del anillo bencimidazólico fuera del plano como se mencionó anteriormente para los compuestos de cobalto(III). En todos los espectros de IR de los compuestos de coordinación de cromo(III) se observan estas vibraciones desplazadas a mayor energía con respecto a la posición de la vibración en el espectro del ligante libre (tabla 5.10). Las vibraciones observadas en los espectros de IR de los compuestos de coordinación (tabla 5.10), indican que todos los ligantes, bbimpy, 2pb, 2gb, ntb y 4tb se coordinan por medio del nitrógeno imidazólico. En los compuestos de 2gb el ligante se coordina de manera bidentada a través del nitrógeno imidazólico y del grupo guanidino, ya que la banda de vibración $\nu(\text{NH}\cdots\text{N})$ del grupo guanidino se desplaza de 3444 cm^{-1} en el ligante libre a 3300 cm^{-1} para **Cr-1** y **Cr-2** y a 3341 cm^{-1} en el espectro del compuesto **Cr-3**. Las vibraciones observadas en el espectro de IR indican que el ntb en el compuesto **Cr-4** se encuentra presente en el compuesto coordinándose de manera tetradentada en forma semejante a como ocurre en el caso de cobalto(III). En el caso de los compuestos con los ligantes bbimpy y 2pb, el ligante se coordina además a través del nitrógeno piridínico. La banda de vibración asociada al anillo de la piridina en 1314 cm^{-1} para 2pb se desplaza a mayor energía.³⁹ En el espectro del compuesto **Cr-7** la banda de vibración se observa dobleteada en 1323 y 1302 cm^{-1} . En el espectro del bbimpy libre se observa una banda intensa en 1317 cm^{-1} asociada al anillo piridínico, la cuál se desplaza a mayor energía y dobletea con la quelatación.⁶¹ En el espectro de IR del compuesto **Cr-5** se observa la banda dobleteada en 1321 y 1310 cm^{-1} . En el espectro del 4tb libre se observa una banda intensa en 1405 cm^{-1} asociada al anillo tiazolil que al coordinarse se desplaza a mayor energía y se dobletea con la quelatación de la misma manera que en el caso del bbimpy y el 2pb. En el espectro del **Cr-6** la banda se observa en 1429 y 1414 cm^{-1} indicativo de coordinación a través del nitrógeno del tiazolil, como se ha informado para diversos metales.⁷¹

5.2.2.2 Cristalografía del compuesto Cr-3.

Se obtuvieron monocristales de Cr-3 por evaporación lenta de metanol/H₂O a temperatura ambiente. Se midieron los datos de difracción de rayos X por medio de procedimientos estándares a 298 K. Los datos los cristalográficos se presentan en el Anexo I.

Tabla 5.11: Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para Cr-3

Cr1-O2	1.960(3)	Cr1-O1	1.961(3)
Cr1-N12	2.021(3)	Cr1-N32	2.023(4)
Cr1-N3	2.045(3)	Cr1-N23	2.052(3)
Cr2-O1	1.953(3)	Cr2-O2	1.955(3)
Cr2-N72	2.019(3)	Cr2-N52	2.020(4)
Cr2-N63	2.056(3)	Cr2-N43	2.060(3)
O2-Cr1-O1	75.83(11)	O2-Cr1-N12	92.50(14)
O1-Cr1-N12	168.30(14)	O2-Cr1-N32	168.65(13)
O1-Cr1-N32	92.86(13)	N12-Cr1-N32	98.82(15)
O2-Cr1-N3	93.25(13)	O1-Cr1-N3	95.54(13)
N12-Cr1-N3	84.10(14)	N32-Cr1-N3	88.72(14)
O2-Cr1-N23	95.31(13)	O1-Cr1-N23	92.78(13)
N12-Cr1-N23	89.10(14)	N32-Cr1-N23	84.14(14)
N3-Cr1-N23	169.29(14)		
Cr2-O1-Cr1	104.03(129)	Cr2-O2-Cr1	104.01(12)

La estructura resuelta para **Cr-3** se presenta en la figura 5.16. La carga del catión dinuclear $[\text{Cr}(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2]^{4+}$ está de acuerdo con los 4 percloratos presentes en la unidad asimétrica y con el hecho de que los protones de los grupos OH puente se encontraron en mapas de Fourier. Los puentes $(\mu\text{-OH})_2$ son simétricos y con longitudes de enlace Cr-O en el intervalo de 1.953° a 1.961 Å. Se tiene una distancia Cr-Cr de 3.085 Å formando un ángulo Cr-O-Cr de 104° similar a lo informado para compuestos con el fragmento $\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2$.⁶⁹ En compuestos con estas características estructurales se presenta un ligero acoplamiento antiferromagnético entre los centros metálicos de cromo(III) con valores de $-J$ en el intervalo de 0.3 a 22 cm^{-1} . En **Cr-3** cada Cr(III) se coordina con dos ligantes 2gb, con distancias de enlace en el intervalo de 2.019 a 2.060 Å. El modo de coordinación del 2gb es el mismo que se presenta en el compuesto **Co-3**.

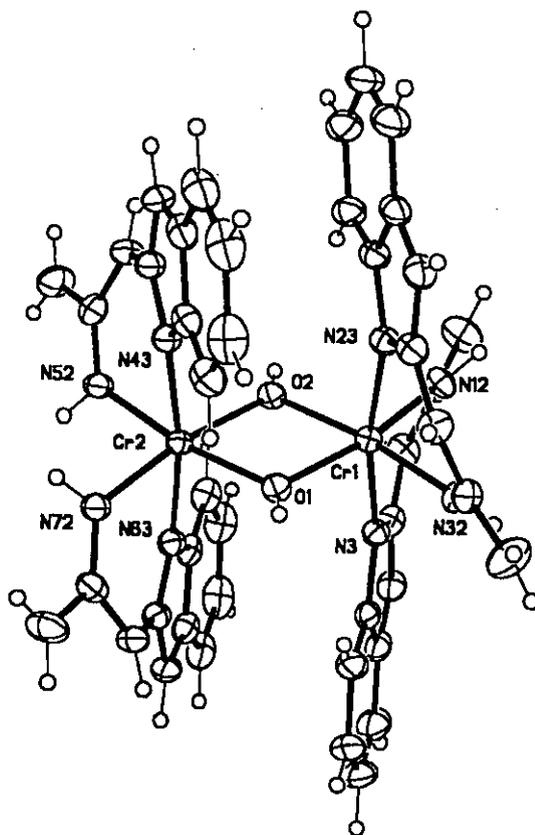


Figura 5.16. Diagrama de ORTEP para Cr-3.

A pesar del arreglo paralelo de los anillos bencimidazólicos en el compuesto, no existen interacciones intermoleculares ó intramoleculares. Un gran número de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de H₂O de cristalización, los grupos μ -OH, NH de los imidazoles y NH y NH₂ del 2gb estabilizan el cristal.

Ma. Elba Quiroz Castro durante el desarrollo del trabajo de tesis de maestría obtuvo la estructura cristalina del compuesto **Cr-4**, cuya fórmula corresponde a: [Cr(ntb)Cl₂]Cl·C₂H₅OH 2H₂O.⁷² El ntb se comporta como ligante tetradentado de manera usual.⁵⁶ Dos cloruros completan la esfera de coordinación dando una geometría octaédrica distorsionada alrededor del Cr(III). Figura 5.17.

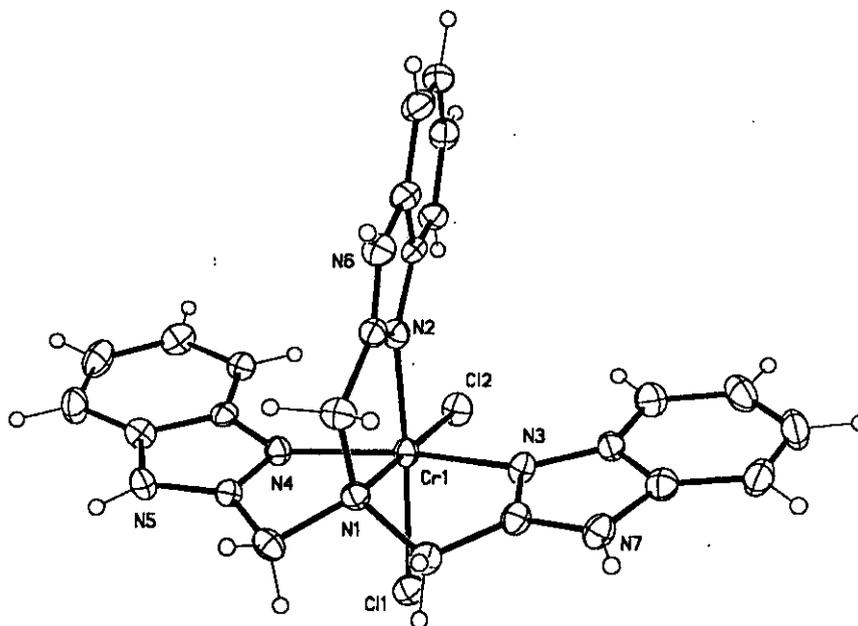


Figura 5.17. Diagrama de ORTEP de [Cr(ntb)Cl₂]²⁺.

Los datos de IR, análisis elemental y susceptibilidad magnética de **Cr-4** apoyan esta estructura propuesta.

5.2.1.3 Estructuras de los compuestos de cromo(III).

Lo anteriormente expuesto para los compuestos de cromo(III) se puede resumir en que las estructuras para cada compuesto son:

$[\text{Cr}(\text{2gb})_3]^{3+}$ (**Cr-1** y **Cr-2**) de los resultados de análisis elementales, espectroscopía electrónica y susceptibilidad magnética se sabe que en ambos casos se trata de compuestos trisquelato octaédricos de Cr(III). Los sitios de coordinación confirmados por espectroscopía IR son como se observó para cobalto(III) el nitrógeno imidazólico y el guanidínico.

$[\text{Cr}_2(\text{2gb})_4(\mu\text{-OH})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**Cr-3**) a partir de espectroscopía electrónica se observa que se trata de un compuesto octaédrico. El sitio de coordinación del 2gb es el mismo que en el caso de **Cr-1** y **Cr-2**. Del análisis elemental se concluye que se trata de un compuesto dinuclear de Cr(III) con dos puentes hidróxido, lo cuál se confirma al resolverse la estructura cristalina por medio de la técnica de difracción de rayos-X.

$[\text{Cr}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**Cr-4**) el ligante ntb se coordina al Cr(III) por medio de los tres nitrógenos imidazólicos y además a través del nitrógeno central comportándose como un ligante tetradentado lo que se observa por medio de su espectro IR. Se trata de un compuesto octaédrico de Cr(III) lo que se confirma por espectroscopía electrónica y su momento magnético efectivo por lo que la esfera de coordinación se completa con dos cloruros. La estructura cristalina fue resuelta y se confirma la estructura propuesta.

$[\text{Cr}(\text{bbimpy})\text{Cl}_3] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**Cr-5**) el bbimpy se coordina por los nitrógenos imidazólicos y el piridínico lo que se confirma por espectroscopía IR. Del espectro electrónico y la medición de susceptibilidad magnética se concluye que se trata de un compuesto octaédrico de Cr(III). Por lo que del análisis elemental se concluye

que se tiene un ligante tridentado bbimpy y la esfera de coordinación se completa con tres cloruros.

$[\text{Cr}(\text{4tb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 1.5\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (**Cr-6**) del espectro de IR se reconocen los sitios de coordinación del ligante como el nitrógeno imidazólico y el nitrógeno del grupo tiazolil. De los datos de espectroscopía electrónica y su comportamiento magnético se trata nuevamente de un compuesto octaédrico de Cr(III); por lo que la esfera de coordinación consta de 2 ligantes bidentados 4tb y dos cloruros.

$[\text{Cr}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**Cr-7**) del espectro de IR se reconocen los sitios de coordinación del ligante como el nitrógeno imidazólico y el nitrógeno piridínico. De los datos de espectroscopía electrónica y su comportamiento magnético se trata nuevamente de un compuesto octaédrico de Cr(III); por lo que la esfera de coordinación consta de 2 ligantes bidentados 2pb y dos cloruros.

5.2.3 Compuestos de coordinación de hierro (III)

Hasta el momento se encuentran informados en la literatura pocos ejemplos de compuestos de coordinación con el ion metálico hierro(III) y ligantes derivados del imidazol en todos los casos utilizando ligantes tridentados o de número de quelatación mayor.^{28, 37, 38}

Las síntesis de los compuestos **Fe-2** y **Fe-3** se encuentran informadas previamente.^{28, 40} Los compuestos **Fe-2** y **Fe-3** sintetizados durante la realización de este proyecto corresponden a los compuestos anteriormente informados.

En los compuestos **Fe-1**, **Fe-2**, **Fe-4** y **Fe-5** los espectros electrónicos corresponden a los de compuestos de Fe(III), es decir un ion d^5 . En el caso de geometrías octaédricas de alto espín no se presentan transiciones d-d permitidas; únicamente se observan bandas de transferencia de carga (Tabla 5.12).⁵⁷ El

compuesto **Fe-3** parece ser un compuesto de Fe(III) de bajo espín los cuales son muy raros. Las bandas obtenidas en el espectro electrónico para iones d^5 de bajo espín son bandas de transferencia de carga y algunas bandas muy débiles que pueden asignarse a transiciones d-d.⁵⁷ Los compuestos octaédricos de bajo espín de Fe(III) son muy raros y sus transiciones son muy débiles. En la literatura se informa de compuestos de Fe(II) con este tipo de ligantes los cuales presentan entrecruzamiento de espín; los compuestos de Fe(III) sintetizados con ligantes bencimidazólicos pueden tratarse de compuestos de bajo espín.⁴⁰

Tabla 5.12. Fórmulas, datos de espectroscopía electrónica, análisis elementales y momentos magnéticos efectivos de los compuestos de hierro(III).

Compuesto	UV-Vis	Análisis Elemental			μ_{eff}
	λ_{max} cm^{-1}	C	H	N	M.B.
Fe-1 [Fe(2gb) ₃](NO ₃) ₃	24 814	37.59(37.56)	3.66(3.33)		5.89
				31.94(32.85)	
Fe-2 [Fe(ntb)Cl ₂]Cl•3H ₂ O	23 640	46.24(46.22)	4.67(4.36)		5.92
				15.35(15.72)	
Fe-3 [Fe(bbimpy)Cl ₃]•3H ₂ O	10 835, 21 276	43.92(43.25)	3.62(3.63)		2.65
				13.87(13.27)	
Fe-4 [Fe(4tb) ₃]Cl ₃	21 645	44.43(44.61)	2.63(2.90)		4.04
				15.84(17.27)	
Fe-5 [Fe(2pb) ₂ Cl ₂]Cl•H ₂ O	22 472	50.38(50.51)	3.11(3.53)		5.9
				14.89(14.73)	

Los compuestos **Fe-1**, **Fe-2** y **Fe-5** poseen un μ_{eff} para un compuesto octaédrico de Fe(III) de alto espín, con 5 electrones desapareados. Los compuestos **Fe-3** y **Fe-4** presentan un μ_{eff} que nos habla de una mezcla de compuestos de alto y bajo espín lo que se había observado previamente en

compuestos similares por medio de estudios de resonancia paramagnética electrónica.⁴⁰

Es necesario la realización de un estudio magnético formal de estos compuestos ya que en el caso de los compuestos con estos ligantes y el ion metálico hierro(II) se presenta el fenómeno magnético de entrecruzamiento de espín.

5.2.3.1 Caracterización espectroscópica UV-Visible e IR de los compuestos de hierro(III).

En los espectros de IR las principales vibraciones observadas para los ligantes bencimidazólicos son las que corresponden a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=N})$; $\delta(\text{N-H})$ y $\delta(\text{C-H})$ del anillo bencimidazólico fuera del plano como se mencionó anteriormente. En todos los espectros de IR de los compuestos de coordinación de hierro(III) se observan estas vibraciones desplazadas a mayor energía con respecto a la posición de la vibración en el espectro del ligante libre. Las vibraciones observadas en los espectros de IR de los compuestos de coordinación indican que todos los ligantes: bbimpy, 2pb, 2gb, ntb y 4tb se coordinan por medio del nitrógeno imidazólico. En el compuesto de 2gb el ligante se coordina de manera bidentada a través del nitrógeno imidazólico y del grupo guanidino, ya que la banda de vibración $\nu(\text{NH}\cdots\text{N})$ del grupo guanidino se desplaza de 3444 cm^{-1} en el ligante libre a 3328 cm^{-1} para **Fe-1**. Las vibraciones observadas en el espectro de IR indican que el ntb en el compuesto **Fe-2** se encuentra presente en el compuesto coordinándose de manera tetradentada en forma semejante a como ocurre en el caso de cobalto y cromo. En el caso de los compuestos con los ligantes bbimpy y 2pb, el ligante se coordina además a través del nitrógeno piridínico. La banda de vibración asociada al anillo de la piridina en 1314 cm^{-1} para 2pb se desplaza a mayor energía. En el compuesto **Fe-5** la banda de vibración se observa dobleteada en 1321.6 y 1300 cm^{-1} . En el espectro del bbimpy libre se observa una banda intensa en 1317 cm^{-1} asociada al anillo

piridínico. En el espectro de IR del compuesto **Fe-3** se observa la banda desplazada a mayor energía en 1319.5 cm^{-1} . En el espectro del 4tb libre se observa una banda intensa en 1405 cm^{-1} asociada al anillo tiazolil que al coordinarse se desplaza a mayor energía y se dobletea con la quelatación de la misma manera que en el caso del bbimpy y el 2pb. En el espectro del **Fe-4** la banda se observa en 1427.9 y 1412 cm^{-1} indicativo de coordinación a través del nitrógeno del tiazolil, como se ha informado para diversos metales.⁷¹

5.2.1.2 Estructuras de los compuestos de hierro(III).

Lo anteriormente expuesto para los compuestos de hierro(III) se puede resumir en que las estructuras para cada compuesto son:

$[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$ (**Fe-1**) los sitios de coordinación confirmados por espectroscopía IR son como se observó para cobalto(III) y cromo(III) el nitrógeno imidazólico y el guanidínico. Los resultados de análisis elementales, espectroscopía electrónica y susceptibilidad magnética indican que se trata del compuesto trisquelato octaédrico de alto espín de Fe(III).

$[\text{Fe}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**Fe-2**) los sitios de coordinación confirmados por espectroscopía IR son como se observó para cobalto(III) y cromo(III) los tres nitrógenos imidazólicos y el nitrógeno central. Los resultados de análisis elementales, espectroscopía electrónica y susceptibilidad magnética indican que se trata de un compuesto octaédrico de alto espín de Fe(III) previamente sintetizado.^{ref}

$[\text{Fe}(\text{bbimpy})\text{Cl}_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**Fe-3**) los resultados de análisis elementales, espectroscopía electrónica y susceptibilidad magnética indican que se trata probablemente de un compuesto octaédrico de hierro(III) de bajo espín. Del espectro de IR se concluye que el bbimpy se coordina por medio de los dos nitrógenos imidazólicos así como el nitrógeno piridínico.

$[\text{Fe}(\text{4tb})_3]\text{Cl}_3$ (**Fe-4**) los resultados de análisis elementales y espectroscopía electrónica indican que se trata de un compuesto octaédrico de hierro(III) de bajo espín. El comportamiento magnético podría explicarse como una mezcla de alto y bajo espín. Del espectro de IR se concluye que los sitios de coordinación son el nitrógeno imidazólicos y el nitrógeno del grupo tiazolil.

$[\text{Fe}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**Fe-5**) los resultados de análisis elementales, espectroscopía electrónica y susceptibilidad magnética indican que se trata de un compuesto octaédrico de hierro(III) de bajo espín. Del espectro de IR se concluye que el 2pb se coordina por medio del nitrógeno imidazólico así como el nitrógeno piridínico.

5.3 Estudios de estabilidad de los compuestos de coordinación en solución.

Se realizó un estudio de estabilidad en solución de los compuestos para establecer las condiciones en las cuales se llevaría a cabo el estudio cinético así como conocer la especie reaccionante bajo dichas condiciones.

Debido a la baja solubilidad de los compuestos se disuelven en DMSO y posteriormente se llevan a una mezcla DMSO/ H_2O a pH controlado utilizando una solución acuosa de Tris/HCl pH=7.0 que contiene una concentración 0.1 M de NaCl. Se obtienen los espectros electrónicos en solución en el intervalo de 200 a 800 nm y se observa su estabilidad bajo esas condiciones. En la tabla 5.13 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.13. Espectroscopía electrónica en disolución DMSO/H₂O. Concentración de los compuestos de coordinación 1mM.

Compuesto	DMSO/H ₂ O	λ_{\max} nm	ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹
Co-1 [Co(bbimpy-H) ₂]OH	No soluble		
Co-2 [Co(2pb) ₂ (NO ₃)](NO ₃) ₂ •C ₂ H ₆ O	10%	350	49 483 (TC)
Co-3 [Co(2gb) ₃]Cl(NO ₃) ₂ •H ₂ O	10%	508	359.03
Co-4 [Co(2gb) ₃](CCl ₃ COO) ₃ •H ₂ O	10%	510	566.03
Co-5 [Co(2gb) ₃]Cl ₃ •3H ₂ O	10%	510	336.75
Co-7 [Co(2amb) ₃]Cl ₃ •2H ₂ O*	10%	504	217.90
Cr-1 [Cr(2gb) ₃]Cl(ZnCl ₄)•CH ₄ O	10%	504	131.2
Cr-2 [Cr(2gb) ₃]Cl ₃ •4H ₂ O	10%	488	218.8
Cr-3 [Cr ₂ (2gb) ₄ (μ -OH) ₂](ClO ₄) ₄ •5H ₂ O	10%	524	115.59
Cr-4 [Cr(ntb)Cl ₂]Cl ₃ •3H ₂ O	50%	582, 414	181.4, 346
Cr-5 [Cr(bbimpy)Cl ₃]•1/2H ₂ O	No soluble		
Cr-6 [Cr(4tb) ₂ Cl ₂]Cl•1.5C ₂ H ₆ O*	50%	530	69.49
Cr-7 [Cr(2pb) ₂ Cl ₂]Cl•2H ₂ O	50%	334, 308	TC
Fe-1 [Fe(2gb) ₃](NO ₃) ₃	50%	350	TC
Fe-2 [Fe(ntb)Cl ₂]Cl•3H ₂ O	50%	370	TC
Fe-3 [Fe(bbimpy)Cl ₃]•3H ₂ O	Reducción a Fe(II)		
Fe-4 [Fe(4tb) ₃]Cl ₃	No soluble		
Fe-5 [Fe(2pb) ₂ Cl ₂]Cl•H ₂ O	No soluble		

A partir de los experimentos anteriores se concluye que en lo referente a los compuestos de cobalto(III) no se estudiarán los compuestos **Co-1**, por su baja solubilidad, y **Co-2**, ya que es una mezcla de isómeros como se observó en los espectros de RMN y no fue posible separar los compuestos. Los compuestos de

cobalto(III) y el ligante 2gb muestran características diferentes entre sí lo cuál se observa claramente en los espectros electrónicos en disolución por lo que los estudios cinéticos se realizaron con los tres compuestos.

Los compuestos de cromo(III) son estables en solución a excepción del compuesto $[\text{Cr}(\text{bbimpy})\text{Cl}_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ el cual no es soluble en la mezcla DMSO/ H_2O . Los compuestos **Cr-4**, **Cr-6** y **Cr-7** presentan reacciones de sustitución de los cloruros en su esfera de coordinación por moléculas de disolvente, dando lugar a especies con carga 3+. Se realizó un ensayo cualitativo para determinar la carga de las especies en disolución de los compuestos **Cr-4**, **Cr-6** y **Cr-7** mediante cromatografía de intercambio catiónico en una resina DOWEX 50WX. Los compuestos en todos los casos presentaron una carga mayor o igual a 3+ ya que una vez cargados en la columna no pueden ser desplazados por el compuesto $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$.

Por último, en los compuestos de hierro(III) se presenta la formación de hidróxidos por lo que únicamente son estables bajo las condiciones empleadas los compuestos: $[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$ y $[\text{Fe}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. El compuesto con el ligante bbimpy se reduce en disolución en forma espontánea. Lo que se confirma por el cambio de color en disolución de amarillo a azul grisáceo, se observa un máximo de absorción en 574 nm con ϵ de $1300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. no esperándose transición d-d permitida en el caso de un ion d^5 .

5.4 Estudios cinéticos de reacciones de transferencia electrónica en plastocianina.

5.4.1. Influencia del medio de reacción.

Se informa en la literatura que en las reacciones redox en PCu en que se utilizan compuestos de coordinación como oxidantes en condiciones de pseudo primer orden los datos cinéticos experimentales se ajustan a una expresión empírica del tipo:⁶

$$k_{obs} = \frac{[oxidante]}{A + B[oxidante]} \quad 5.0$$

Donde k_{obs} se obtiene a partir del ajuste de los datos experimentales de absorbancia en función del tiempo a una ecuación de primer orden como se muestra en la figura 5.18.

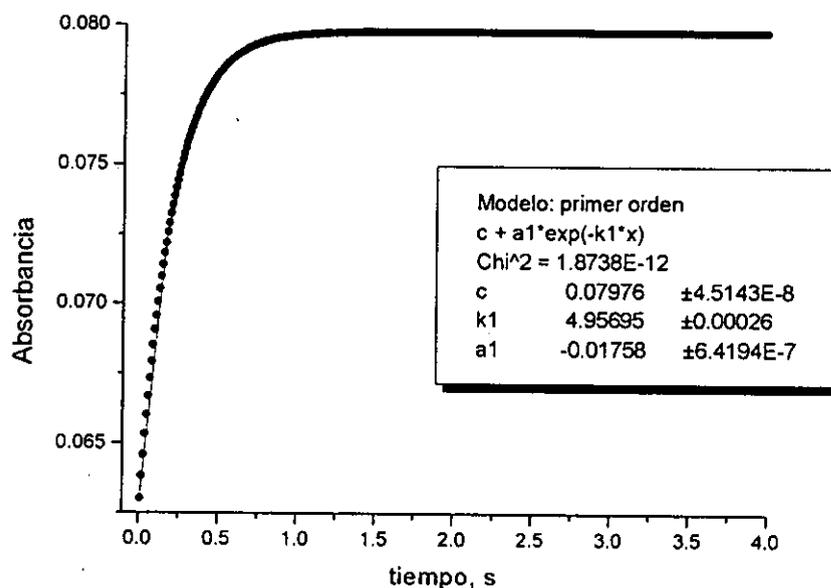
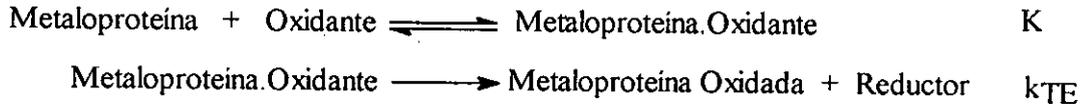


Figura 5.18 Ajuste de los datos experimentales de la reacción de oxidación de PCu(I) por $[Co(fen)_3]^{3+}$ Tris/HCl pH= 8.0, I = 0.03 M (NaCl); T = 25 °C.

La ley de rapidez 5.0 puede explicarse al menos por tres mecanismos diferentes:

Mecanismo A

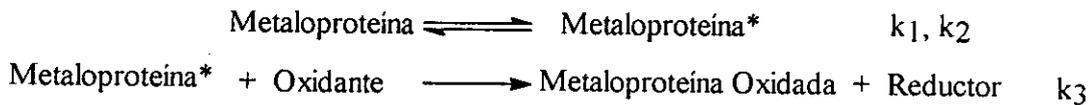


La ley de rapidez que se deriva de este mecanismo de reacción es la siguiente:

$$k_{obs} = \frac{k_{TE}K[\text{oxidante}]}{1 + K[\text{oxidante}]} \quad 5.1$$

Este esquema se conoce como mecanismo de cinética limitante, donde la transferencia electrónica es el paso limitante de reacción que es precedida por la formación de un aducto precursor detectable cinéticamente. Si se cumple la condición de que $K[\text{oxidante}] \ll 1$ la ley de rapidez se reduce a $k_{obs} = k_{TE}K[\text{oxidante}]$ y por lo tanto existe una dependencia de primer orden de la k_{obs} con la concentración del oxidante.

Mecanismo B



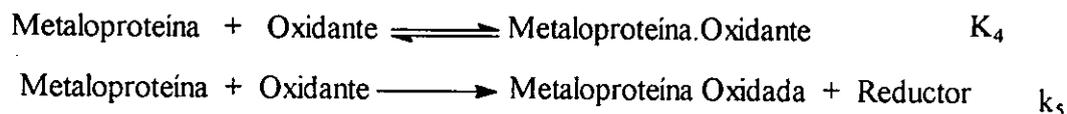
La ley de rapidez que se deriva del mecanismo de reacción B es la siguiente:

$$k_{obs} = \frac{k_1 k_3 [\text{oxidante}]}{k_2 + k_3 [\text{oxidante}]} \quad 5.2$$

Este esquema indica que la reacción procede después de que ocurre una reorganización o activación de la metaloproteína. En la interpretación de este mecanismo se observa que las rapidezces de las reacciones deben ser similares sin importar la identidad del oxidante. En los estudios realizados con varias metaloproteínas (PCu, Fd, citocromos) hasta el momento es claro que la rapidez

depende de manera importante del oxidante por lo que el mecanismo B no parece el adecuado.¹³

Mecanismo C

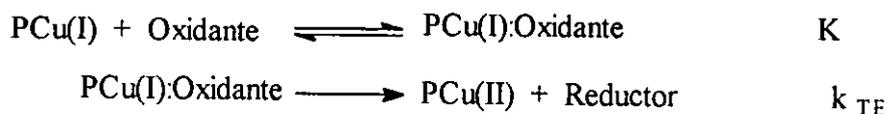


Derivándose de este mecanismo de reacción la ley de rapidez siguiente:

$$k_{obs} = \frac{k_5[\text{oxidante}]}{1 + K_4[\text{oxidante}]} \quad 5.3$$

En este mecanismo denominado "dead-end", se presenta una fuerte asociación del oxidante con la proteína dando lugar a un aducto inactivo. La reacción procede únicamente por un choque bimolecular entre la proteína libre y el agente oxidante. Un número de observaciones experimentales descartan este mecanismo ya que la transferencia electrónica intra-aducto en el mecanismo A no se ve influenciada por la fuerza iónica, por otro lado en el mecanismo C tanto K_4 y k_5 corresponden a reacciones bimoleculares las cuales deben ser influenciadas por variaciones en la fuerza iónica. Además no se ha observado una inactivación completa al utilizarse agentes inactivos redox como se sugiere por el mecanismo C.¹³

A partir de todo lo anterior se ha propuesto el mecanismo A para las reacciones de transferencia de electrones entre la PCu y los oxidantes inorgánicos utilizados.



La ley de rapidez es por lo tanto la siguiente:

$$k_{obs} = \frac{k_{TE}K[\text{oxidante}]}{1 + K[\text{oxidante}]} \quad 5.4$$

La forma lineal de esta ley de rapidez es la siguiente:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_{TE}} + \frac{1}{k_{TE}K[\text{oxidante}]} \quad 5.5$$

Por lo que una gráfica de $(k_{obs})^{-1}$ contra $[\text{oxidante}]^{-1}$ nos da una línea recta de pendiente $1/k_{TE}K$ y ordenada al origen $1/k_{TE}$.

Durante la realización de esta tesis se utilizó un medio de reacción nunca antes utilizado para reacciones de transferencia electrónica con proteínas; DMSO/H₂O (25%) fijando el pH en 7.0 y 8.0 por medio de una solución amortiguadora Tris/HCl y con fuerza iónica de 0.03 M (NaCl), ya que hasta el momento los estudios cinéticos en las reacciones redox de plastocianina se habían realizado en medios acuosos y con fuerzas iónicas mayores (en su mayoría 0.1 M).¹¹ Se evaluó la influencia del medio de reacción en la transferencia electrónica. Este estudio se llevó a cabo en la reacción de transferencia electrónica entre la PCu(I) de espinaca y el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ ampliamente estudiada.^{19, 20} La reacción se llevó a cabo en primer lugar en medio acuoso (Tris/HCl pH=8.0, I=0.03 M (NaCl) y T=25°C) y se encontró que obedece el mecanismo de reacción informado en la literatura para las reacciones de transferencia electrónica entre oxidantes y metaloproteínas.

Las reacciones de transferencia electrónica entre la PCu(I) de espinaca y el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, tanto en medio acuoso (Tris/HCl pH=8.0, I=0.03 M (NaCl)) como en una solución DMSO/H₂O (25%) (Tris/HCl pH=8.0, I=0.03 M (NaCl)) siguen una cinética limitante como se observa en la figura 5.19.

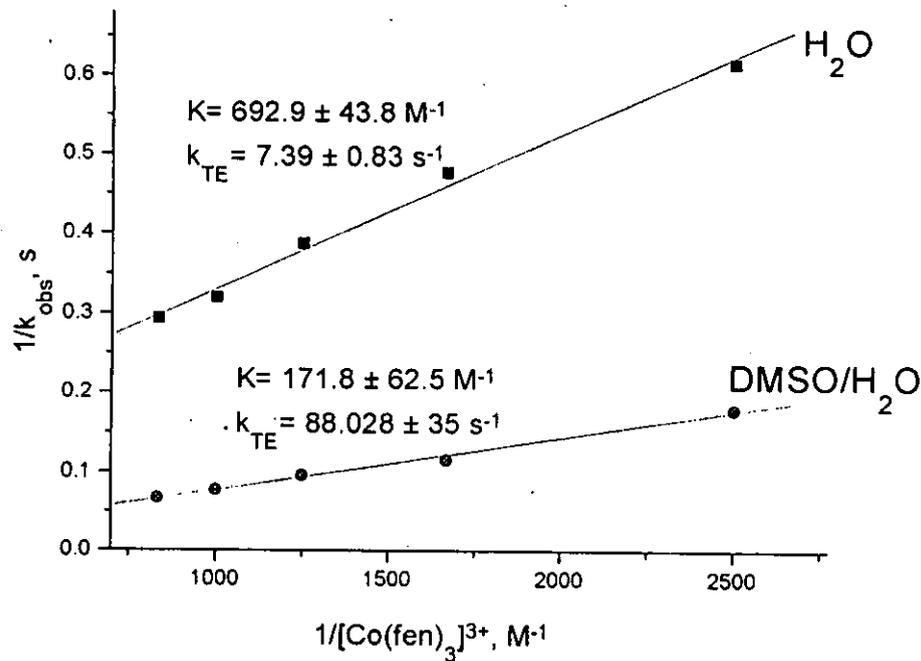
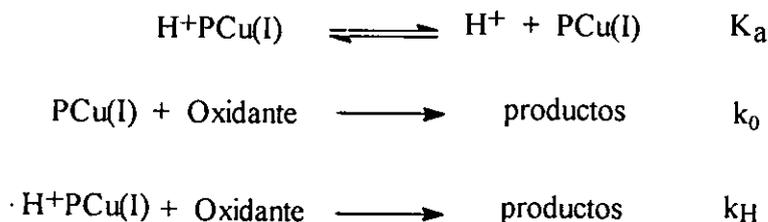


Figura 5.19. Reacción de oxidación de PCu(I) por $[Co(fen)_3]^{3+}$. ■ Medio acuoso Tris/HCl pH= 8.0, I = 0.03 M (NaCl); T = 25 °C y ● Medio de reacción DMSO/H₂O (25%) Tris/HCl pH= 8.0, I = 0.03 M (NaCl); T = 25 °C

Se observa comportamiento lineal en ambos casos al trazar $(k_{obs})^{-1}$ en función de $[oxidante]^{-1}$. Si se cumple la condición de que $K[oxidante] \ll 1$, la ley de rapidez se reduce a $k_{obs} = k_{TE}K[oxidante]$ como se mencionó anteriormente y por lo tanto existe una dependencia de primer orden de la k_{obs} con la concentración del oxidante. Esta condición se cumple cuando K es muy pequeña, es decir la asociación del oxidante con la proteína es muy débil o, por otro lado, cuando la concentración del oxidante es muy pequeña. La ley de rapidez se reduce a una cinética de 2º orden donde $d[PCu(I)]/dt = k[PCu(I)][oxidante]$.

De los resultados mostrados en la figura 5.19 se observa que el medio de reacción afecta de manera muy marcada la rapidez de reacción aunque el mecanismo de reacción no varía y en ambos casos se observa una cinética limitante. En la literatura se informa para la oxidación de la PCu(I) de espinaca

con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$; en condiciones de buffer de cacodilato de sodio/HCl a pH 7.5, $I = 0.10 \text{ M}$ (NaCl) a una temperatura de 25°C ; los valores de $K = 389 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 16.7 \text{ s}^{-1}$ ¹⁹ y los encontrados bajo nuestras condiciones experimentales en solución acuosa son $K = 692.9 \pm 43.9 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 7.39 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ ambas constantes en los diferentes experimentos se encuentran en el mismo orden de reacción, la diferencia encontrada se debe al medio de reacción. En 1978 Sykes²² informa que las reacciones de transferencia electrónica entre la plastocianina de perejil y el oxidante $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ se ven influenciadas por la identidad del amortiguador utilizado mencionando que se observó que las constantes de rapidez de reacción en Tris eran 20% mayores con respecto a las constantes de rapidez utilizando cacodilato como amortiguador en la región de pH en que ambos amortiguadores se traslapan. Al mismo tiempo se observó que K aumentaba de manera apreciable al disminuir la fuerza iónica. Cabe mencionar además de que la reacción de oxidación de la PCu(I) se ve afectada por el pH según el mecanismo siguiente:



Dando lugar a la expresión:

$$k_{obs} = \frac{k_0 K_a + k_H [H^+]}{K_a + [H^+]} \quad 5.6$$

Se ha informado por estudios de RMN que el valor de pKa para la protonación del sitio activo de la plastocianina de espinaca es de 4.9.⁷³

En conclusión, se ha informado que las constantes de rapidez de reacción para la transferencia electrónica en PCu dependen tanto del pH como de la naturaleza de la sustancia amortiguadora y de la fuerza iónica. Los resultados obtenidos en medio acuoso bajo nuestras condiciones experimentales están en

concordancia con lo expuesto. La constante de asociación K aumenta de manera muy marcada al disminuir la fuerza iónica como era de esperarse.

Al comparar los resultados obtenidos en medio acuoso con respecto a la mezcla DMSO/H₂O (25%) bajo las mismas condiciones de pH, sustancia amortiguadora, temperatura y fuerza iónica los valores de $K = 692.9 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 7.39 \text{ s}^{-1}$ para el medio acuoso y de $K = 171.8 \pm 62.5 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 88.028 \pm 35 \text{ s}^{-1}$ para la mezcla DMSO/H₂O son notablemente diferentes. Se observa una disminución considerable del valor de la constante de asociación K en la mezcla DMSO/H₂O de un 75% con respecto al medio acuoso; es decir a bajas concentraciones de oxidante ya no se observa una cinética limitante. La presencia del DMSO cambia la constante dieléctrica del medio y dado que el aducto se estabiliza mediante interacciones electrostáticas es de esperarse un cambio importante en la constante de asociación. En cuanto al valor de la k_{TE} en la mezcla DMSO/H₂O la constante es 12 veces mayor que aquélla medida en medio acuoso, es decir la transferencia electrónica intra-aducto se lleva a cabo 12 veces más rápido en presencia de DMSO. Conociendo que la transferencia electrónica es el paso limitante de la reacción se observa que la presencia del DMSO acelera la rapidez de la reacción. Esta aceleración puede deberse a que dado que el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ utiliza diferentes sitios de unión, el medio de reacción puede propiciar que la transferencia electrónica intramolecular se lleve a cabo a lo largo de distancias distintas, es decir utilizando distintos sitios de unión del compuesto.

Se han estudiado las reacciones de la PCu(I) de perejil en medio acuoso, $T = 25^\circ \text{ C}$, pH de 7 y $I = 0.1 \text{ M}$ con dos compuestos diferentes: $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. El compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ ($K = 167 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 17.9 \text{ s}^{-1}$) presenta un sitio de unión preferente en el lado este de la proteína cerca de la Tyr-83 donde se encuentran los residuos ácidos 42-45 y a una distancia 10-12 Å del cobre,^{22, 74} dando lugar a una transferencia electrónica de largo alcance favorecida por la fuerte asociación del $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ a la proteína. Por otro lado, el compuesto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ($K = 110 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 170 \text{ s}^{-1}$) se une a la proteína por el lado norte cerca de la His-87, el cuál representa el mayor acercamiento al sitio activo de

cobre aproximadamente 6 Å, por lo que la reacción ocurre más rápidamente (Figura 5.20).^{22, 23}

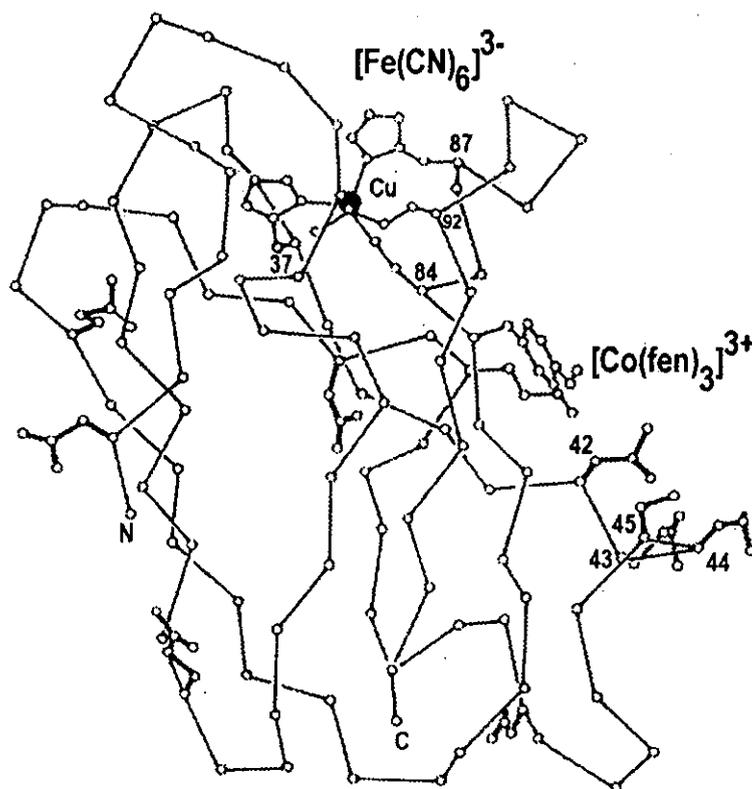


Figura 5.20. Estructura de la plastocianina informada por Freeman⁷ con los sitios de unión indicados para $[Fe(CN)_6]^{3-}$ y $[Co(fen)_3]^{3+}$.

La diferencia en la rapidez de reacción en nuestro estudio para la reacción de oxidación de PCu(I) por $[Co(fen)_3]^{3+}$, dependiendo del medio de reacción, se puede evaluar fácilmente al comparar las constantes de rapidez de segundo orden k_{TEK} . Las constantes de rapidez de segundo orden k_{TEK} son de distinto orden de magnitud dependiendo del medio de reacción utilizado. En medio acuoso el producto k_{TEK} es $5.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ similar al del caso de la reacción informada entre PCu(I) (perejil) y $[Co(fen)_3]^{3+}$ donde k_{TEK} es $3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En cambio para la mezcla DMSO/H₂O el valor para k_{TEK} es $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ el cual es similar al de la

reacción de PCu(I) (perejil) y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ donde $k_{TE}K$ es $9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.²² En el segundo caso se observa una aceleración importante de la transferencia electrónica, superior al 100% en presencia de DMSO.

Adicionalmente estudiamos el efecto de la temperatura en la reacción de oxidación de PCu(I) de espinaca con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ en ambos medios. Los resultados se presentan en la tabla 5.14 y la figura 5.21.

Tabla 5.14 Efecto de la temperatura en las constantes de rapidez de reacción de segundo orden en los diferentes medios de reacción para la reacción de oxidación de PCu(I) con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl), $\text{pH} = 8.0$ Tris/ H_2O .

Temperatura K	H_2O	$\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (25%)
	$k_{\text{exp.}} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{exp.}} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
297.35	3235.7	10147.5
297.85	3359.8	11930
298.65	3561.5	12430
299.85	3891.5	13600
300.75	4354.5	14835
301.75	4718.5	

De los resultados se observa que los parámetros cinéticos cambian dependiendo del medio de reacción. La reacción se ve energéticamente favorecida al utilizar la mezcla DMSO/ H_2O (25%) ya que el valor de entalpía de activación es 45.7 kJ/mol , mientras que el obtenido para la misma reacción en solución acuosa es de 62 kJ/mol , es decir se encuentra una disminución importante de 16.3 kJ/mol . Los valores de ΔS^\ddagger son radicalmente diferentes en agua $\Delta S^\ddagger = 30.9 \text{ J/mol K}$ mientras que en el medio de reacción DMSO/ H_2O $\Delta S^\ddagger = -13.7 \text{ J/mol K}$.

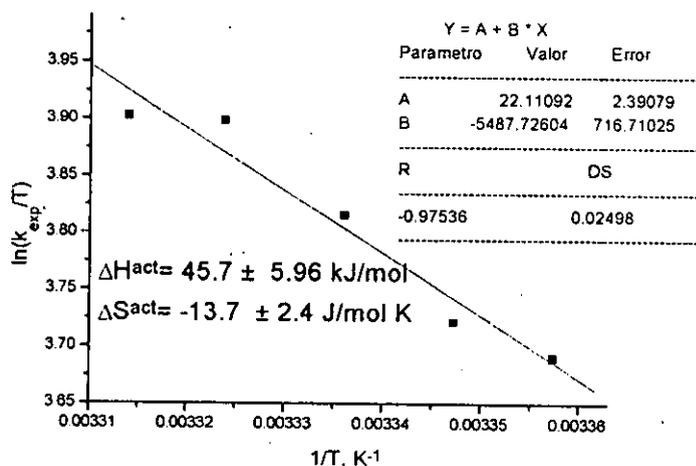
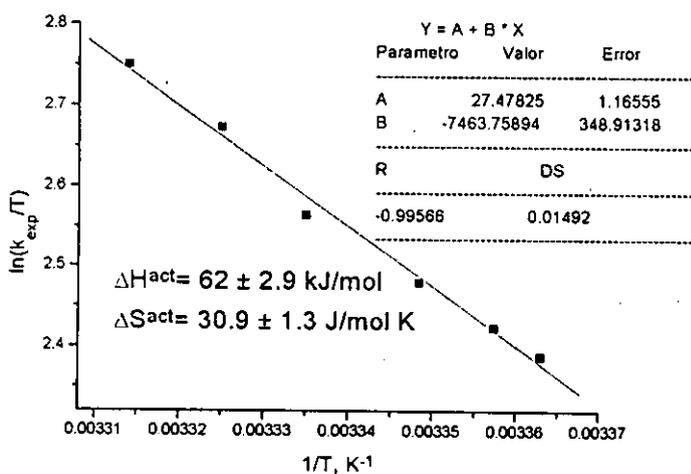


Figura 5.21. Efecto de la temperatura en la reacción de oxidación de PCu(I) con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$; Tris/HCl (20 mM) pH 8.0, $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl). Gráfica izquierda medio acuoso y gráfica derecha mezcla DMSO/H₂O (25%); donde k_{exp} es la constante experimental de segundo orden.

Los valores de los parámetros de activación en agua son comparables con los informados para la misma reacción pero utilizando plastocianina de perejil y fuerza iónica de 0.10 M donde se informa $\Delta H^{\ddagger} = 59.83 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta S^{\ddagger} = 25.1 \text{ J/mol K}$.²² En cuanto al valor de $\Delta S^{\ddagger} = -13.7 \text{ J/mol K}$ para la mezcla DMSO/H₂O es diferente a los resultados que se encuentran en la literatura hasta el momento en que se informan valores negativos de ΔS^{\ddagger} para el caso en que los oxidantes utilizados posean carga negativa, como es el caso de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $\Delta S^{\ddagger} = -196.6 \text{ J/mol K}$ y de $[\text{Co}(4,7\text{-DPSfen})_3]^{3+}$, (4,7-DPSfen = 4,7-difenil-4'-sulfonato-1,10-fenantrolina), cuyo $\Delta S^{\ddagger} = -75.312 \text{ J/mol K}$.²² En todos los casos el mecanismo de reacción propuesto es de cinética limitante aunque el valor de K en el caso de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ es muy pequeño 110 M^{-1} .

En la figura 5.22 se muestra la relación isocinética de ΔH^\ddagger en función de ΔS^\ddagger con los resultados de este trabajo comparados con los publicados por Sykes.²²

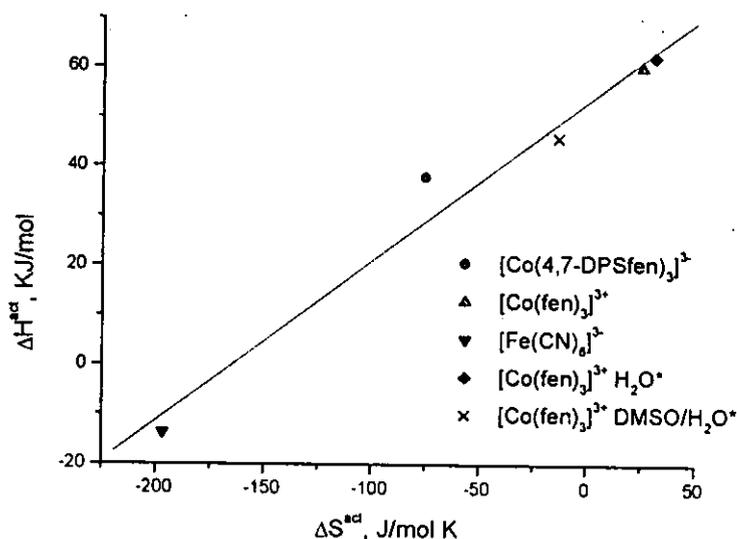


Figura 5.22. Gráfica de ΔH^\ddagger vs ΔS^\ddagger para las reacciones de transferencia electrónica entre la PCu(I) y diferentes oxidantes. * Valores obtenidos en este trabajo.

De la gráfica anterior se observa la importancia de la carga del compuesto utilizado como oxidante en el parámetro ΔS^\ddagger . Los compuestos con carga negativa poseen valores de ΔS^\ddagger negativos y además poseen una barrera energética menor.

En conclusión, el medio de reacción es determinante en las rapidez de reacción de la transferencia electrónica entre la PCu(I) y el oxidante [Co(fen)₃]³⁺ dando lugar a una aceleración importante de la reacción en presencia de DMSO. El mecanismo de reacción no se ve afectado mostrándose un mecanismo de cinética limitante, aunque la asociación del compuesto a la proteína disminuye mientras que la transferencia electrónica que es el paso determinante de la reacción se realiza a una mayor rapidez.

5.4.2. Reacciones de transferencia electrónica entre PCu y compuestos de coordinación de derivados bencimidazólicos.

Los valores de potenciales normales E^0 a pH= 7.0 para plastocianinas de diferentes fuentes se encuentran en el intervalo de 347 a 395 mV.¹¹ El potencial de reducción para PCu de espinaca es de 375 mV este potencial en comparación al del par $\text{Cu}^{II}/\text{Cu}^I$ en agua (115 mV) corresponde a una estabilización del estado reducido en la proteína. La alta reactividad de la PCu permite que solamente un pequeño intervalo de reactivos redox se puedan estudiar cinéticamente por métodos de mezclado rápido y flujo detenido "stopped-flow".

Los compuestos de coordinación que se han utilizado como reactivos redox en las reacciones con PCu son en su gran mayoría compuestos inertes a la sustitución. Entre los compuestos utilizados hasta el momento se encuentran $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$, $[\text{Co}(\text{dipic})_2]^{1-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{CH}_3\text{CN})]^{3+}$ y $[(\text{NC})_5\text{FeCNC}(\text{CN})_5]^{5-}$.¹⁸⁻²²

En el desarrollo del proyecto se sintetizaron compuestos de coordinación de los derivados bencimidazólicos de los iones metálicos Co(III) y Fe(III) con el fin de ensayarse como oxidantes de la PCu(I) de espinaca. Los compuestos de cobalto(III) $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_2(\text{NO}_3)$ (**Co-3**), $[\text{Co}(\text{2gb})_3](\text{CCl}_3\text{COO})_3$ (**Co-4**), $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$ (**Co-5**) y $[\text{Co}(\text{2amb})_3]\text{Cl}_3$ (**Co-7**) que son estables en disolución no resultaron ser activos redox frente a PCu(I), por lo que los estudios cinéticos de la transferencia electrónica entre la PCu(I) y los compuestos **Co-3**, **Co-4**, **Co-5** y **Co-7** no se pudieron llevar a cabo.

Los compuestos de Fe(III) estables en disolución $[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$ (**Fe-1**) y $[\text{Fe}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (**Fe-2**), si fueron activos redox frente a PCu(I) de espinaca en las condiciones de DMSO/H₂O (25%), Tris/HCl (20 mM) pH=7.0, I=0.03 M (NaCl) y en el intervalo de temperaturas de 20 a 30 °C.

Las reacciones de oxidación de PCu(I) con **Fe-1** y **Fe-2** no muestran cinéticas limitantes en las condiciones empleadas. Los experimentos se realizan en condiciones de pseudo-primer orden en exceso de oxidante por lo que

$k_{obs} = k[\text{oxidante}]$. Los resultados se ajustan a un mecanismo de esfera externa donde se observa una ley de rapidez de segundo orden de la forma $d[\text{PCu(II)}]dt = k[\text{PCu(I)}][\text{oxidante}]$ tanto para el oxidante Fe-1 como para Fe-2. Los resultados se presentan en las figuras 5.23 y 5.24 mostrando que obedecen la ley de rapidez de segundo orden anterior.

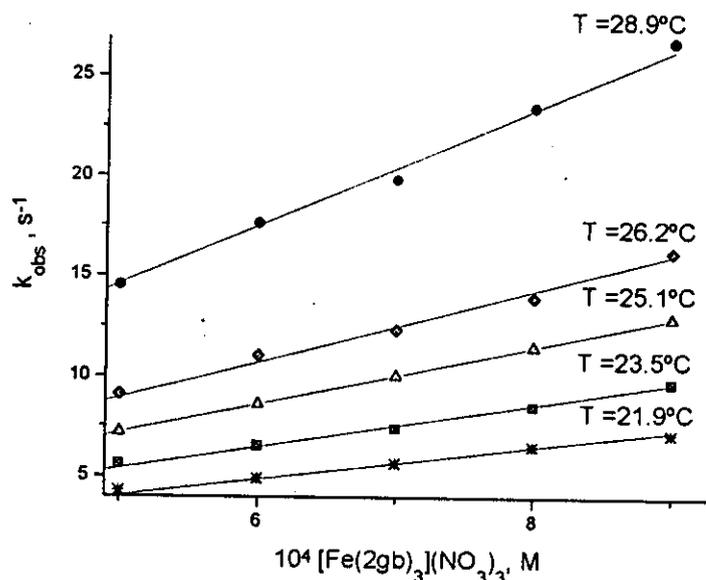


Figura 5.23. Reacción de oxidación de PCu(I) de espinaca por Fe-1 a diferentes temperaturas y variando la concentración de Fe-1. DMSO/H₂O (25%), Tris/HCl (20 mM) pH=7.0, I= 0.03 M (NaCl)

La constante de rapidez de segundo orden a 25.1 °C para Fe-1 es. $k = 1.4 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Al comparar este valor con el obtenido previamente en el desarrollo del proyecto de tesis para $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ en DMSO/H₂O de $k = 1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ se observa que la constante de rapidez para el compuesto Fe-1 es del mismo orden de magnitud que para $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$. Se ha informado en la literatura que los iones derivados del ferrocenino en la reacción de oxidación de la plastocianina de espinaca obedecen una ley de rapidez de segundo orden $d[\text{PCu(II)}]dt = k[\text{PCu(I)}][\text{oxidante}]$ es decir al igual que en nuestro caso no se observan cinéticas limitantes en las condiciones de reacción utilizadas.^{75, 76}

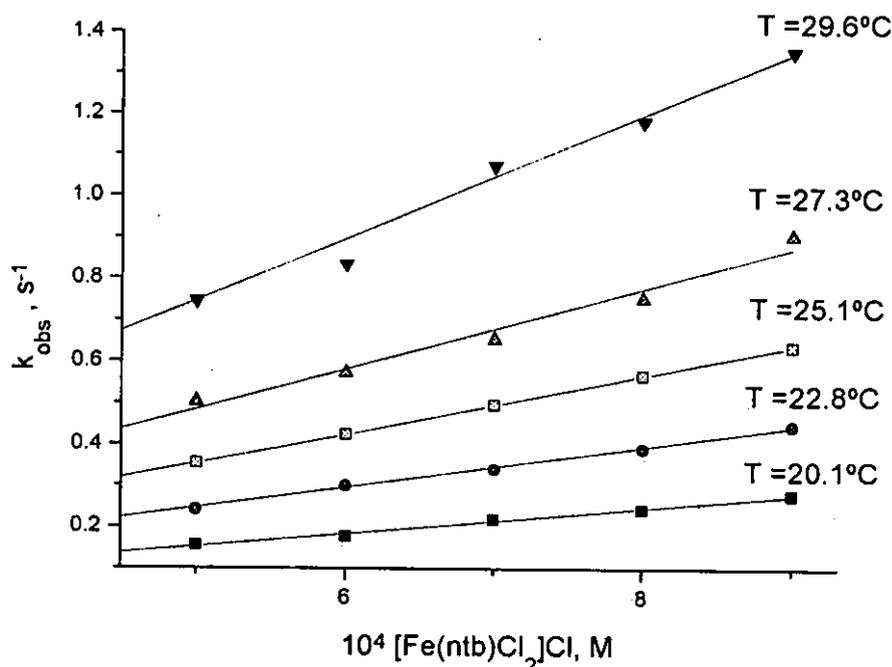


Figura 5.24. Reacción de oxidación de PCu(I) de espinaca por Fe-2 a diferentes temperaturas y variando la concentración de Fe-2. DMSO/H₂O (25%), Tris/HCl (20 mM) pH=7.0, I= 0.03 M (NaCl)

La constante de rapidez de segundo orden a 25.1 °C para Fe-2 es $k = 706.2 \pm 12.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta constante de rapidez es del orden de la constante informada para la reacción con el oxidante $[\text{Co}(4,7\text{-DPSfen})_3]^{3-}$ donde se informa $k = 190 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El compuesto $[\text{Co}(4,7\text{-DPSfen})_3]^{3-}$ presenta cinética limitante donde la constante de asociación es muy grande $K = 4600 \text{ M}^{-1}$ pero la transferencia electrónica, que es el paso limitante, ocurre lentamente $k_{TE} = 0.041 \text{ s}^{-1}$.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger al estudiarse la variación de la constante de segundo orden como función de la temperatura. Los resultados se presentan en la tabla 5.15 y en la figura 5.25.

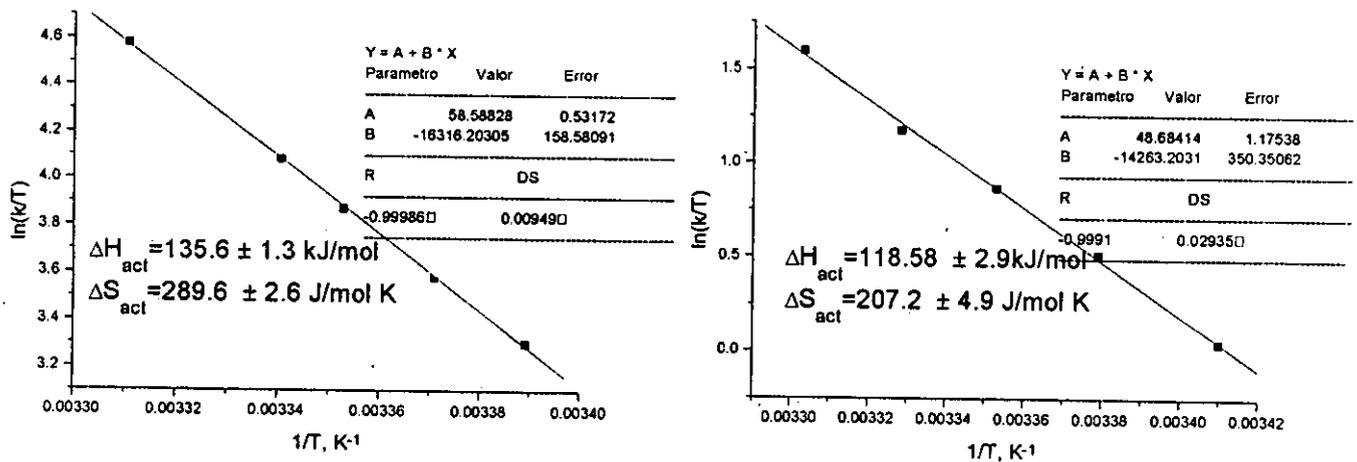


Figura 5.25. Efecto de la temperatura en la reacción de oxidación de PCu(I) con los compuestos Fe-1 y Fe-2 condiciones DMSO/H₂O (25%), Tris/HCl (20 mM) pH 7.0, I = 0.03 M (NaCl). Gráfica izquierda Fe-1 y gráfica derecha Fe-2.

Tabla 5.15 Efecto de la temperatura en las constantes de rapidez de reacción de segundo orden en la oxidación de PCu(I) por Fe-1 y Fe-2, I = 0.03 M (NaCl), pH = 8.0 Tris/HCl.

Temperatura	Fe-1	Temperatura	Fe-2
°C	$k_{exp.} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	°C	$k_{exp.} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
21.9	7988 ± 170	20.1	306 ± 6.46
23.5	10654 ± 204	22.8	492 ± 6.59
25.1	14335 ± 109	25.1	706 ± 12.7
26.2	17720 ± 387	27.3	969 ± 36.5
28.9	29364 ± 538	29.6	1495 ± 46.3

En cuanto a los parámetros cinéticos ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger obtenidos para los compuestos Fe-1 y Fe-2 (tabla 5.16) no se observan diferencias significativas entre ambos compuestos, lo que es de resaltar es que los valores tanto de ΔH^\ddagger

como de ΔS^\ddagger son muy grandes con respecto a todos los casos informados anteriormente y también a los resultados de la oxidación de PCu(I) con el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ en el medio de reacción DMSO/H₂O (tabla 5.16).

Tabla 5.16. Parámetros cinéticos para la oxidación de la plastocianina.

Oxidante	Medio	ΔH^\ddagger KJ/mol	ΔS^\ddagger J/mol K
$[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$	H ₂ O	62	30.9
$[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$	DMSO/H ₂ O	45.7	-13.7
$[\text{Fe}(\text{2gb})_3]^{3+}$	DMSO/H ₂ O	135.6	289.66
$[\text{Fe}(\text{ntb})\text{Cl}_2]^+$	DMSO/H ₂ O	118.6	207.2
◆ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	H ₂ O	-13.8	-196.65
◆ $[\text{Co}(4,7\text{-DPSfen})_3]^{3-}$	H ₂ O	37.65	-75.312
◆ ◆ FeCp_2^+	H ₂ O	45.7	-104.7

◆ Datos informados en la literatura.

◆ Cp = ciclopentadienilo. Referencia 72.

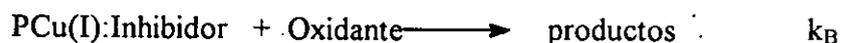
La diferencia en reactividad entre Fe-1 y Fe-2 puede deberse a que se utilicen distintos sitios de unión a la proteína. Aunque los compuestos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y $[\text{Co}(4,7\text{-DPSfen})_3]^{3-}$ presentan el mismo sitio de unión y sus rapidezces de reacción son muy diferentes ya que los valores de E° son diferentes. Como se mencionó anteriormente el compuesto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ tiene su sitio de unión en el lado norte de la proteína cerca de la His-87, mientras que el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ presenta su sitio de unión preferente (ausencia de inhibidor) en el lado este cerca de la Tyr-83; en el sitio donde existe una alta conservación de residuos ácidos del 42-45 y del 59-61. Lo anterior se ha comprobado por medio de experimentos de inhibición competitiva, RMN utilizando los compuestos análogos de cromo(III), dependencia de la reactividad con el pH y en los últimos años experimentos de modificación de la PCu en la Tyr-83 ⁷⁷ así como reacciones de transferencia electrónica en mutantes de PCu para evidenciar el sitio de unión de diferentes oxidantes. ^{78, 79}

Para $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ $k_{TEK} = 3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $k_{TEK} = 9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.²² Cuando la reacción ocurre en el lado norte la transferencia electrónica se lleva a cabo más rápidamente debido a que ocurre a través de una distancia más corta, aproximadamente 6 Å. Los estudios de inhibición de la reacción de oxidación con iones ferrocenio FeCp_2^+ muestran un mecanismo donde el oxidante se reparte entre los dos sitios de unión, el sitio hidrofóbico en el lado norte y el sitio hidrofílico en el lado este.⁷⁶ La partición entre los dos sitios depende de la carga y del carácter hidrofóbico del oxidante, por ejemplo: para el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ el 75% de la reacción ocurre en el lado este, mientras que para el ion FeCp_2^+ únicamente el 28% ocurre en el lado este.⁷⁴

Otra alternativa para explicar la diferencia en reactividad puede ser, como ya se ha demostrado, el hecho de que pequeños compuestos de coordinación con geometría octaédrica con ligantes hidrofóbicos que permiten la deslocalización de la densidad electrónica a través de los enlaces π facilitan la transferencia electrónica.⁷⁵ Al comparar las esferas de coordinación se observa que **Fe-1** tiene mayor carácter hidrofóbico que **Fe-2** facilitando quizá la incursión en el sitio activo hidrofóbico de la plastocianina.

5.4.3 Reacciones de inhibición competitiva en la transferencia electrónica en PCu(I).

La inhibición competitiva se observa en las reacciones de oxidación de PCu(I) en la presencia de compuestos redox inactivos como por ejemplo $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_6]^{4+}$.^{22, 80} Existe la competencia por el sitio de unión entre el oxidante y el compuesto redox inactivo. El mecanismo de reacción que describe la inhibición se esquematiza a continuación.



El esquema anterior deriva la siguiente ley de rapidez:

$$k_{exp} = \frac{Kk_{TE} + k_B K_{Inh} [\text{Inhibidor}]}{1 + K_{Inh} [\text{Inhibidor}]} \quad 5.7$$

Donde k_{exp} es la constante de rapidez de segundo orden. Es importante para simplificar la ley de rapidez trabajar en concentración baja de oxidante en el caso en que la oxidación obedezca un mecanismo de cinética limitante.

Si se observa un bloqueo completo de la reacción de oxidación por el compuesto inhibidor k_B es cero, dando lugar a una ley de rapidez más sencilla del tipo:

$$k_{exp} = \frac{Kk_{TE}}{1 + K_{Inh} [\text{Inhibidor}]} \quad 5.8$$

que puede linealizarse de la siguiente manera:

$$\frac{1}{k_{exp}} = \frac{1}{Kk_{TE}} + \frac{K_{Inh}}{Kk_{TE}} [\text{Inhibidor}] \quad 5.9$$

En el caso de PCu se han observado únicamente casos de inhibición parcial de la reacción de transferencia de electrones, donde k_B es diferente de cero; existen dos explicaciones sobre la conservación de la reactividad aún después de la formación del aducto PCu:Inhibidor. La primera es que debido a la amplia distribución de la carga negativa en la vecindad de la Tyr-83 es posible que se retenga parte de la reactividad permitiendo que dos compuestos cargados positivamente se acomoden de manera simultánea en el lado este. La segunda

explicación es que la reacción k_B se lleva cabo en otro sitio de unión posiblemente el lado norte, el cual posee gran proximidad al cobre. En otras palabras, a bajas concentraciones de oxidante Kk_{TE} es la constante de segundo orden k . Si $dPCu(I)/dt = k[PCu(I)][oxidante]$ donde $k = k_E + k_N$ es decir la suma de las constantes de rapidez en el sitio este k_E y en el sitio norte k_N . La mayor parte de las reacciones de oxidación de $PCu(I)$ en medio acuoso pueden ajustarse fácilmente a este esquema.^{74, 76, 80.}

De los experimentos realizados con los compuestos de coordinación derivados de los distintos ligantes bencimidazólicos estudiados y los iones metálicos $Co(III)$ y $Cr(III)$ se concluyó que los compuestos son redox inactivos frente a $PCu(I)$ bajo las condiciones de reacción establecidas DMSO/ H_2O (25%), $pH=8.0$ Tris/HCl (20 mM), $I = 0.03$ M (NaCl) y $T=25$ °C. Por lo anterior se realizaron experimentos de inhibición competitiva con los compuestos de $Co(III)$ y $Cr(III)$ en la reacción de oxidación de $PCu(I)$ por $[Co(fen)_3]^{3+}$. En todos los casos los compuestos estudiados en disolución poseen carga $\geq 3+$. Los compuestos de $Co(III)$ que se comportaron como inhibidores son los complejos con los ligantes 2gb (**Co-3**, **Co-4** y **Co-5**) y 2amb (**Co-7**). Por otro lado todos los compuestos de $Cr(III)$, a excepción del complejo con el ligante bbimpy que no es soluble en el medio de reacción, resultaron ser inhibidores de la oxidación de $PCu(I)$ por $[Co(fen)_3]^{3+}$.

Se llevó a cabo el estudio con los compuestos de $Co(III)$ a continuación se muestra el comportamiento de la reacción de oxidación de $PCu(I)$ de espinaca por $[Co(fen)_3]^{3+}$ en presencia de un compuesto de coordinación inactivo redox con el ligante 2gb (figura 5.26).

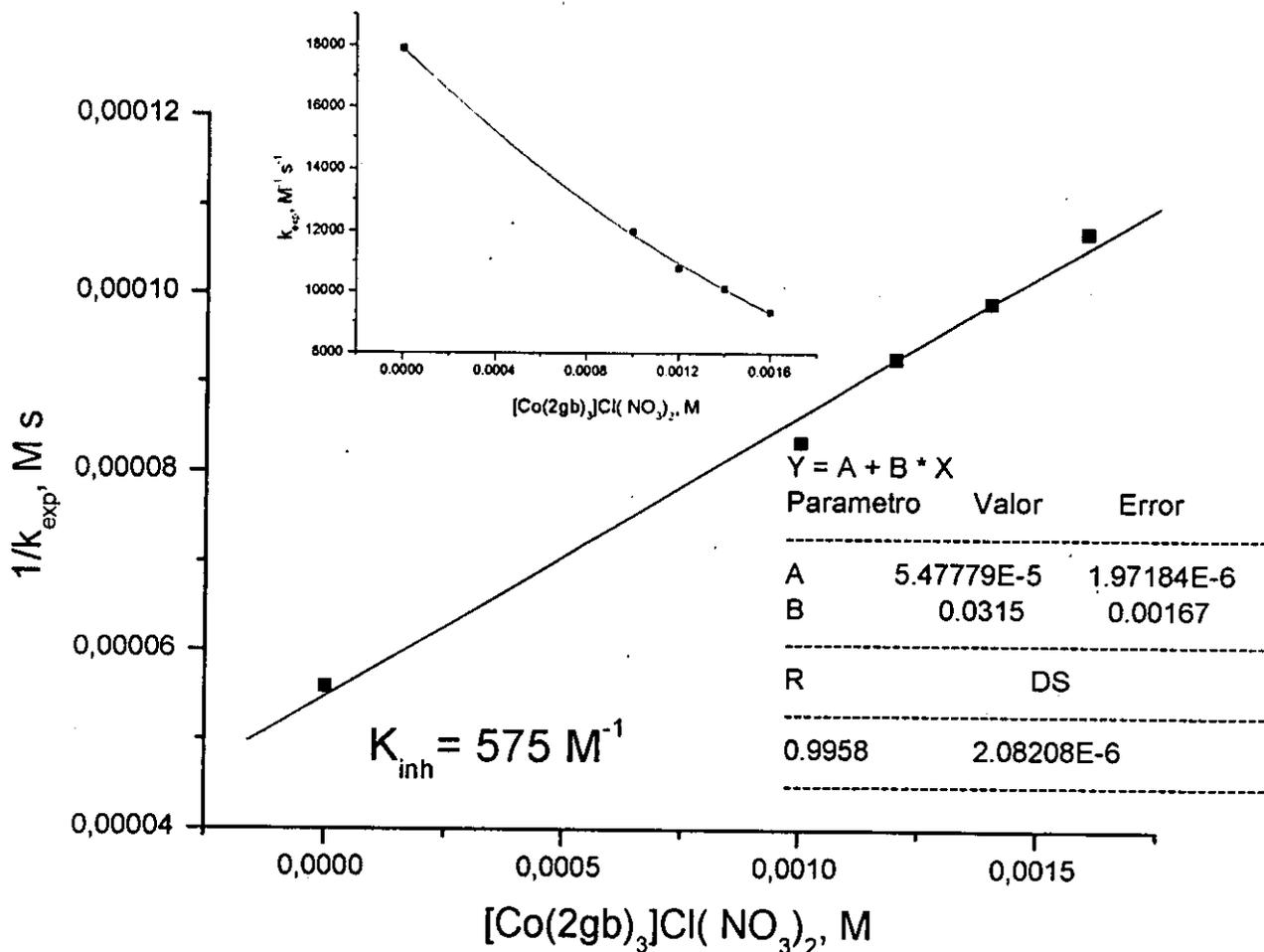


Figura 5.26. Efecto de Co-3 en la oxidación de PCu(I) de espinaca por $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$. DMSO/H₂O (25%), pH=8.0 Tris/HCl (20mM), I=0.03 M (NaCl) y T=25°C. Gráfica superior izquierda k_{exp} vs [Co-3]. Gráfica inferior k_{exp}^{-1} vs $[\text{Co-3}]^{-1}$.

De la figura 5.26 se observa claramente una inhibición de la reacción debida a la presencia del complejo de 2gb. El mecanismo de reacción corresponde al caso donde el aducto PCu(I):Inhibidor es no reactivo, es decir k_B es igual a cero en la ecuación 5.7. Por lo tanto se obedece la ley de rapidez 5.8:

$$k_{\text{exp}} = \frac{Kk_{TE}}{1 + K_{inh}[\text{Inhibidor}]} \quad 5.8$$

La gráfica de $(k_{\text{exp}})^{-1}$ en función de la concentración del inhibidor es lineal y se obtiene K_{inh} . Se evaluó la ecuación 5.7 para el mecanismo de reacción cuando k_B es diferente de cero pero el ajuste es pobre, además de que proporciona una constante de asociación del inhibidor a la proteína negativa, que no tiene ningún sentido.

Se ha informado que la inhibición no es completa cuando se emplea $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ como oxidante y compuestos del tipo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ o $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ como inhibidores, ya que el aducto PCu(I):Inhibidor es aún reactivo, ya sea que en el lado este se unan dos compuestos catiónicos o que la reacción se lleve a cabo en otro sitio distinto al que está bloqueado por el inhibidor.⁷⁴ En nuestras condiciones de reacción, en todos los casos la cinética de inhibición obedece el mecanismo donde el aducto PCu(I):Inhibidor no es reactivo. Al evaluar la ley de rapidez para el mecanismo en que el aducto PCu(I):Inhibidor es reactivo, la desviación de los valores es grande y las constantes de asociación del inhibidor a la proteína son en algunos casos negativas o por el contrario valores muy elevados del orden de 10^7 M^{-1} . Los resultados de las mediciones hechas en este trabajo no indican que el oxidante $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ pueda actuar en 2 sitios diferentes, por lo que no es posible calcular el porcentaje de reacción en cada uno de ellos.

Las constantes de asociación del inhibidor a la proteína para los compuestos de Co(III) se muestran en la tabla 5.17. Los valores obtenidos en todos los casos son mayores que para el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ donde $K = 171.8 \text{ M}^{-1}$, por lo que se presenta claramente una inhibición.

Tabla 5.17. Constantes de asociación del inhibidor y porcentajes de inhibición de la reacción de oxidación de PCu(I) con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ por los compuestos de Co(III).

Compuesto	$K_{\text{inh}}, \text{M}^{-1}$	% Inhibición
Co-3 $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_2(\text{NO}_3)$	575.0 ± 30.5	48
Co-5 $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$	479.5 ± 33.8	40.2
Co-4 $[\text{Co}(\text{2gb})_3](\text{CCl}_3\text{COO})_3$	374.4 ± 11.4	31.6
Co-7 $[\text{Co}(\text{2amb})_3]\text{Cl}_3$	283.7 ± 13.8	24.6

Los resultados muestran claramente que las constantes de asociación de los inhibidores con el ligante 2gb son mayores con respecto a la del inhibidor con el ligante 2amb. Es de resaltarse que el 2gb es más hidrofóbico por lo que podría ser una evidencia de que el bloqueo se realiza en el lado norte de la proteína y con base a esto podría pensarse que el sitio de unión del compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ en DMSO/H₂O pudiera ser preferentemente el lado hidrofóbico más que el lado este (hidrofílico), comportándose de manera contraria a como se ha informado hasta el momento.

En la literatura⁸¹ se menciona que la partición de la reacción en los dos sitios depende de manera importante tanto del oxidante como de la proteína ya que se ha observado que para la reacción de $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ con PCu(I) de espinaca el 80% de la reacción ocurre en el lado este cercano a la Tyr-83, mientras que para la PCu(I) de perejil únicamente el 61% ocurre por ese mismo sitio. Estas diferencias en reacción se explican ya que difieren los residuos ácidos en la región 42-45 y 59-61 entre las PCus de espinaca y de perejil.⁸¹ Esto da lugar a una disminución de la carga total de proteína de -9 para espinaca a -8 para el caso del perejil a pH ≈ 7 , lo que afecta la interacción electrostática entre $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ y PCu(I). Esto se observa claramente en las constantes de asociación de $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ a la plastocianina ya que para la proteína de perejil es $K=167 \text{ M}^{-1}$ y $K=389 \text{ M}^{-1}$ para la extraída de espinaca.¹⁹ Por esta razón la reacción de oxidación de PCu de perejil no se ve tan favorecida en el lado este como en el caso de la PCu de espinaca.

Es de resaltarse que en el caso de los compuestos **Co-3**, **Co-4** y **Co-5** la diferencia entre ellos se encuentra en los aniones ya que todos poseen la misma esfera de coordinación, el isómero *mer* del catión $[\text{Co}(\text{2gb})_3]^{3+}$, por lo que se observa el efecto estérico del anión ya que en el caso de los aniones más voluminosos CCl_3COO^- (**Co-5**) la constante disminuye notablemente ya que el choque bimolecular entre la $\text{PCu}(\text{I})$, con carga negativa, y el inhibidor, cargado positivamente, se ve influenciado por la presencia de estos aniones. En el caso de **Co-3** y **Co-4** no hay mucha diferencia ya que en **Co-3** existe una mezcla de aniones de Cl^- y NO_3^- el análisis elemental nos indica una proporción de dos Cl^- por un NO_3^- , siendo por tanto muy parecido al comportamiento de **Co-4**.

Los compuestos de $\text{Cr}(\text{III})$ con los ligantes bencimidazólicos: 2gb, ntb, 2pb y 4tb resultaron buenos inhibidores de la oxidación de $\text{PCu}(\text{I})$ por $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ en solución de $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (25%), $\text{pH}=8.0$ Tris/HCl (20 mM), $I=0.03$ M (NaCl) y $T=25^\circ\text{C}$. En la figura 5.27 se presentan los resultados obtenidos con el compuesto **Cr-3**, el cuál es el compuesto dinuclear con dos puentes OH^- y cuatro ligantes 2gb.

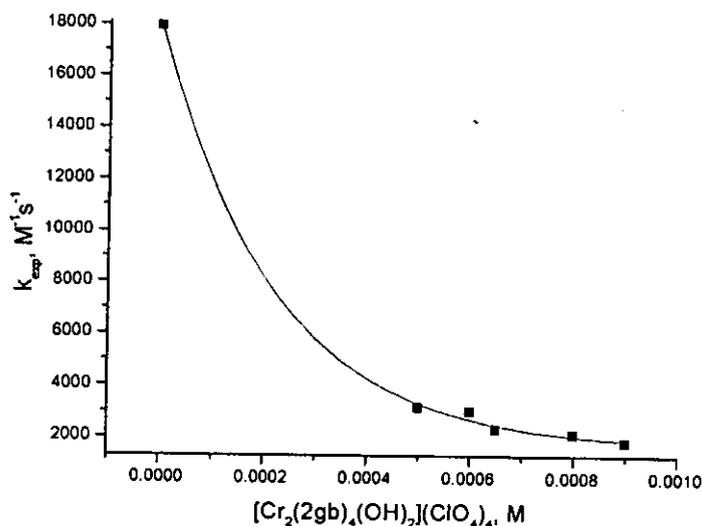


Figura 5.27. Inhibición producida por el compuesto Cr-3 en la reacción de oxidación de $\text{PCu}(\text{I})$ por $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$. Tris/HCl $\text{pH}=8.0$, $I=0.03$ M (NaCl), $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (25%)

Se observa una inhibición del 90% de la reacción de oxidación por el compuesto dinuclear Cr-3, siendo un inhibidor muy efectivo ya que no se ha informado hasta el momento una inhibición tan efectiva para la reacción con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ aún tratándose del compuesto dinuclear de mayor carga $[(\text{NH}_3)_5\text{Co}(\mu\text{-NH}_2)\text{Co}(\text{NH}_3)_5]^{5+}$ el cuál inhibe un 74% de la reacción.⁸⁰

Al igual que en el caso de los compuestos de Co(III) se encontró que el mecanismo de la inhibición es aquél en que el aducto PCu(I):Inhibidor es no reactivo. Se obtiene un ajuste de los datos a la ley de rapidez de la ecuación 5.8:

$$k_{\text{exp}} = \frac{Kk_{\text{TE}}}{1 + K_{\text{inh}}[\text{Inhibidor}]} \quad 5.8$$

No se observa que la reacción ocurra por dos sitios diferentes. Como se demuestra en la figura 5.28 donde se presentan gráficas para ambos mecanismos de reacción cuando k_B es igual a cero (izquierda) y el aducto PCu(I):Inhibidor es reactivo (derecha).

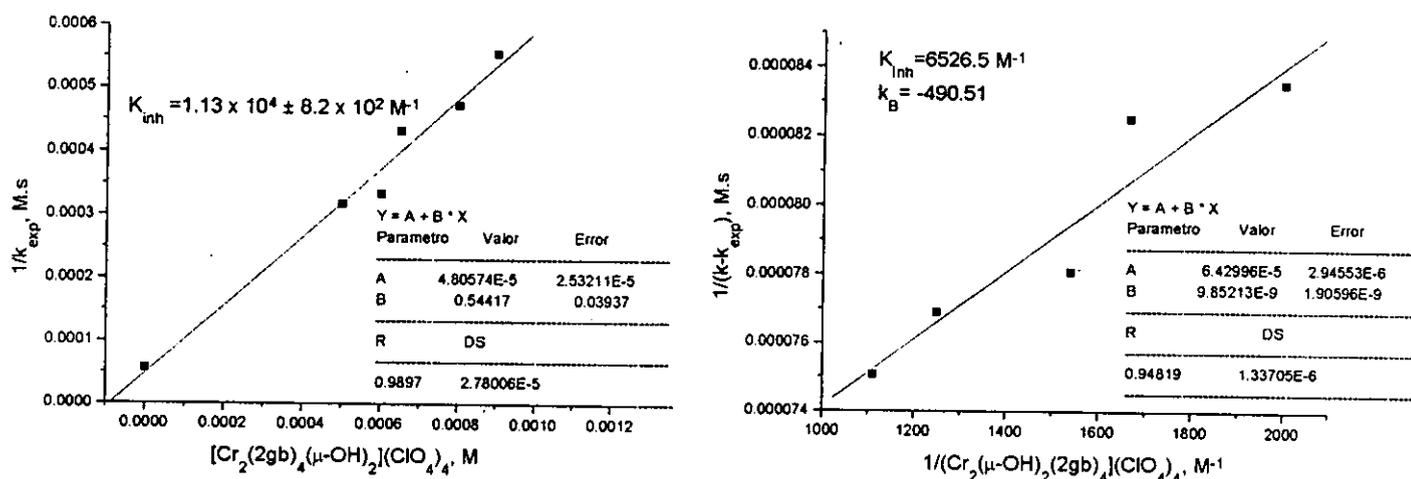


Figura 5.28. Ajuste de los datos experimentales de la inhibición por Cr-3 de la reacción de oxidación de PCu(I) por $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$. Izquierda aducto PCu(I):Inhibidor no reactivo; Derecha aducto PCu(I):Inhibidor reactivo.

De los resultados anteriores se puede notar que al igual que en el caso de los compuestos de Co(III) el compuesto inhibidor bloquea por completo la

proteína. Cuando se ajustan los datos al mecanismo alterno hay mayor dispersión de los datos y se obtienen valores de k_B negativos los cuales no tienen sentido físico. Este mismo comportamiento se presenta para todos los compuestos estudiados de Cr(III); los resultados se presentan en la tabla 5.18.

Tabla 5.18. Constantes de asociación y porcentajes de inhibición de la reacción de oxidación de PCu(I) con $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ por los compuestos de Cr(III).

Compuesto	$K_{\text{inh}}, \text{M}^{-1}$	% Inhibición
Cr-3 $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4](\text{ClO}_4)_4$	$1.13 \times 10^4 \pm 8.20 \times 10^2$	90
Cr-2 $[\text{Cr}(2\text{gb})_3]\text{Cl}_3$	1945 ± 130	65
Cr-1 $[\text{Cr}(2\text{gb})_3]\text{Cl}[\text{ZnCl}_4]$	1102 ± 67	55
Cr-7 $[\text{Cr}(2\text{pb})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$	639 ± 50	42.8
Cr-4 $[\text{Cr}(\text{ntb})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$	363 ± 11	28.2
Cr-6 $[\text{Cr}(4\text{tb})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$	319 ± 20	28.2

Cabe señalar que la carga del compuesto inhibidor determina de manera muy importante la constante de asociación, es decir la mayor interacción electrostática en los compuestos con carga 4+ y 5+ se observa en una constante de asociación mayor que para los compuestos con carga 3+; por ejemplo para $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ la constante de asociación es 176 M^{-1} , mientras que para $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_6]^{4+}$ el valor es $K=1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ambas en medio acuoso.^{22, 80} El valor para **Cr-3** obtenido es del mismo orden de magnitud que para los compuestos de carga 4+, sin embargo es importante recordar que para las reacciones efectuadas en DMSO/H₂O las constantes de asociación disminuyen drásticamente, como en el caso de $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ de 692.9 M^{-1} (H₂O) a 171.8 M^{-1} (DMSO/H₂O) respectivamente, en las mismas condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH. Por lo que en medio acuoso la constante podría ser mayor, de esta manera se explica el porcentaje tan alto de inhibición encontrado.

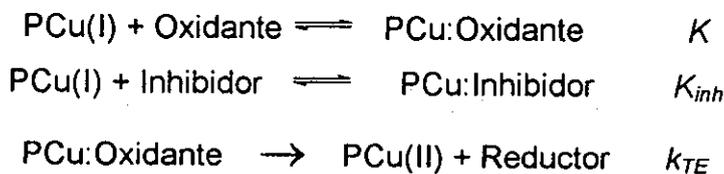
El resto de los compuestos estudiados poseen carga 3+, nuevamente se observa una influencia del ligante utilizado cuyas constantes de asociación siguen

el orden $2gb > 2pb > ntb > 4tb$. En todos los casos se trata de ligantes hidrofóbicos, pero los compuestos **Cr-1** y **Cr-2** poseen una esfera de coordinación de tres ligantes hidrofóbicos bidentados en comparación con **Cr-4**, **Cr-6** y **Cr-7** con solamente dos ligantes hidrofóbicos bidentados. Se observa nuevamente la importancia de la hidrofobia a mayor carácter hidrofóbico del compuesto se presenta una mayor constante de asociación, indicando que posiblemente el sitio de unión es el hidrofóbico. Al igual que para los compuestos con Co(III) se vuelve a observar que cuando los aniones son voluminosos como para **Cr-1** el anión $ZnCl_4^{2-}$ la constante de asociación es menor que en el caso de **Cr-2**.

Al comparar los resultados entre los compuestos isoestructurales de Co(III) y Cr(III) con el ligante 2gb $[M(2gb)_3]Cl_3$ se observa que el porcentaje de inhibición es mayor para el compuesto de Cr(III) (65%) con respecto a Co(III) (40.2%). Además los valores de constante de asociación cambian de $1945 M^{-1}$ para Cr(III) a $479.5 M^{-1}$ para Co(III). Las constantes para los complejos isoestructurales $[Co(fen)_3]^{3+}$ y $[Cr(fen)_3]^{3+}$ son para Co(III) $167 M^{-1}$ y para el compuesto de Cr(III) $176 M^{-1}$ no muestran estos valores una influencia importante del ion metálico central. La diferencia obtenida en este trabajo es muy importante, la interacción del compuesto $[Cr(2gb)_3]^{3+}$ es más fuerte. Este resultado se encuentra en concordancia con lo observado en los estudios realizados en tilacoides de espinaca donde al igual se observa que ambos compuestos son inhibidores de la reacción de Hill, pero el compuesto de Cr(III) presenta una mayor inhibición del transporte electrónico que el compuesto de Co(III).²

Por último se realizó el experimento de inhibición competitiva en la reacción de oxidación de PCu(I) por $[Fe(2gb)_3]^{3+}$ a pH=7.0 Tris/HCl (20 mM), I =0.03 M (NaCl) y T=25°C; utilizando como inhibidor el compuesto isoestructural $[Cr(2gb)_3]^{3+}$.

Los resultados muestran que el comportamiento es el mismo que para cuando el oxidante es $[Co(fen)_3]^{3+}$, es decir el mecanismo de inhibición es:



La ley de rapidez que se sigue por lo tanto es la expresada nuevamente en la ecuación 5.8.

La gráfica de $(k_{exp})^{-1}$ en función de $[[\text{Cr}(2\text{gb})_3]^{3+}]$ resultó por tanto lineal obteniéndose una constante de asociación del inhibidor de $K_{inh} = 537 \text{ M}^{-1}$. El ajuste se observa en la figura 5.29.

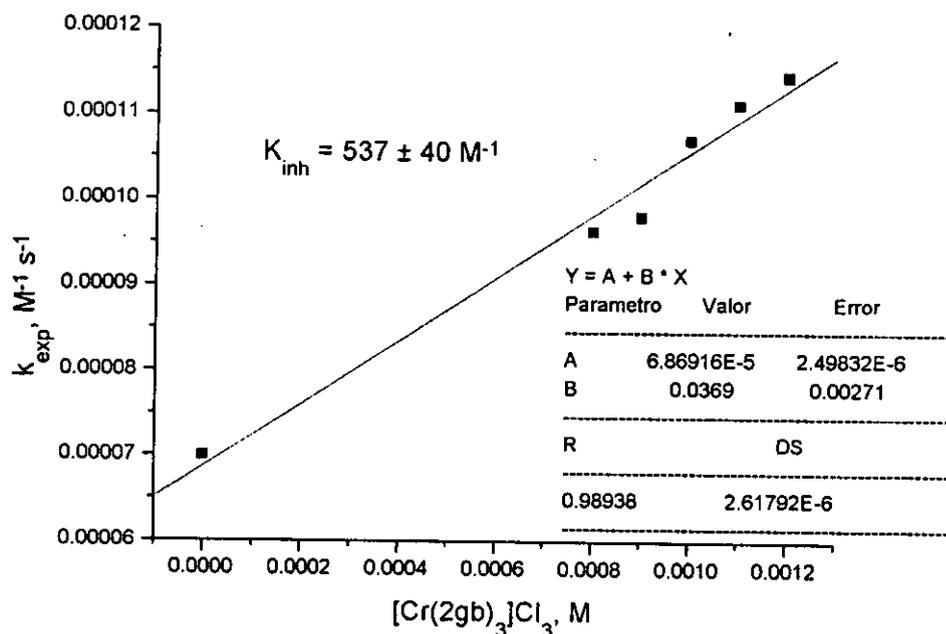


Figura 5.29. Efecto de Cr-2 en la oxidación de PCu(I) de espinaca por Fe-1. DMSO/H₂O (25%), pH=7.0 Tris/HCl (20mM), I=0.03 M (NaCl) y T=25°C.

El porcentaje de inhibición producido es únicamente del 39%, en este caso ambos compuestos son isoestructurales, es decir la esfera de coordinación es idéntica y por tanto los compuestos poseen el mismo carácter hidrofóbico y la

competencia se da por el mismo sitio de unión. No se observa en este caso partición de la reacción en diferentes sitios de unión nuevamente, el aducto PCu(I):Inhibidor es no reactivo.

En todos los experimentos de inhibición, la proteína se bloquea totalmente por la asociación de los compuestos inactivos redox. El compuesto inhibidor puede producir un cambio radical en la conformación o reactividad de la plastocianina impidiendo su oxidación.

A partir de los estudios de inhibición competitiva se puede concluir que los compuestos ensayados como oxidantes $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{2gb})_3]^{3+}$ y los compuestos inhibidores de Co(III) y Cr(III) en DMSO/H₂O presentan el mismo sitio de unión posiblemente el sitio hidrofóbico más cercano al sitio activo de cobre. Lo que se sustenta también al presentarse para la oxidación de PCu(I) por $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ un valor de k_{TE} mucho mayor en DMSO/H₂O que en medio acuoso.

Lo anterior es necesario confirmarlo por medio de experimentos de resonancia magnética nuclear de la PCu(I) en el medio de reacción y en presencia de un compuesto paramagnético de Cr(III).

5.5 Estudios de resonancia magnética nuclear en plastocianina de espinaca.

La asignación completa del espectro de resonancia magnética nuclear protónica de la especie reducida de la plastocianina de espinaca se realizó en 1987 por Hill.⁸² La asignación se llevó a cabo por medio de técnicas de resonancia magnética nuclear bidimensional y la asignación secuencial específica de las señales.

Recientemente se obtuvo en un equipo de 800 MHz por el grupo de investigación de Bertini el espectro de RMN ^1H y la completa asignación de las señales para la plastocianina de espinaca oxidada.⁸³

Durante el desarrollo de la tesis se realizaron experimentos de RMN protónica en la plastocianina reducida PCu(I) de espinaca. Previamente al estudio de RMN la PCu oxidada se redujo con ditionito de sodio y posteriormente se realizaron dos ultrafiltraciones, en un equipo Amicon utilizando una membrana YM5 contra una solución amortiguadora de fosfatos 30 mM pH= 7.0 en $^2\text{H}_2\text{O}$ 99.8 %, para realizar el intercambio del disolvente por $^2\text{H}_2\text{O}$. La concentración de PCu(I) utilizada en los estudios de RMN es aproximadamente 1.5 mM.

Se obtuvo el espectro de ^1H RMN para la PCu(I) de espinaca en D_2O en buffer de fosfatos pH=7.0, el espectro es el mismo que el obtenido por Hill en 1987 donde se observan claramente los residuos alifáticos y aromáticos. Los protones alifáticos aparecen en el intervalo de -0.4 a 5.2 ppm mientras que los protones aromáticos provenientes de los residuos de fenilalanina, histidinas y tirosinas aparecen en el intervalo de 5.8 a 7.7 ppm. Los protones ácidos NH aparecen en un amplio intervalo, pero en su mayoría en desplazamientos a campo bajo (> 7 ppm) (figura 5.30).

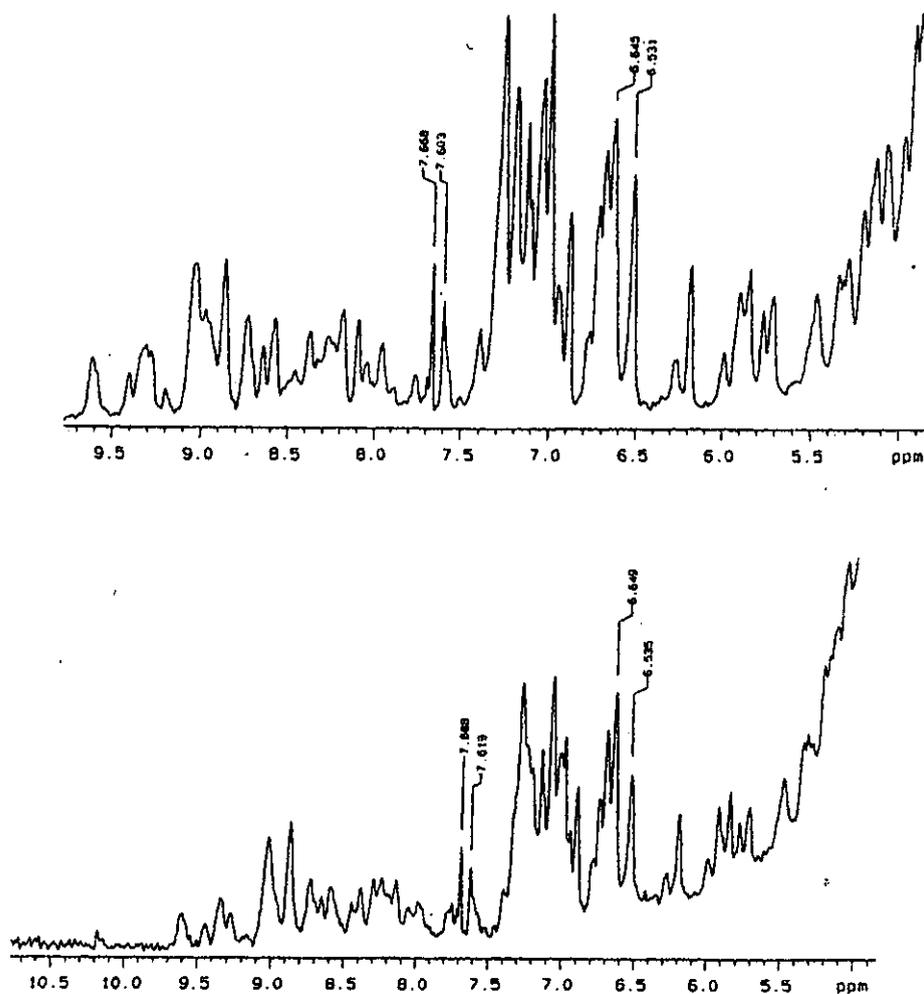


Figura 5.30. Espectro de RMN ^1H de PCu(I) de espinaca entre 5 y 10 ppm a 500 MHz en D_2O , pH= 7.0 (fosfatos). Espectro superior PCu(I) en D_2O ; espectro inferior PCu(I) en $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (25%).

En la literatura se informa que en el caso de la plastocianina se presentan dos sitios de unión de los oxidantes o reductores a la proteína. En el caso de oxidantes con carga positiva como $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ el sitio preferido es el lado este cercano a la Tyr83, Phe82, Phe14 y Phe41 donde existen dos regiones de aminoácidos ácidos (42-46 y 59-61) los cuales a pH = 7.0 están desprotonados

favoreciéndose la interacción electrostática. Este sitio se conoce como el sitio hidrofílico donde la transferencia electrónica es a largo alcance ($\approx 12 \text{ \AA}$) siguiendo la ruta probable Tyr83—Cys84—Cu. Por otro lado, el sitio conocido como el sitio hidrofóbico se encuentra justamente sobre el sitio activo de cobre de la proteína cerca de la His87, unida directamente al cobre. Este sitio comprende entre otros los aminoácidos alifáticos Gly10, Leu12, Gly89 y Ala90. El sitio hidrofóbico es el preferido en el caso de oxidantes como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ donde la transferencia de electrones ocurre a menor distancia $\approx 6 \text{ \AA}$, por lo que la reacción en este sitio se realiza a mayor velocidad con respecto al sitio hidrofílico (figura 5.31). La propuesta de que diferentes sitios de unión a la PCu son utilizados por los oxidantes dependiendo de la carga de estos ha quedado establecida por medio de estudios de espectroscopía de RMN de alta resolución. Se investigó el efecto de los compuestos inactivos redox $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ y $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en el espectro de RMN de PCu(I).^{23, 84} Los compuestos paramagnéticos de Cr(III) inducen un efecto de ensanchamiento local y cambios en el desplazamiento químico de las señales indicando los sitios preferenciales de asociación. Estos experimentos han dado evidencia de que la asociación del compuesto $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$ ocurre cerca de la His87 no observándose efectos en los residuos aromáticos a excepción del protón δ de la His87, mientras que $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ y $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ se unen cerca de la Tyr83, afectándose de manera apreciable la región correspondiente a los residuos aromáticos.⁸⁴

De los resultados cinéticos se observó una influencia importante al utilizar como medio de reacción DMSO/H₂O (25%), una aceleración de la reacción con respecto al medio acuoso, por lo que existe la posibilidad de que el sitio de unión del oxidante sea diferente dependiendo del medio de reacción utilizado.

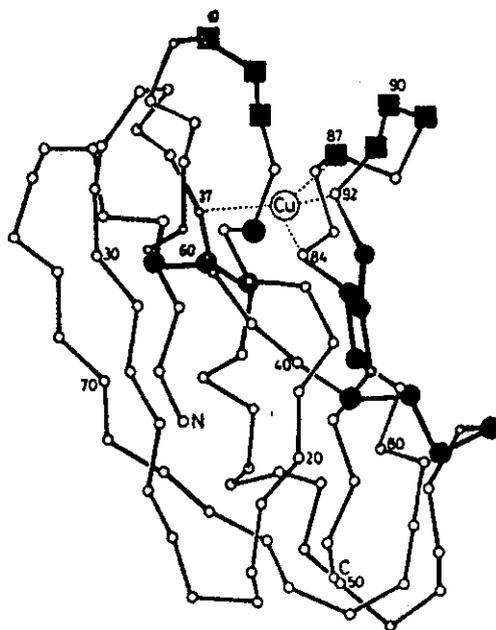


Figura 5.31. Estructura de la PCu que muestra los dos sitios preferentes de unión. El sitio norte donde los residuos hidrofóbicos se muestran en ■ y el sitio este donde los residuos aromáticos y aniónicos se muestran en ●.

Para observar la influencia del medio de reacción en la proteína se obtuvo el espectro de RMN protónica en presencia de 25% de DMSO- d_6 ; en el espectro de RMN 1H se observa que los residuos alifáticos más afectados, es decir presentan cambio en el desplazamiento y/o la forma de la señal, son Leu63, Val93, Met92, Gly34 y Gly49 los cuales en su mayoría a excepción de Gly49 se encuentran cerca o en el sitio hidrofóbico (tabla 5.19).

Tabla 5.19. Desplazamientos químicos de las señales dependiendo del medio de reacción.

Aminoácido	D ₂ O	DMSO- d_6 /D ₂ O (25%)
Leu63	1.491	1.51
Val93	0.915	0.929
Met92	0.609	0.619

En la región de los protones aromáticos se observa un cambio más radical en el espectro como se observa en la figura 5.30. Las señales que presentan el mayor cambio son las que se encuentran en el intervalo de 7.3 a 6.9 ppm y que corresponden a la mayoría de las señales para los protones aromáticos de los residuos aromáticos (Phe35, Phe41, Phe14, Phe29, Phe19, Tyr70, Phe82 y His87 entre otros) a excepción de los protones δ de His37 y His87 que aparecen en la región de 7.7 a 7.6, los protones ϵ de los residuos Tyr70, Tyr80, Phe82 y Tyr83 se encuentran en el intervalo de 6.8 a 6.5 ppm. Por lo anterior es difícil definir a que residuo aminoácido corresponde cada señal y concluir sobre que sitio se ve más influenciado por la presencia del DMSO.

Cabe resaltar que los protones δ de las histidinas así como los protones correspondientes a la Tyr83 en desplazamientos de 6.649 (protón ϵ) y 6.535 ppm (protón δ) no se ven afectados en gran medida por la presencia de DMSO.

De la figura 5.30 se observa que el espectro en D_2O y en $DMSO-d_6/D_2O$ (25%) son casi idénticos, por lo que se puede concluir que la proteína no se desnaturaliza ni pierde su estructura terciaria en presencia de DMSO. Sin embargo, se observa una interacción importante del DMSO con algunos residuos superficiales, como con residuos aromáticos y los protones ácidos de NH.

Debido a que las señales correspondientes a varios residuos aminoácidos superficiales de la proteína se desplazan en presencia de DMSO se demuestra que las interacciones electrostáticas varían con respecto al medio acuoso.

Para evidenciar el sitio de unión de los oxidantes $[Fe(2gb)_3]^{3+}$ y $[Co(fen)_3]^{3+}$, el cual a través de los resultados cinéticos, se observó que es el mismo que para los compuestos inhibidores tanto de Co(III) como de Cr(III), se obtuvo un espectro de RMN protónica de PCu(I) de espinaca en $DMSO-d_6/D_2O$ (25%) en presencia de 20% equivalente mol de $[Cr_2(\mu-OH)(2gb)_4]^{4+}$ (figura 5.32).

En este espectro se observan cambios radicales tanto en su parte alifática como en la aromática, se observa claramente un ensanchamiento de todas las señales en el espectro debido a la presencia del compuesto paramagnético de Cr(III). El ensanchamiento de la señal depende del inverso de la distancia (d^6) del residuo aminoácido al centro paramagnético, por lo que las señales más afectadas son las más cercanas al compuesto de Cr(III).

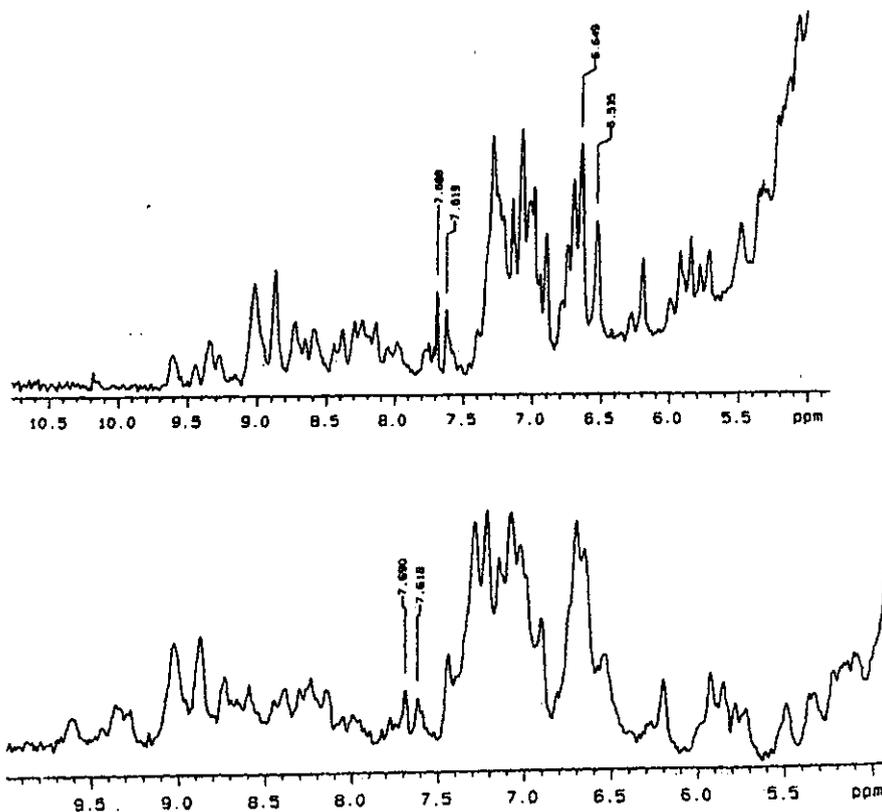


Figura 5.32. Espectro de RMN ^1H de PCu(I) de espinaca entre 5 y 10 ppm a 500 MHz en D_2O , pH= 7.0 (fosfatos). Espectro superior PCu(I) en $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (25%); espectro inferior PCu(I) en $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (25%) con 20% equivalente mol de $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$.

En el espectro se observan cambios en la región alifática en especial la señal que corresponde al residuo Met92 ($\Delta\delta = 0.05$ ppm) así como la de Val93 ($\Delta\delta = 0.05$ ppm) y las señales que se encuentran entre 1.39 y 1.54 ppm que corresponden a los residuos de alaninas: Ala52 y Ala53 así como leucinas e

isoleucinas; también se encuentran afectadas las señales correspondientes a las glicinas: Gly6, Gly7, Gly8, Gly10, Gly34, Gly49, Gly78 y Gly89 en la región de 3.35 a 4.2 ppm. De aquí se observan afectados residuos en ambos sitios de unión de la proteína Ala52 y Ala53 cercanos al sitio hidrofílico así como Met92, Val93, Gly10 y Gly89 que pertenecen al sitio hidrofóbico.

En la parte aromática del espectro de RMN ^1H (figura 5.32) se observan cambios importantes en el intervalo de 5.8 a 7.3 ppm, es decir los residuos aromáticos se ven afectados de manera muy importante. Es de notarse que los protones correspondientes al residuo Tyr83 en desplazamientos de 6.53 y 6.65 ppm se encuentran muy afectados así como las señales correspondientes a Phe82 en 6.2 y 5.9 ppm. Sin embargo, la señal del protón perteneciente a His87 en 7.66 ppm no se ve afectada de manera tan marcada.

De todos los resultados anteriores es difícil concluir cuál es el sitio de unión del compuesto $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$ el cual sería el mismo que los oxidantes utilizados para la reacción de la plastocianina en DMSO/ H_2O (25%). Los residuos que se ven afectados en primer lugar por la presencia de DMSO así como al adicionar $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$ se encuentran dispersos en toda la proteína. Con la adición de 20% equivalente mol de $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$ se observa un ensanchamiento general del espectro. El grado de ensanchamiento de las señales depende de la fuerza con que se une el ion paramagnético así como de la distancia entre el protón relajado y el ion paramagnético. En el caso del compuesto $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$ la constante de asociación a la proteína es grande por lo que el ensanchamiento de todas las señales es muy marcado.

Se observa de manera importante afectado el sitio este cerca de la Tyr83 y Phe82, por lo que posiblemente el sitio de unión de los compuestos de coordinación siga siendo el favorecido por la interacción electrostática.

Del experimento de RMN se puede concluir por tanto que el compuesto $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$ puede unirse a la proteína por varios sitios en especial se ve afectado el sitio hidrofílico formado por los residuos ácidos 42-45 y 59-61 ya que se ven afectados de manera importante los residuos Tyr83, Val93 y Phe82. De la misma forma se une al sitio hidrofóbico ya que los residuos de Met92 y Gly10 presentan un ensanchamiento. Además se pueden observar otros sitios como en el caso del compuesto $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ que se propone que se puede unir al residuo Asp51 ya que en el estudio de RMN se observan afectados los residuos correspondientes a Ala52 y Ala53 como ocurre también en nuestro caso.⁸²

El compuesto $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4]^{4+}$ debido a su carga positiva así como a su carácter hidrofóbico interactúa con la proteína por ambos sitios lo que puede explicar el bloqueo total de la transferencia electrónica en la presencia de los compuestos de coordinación de los ligantes bencimidazólicos de Co(III) y Cr(III).

Finalmente es necesario mencionar que en la presencia del DMSO y del compuesto de Cr(III) la proteína se desnaturaliza después de un tiempo.

5.6 Estudios cinéticos de reacciones de transferencia electrónica en ferredoxina (Fd).

5.6.1. Influencia del medio de reacción.

Se ha propuesto como mecanismo de reacción para las reacciones de transferencia electrónica en Fd con oxidantes inorgánicos catiónicos el mecanismo de cinética limitante;^{4,13} el mismo que se presenta para las reacciones de transferencia de electrones entre la PCu y los oxidantes inorgánicos utilizados.

La ley de rapidez es por lo tanto la expresada en la ecuación 5.4:

$$k_{obs} = \frac{k_{TE}K[oxidante]}{1 + K[oxidante]} \quad 5.4$$

Por lo que una gráfica de $(k_{obs})^{-1}$ en función de $[oxidante]^{-1}$ da una línea recta de pendiente $1/k_{TE}K$ y ordenada al origen $1/k_{TE}$.

Para los estudios cinéticos de transferencia de electrones utilizando a la Fd se utilizó nuevamente como medio de reacción DMSO/H₂O (25%) fijando el pH en 8.0 por medio de una solución amortiguadora Tris/HCl y con fuerza iónica de 0.03 M (NaCl). Se evaluó la influencia del medio de reacción en la transferencia electrónica. Este estudio se llevó a cabo en la reacción de transferencia electrónica entre la ferredoxina reducida ($[Fe_2S_2]^+$) de espinaca y el compuesto $[Co(en)_3]^{3+}$.²⁵ La reacción se llevó a cabo tanto en medio acuoso (Tris/HCl pH=8.0, I=0.03 M (NaCl) y T=25°C) como en una solución DMSO/H₂O (25%) (Tris/HCl pH=8.0, I=0.03 M (NaCl)) y se encontró que en ambos casos se obedece el mecanismo de reacción de cinética limitante informado en la literatura para las reacciones de transferencia electrónica entre oxidantes y metaloproteínas que corresponde a la ecuación 5.4 (figura 5.33).

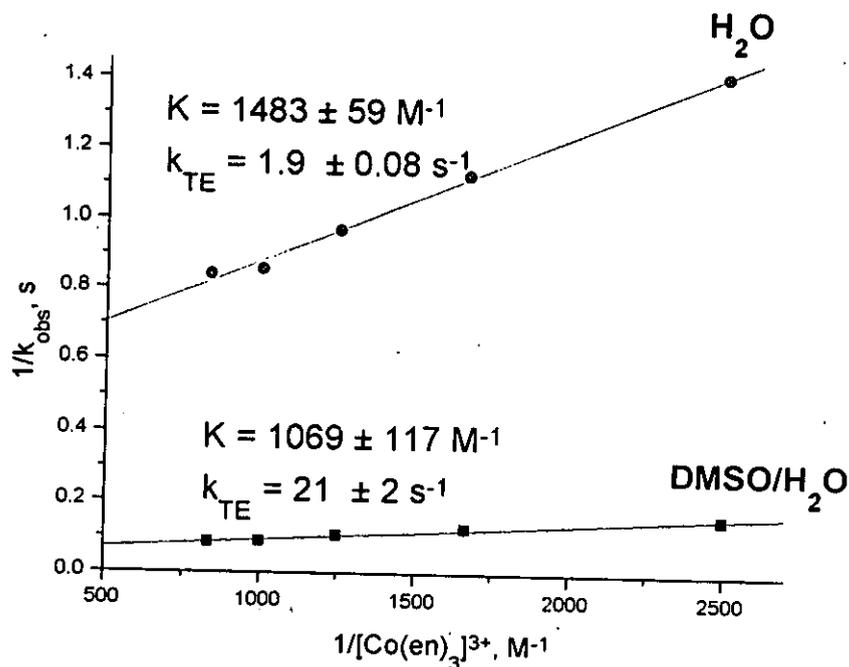


Figura 5.33. Reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ por $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$. ● Medio acuoso Tris/HCl pH= 8.0, $I = 0.03$ M (NaCl); $T = 25$ °C y ■ Medio de reacción DMSO/H₂O (25%) Tris/HCl pH= 8.0, $I = 0.03$ M (NaCl); $T = 25$ °C

Se habían informado para la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ extraída de perejil por $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ los valores de $K = 597$ M⁻¹ y $k_{\text{TE}} = 2.7$ s⁻¹ en medio acuoso, Tris/HCl pH= 8.0, $I = 0.1$ M (NaCl) a 25°C.²⁵ Los resultados obtenidos en medio acuoso bajo nuestras condiciones experimentales de menor fuerza iónica son $K = 1483 \pm 59$ M⁻¹ y $k_{\text{TE}} = 1.9 \pm 0.08$ s⁻¹. Se ha informado que las constantes de rapidez de reacción para la reacción de transferencia electrónica en Fd dependen de la fuerza iónica;⁸⁵ por lo que los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con lo expuesto ya que la constante de asociación K aumenta de manera muy marcada al disminuir la fuerza iónica como era de esperarse y por el contrario la transferencia electrónica intra-aducto no se afecta.

Al comparar los resultados obtenidos en medio acuoso con respecto a la mezcla DMSO/H₂O (25%) bajo las mismas condiciones de pH, sustancia

amortiguadora, temperatura y fuerza iónica los valores de $K = 1483 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 1.9 \text{ s}^{-1}$ para el medio acuoso y de $K = 1069 \pm 117 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 21 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ para la mezcla DMSO/H₂O son notablemente diferentes. Se observa una disminución del valor de la constante de asociación K en la mezcla DMSO/H₂O de un 28% con respecto al medio acuoso, pero el cambio no es tan considerable como en el caso de PCu. La presencia del DMSO cambia la constante dieléctrica del medio y dado que el aducto se estabiliza mediante interacciones electrostáticas es de esperarse un cambio importante en la constante de asociación. En cuanto al valor de la k_{TE} en la mezcla DMSO/H₂O la constante k_{TE} es 11 veces mayor que aquella medida en medio acuoso. Conociendo que la transferencia electrónica es el paso limitante de la reacción se observa que la presencia del DMSO acelera la reacción al igual que lo observado para el caso de la PCu.

En el caso de la Fd no se tiene hasta el momento evidencia de más de un sitio de unión de los oxidantes a la proteína (figura 5.34), sin importar su naturaleza catiónica, neutra o aniónica,¹⁵ por lo que la aceleración de la reacción no puede explicarse debido a un cambio de sitio de unión al cambiar el medio como en el caso de la PCu.

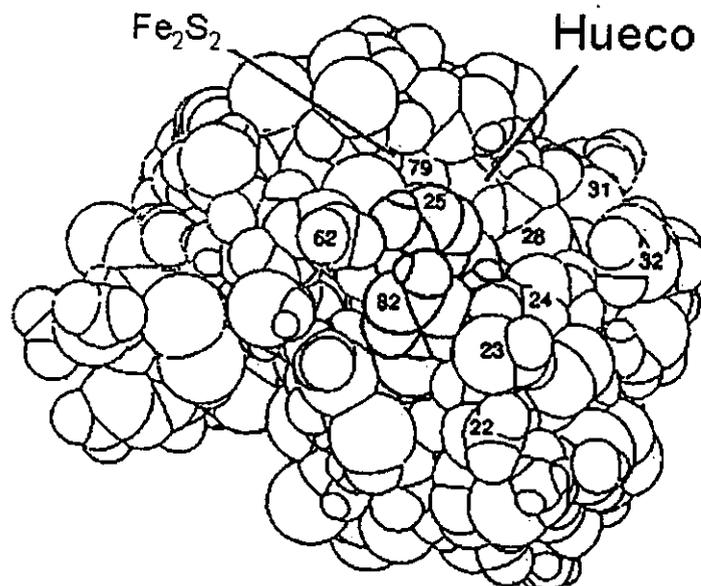


Figura 5.34. Estructura Fd de *A. Variabilis*, mostrando el único sitio de unión Tyr82, Tyr25 y los residuos aniónicos Asp22, Asp23 y Asp62.

Lo que hasta el momento no ha quedado establecido es la ruta por la que se transfieren los electrones, una de las rutas más probables obtenida por medio de cálculos teóricos es la que se esquematiza en la figura 5.35.²⁷

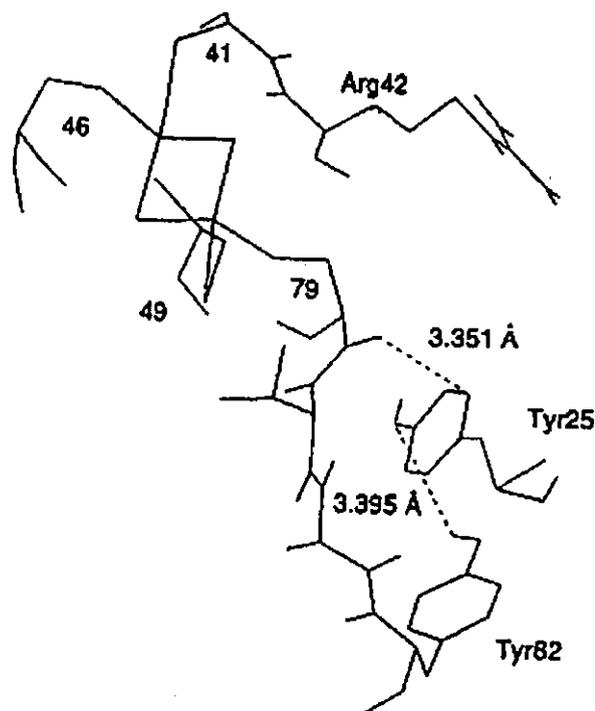


Figura 5.35 Posible ruta de la transferencia electrónica para la oxidación de $[Fe_2S_2]^+$ cuando el oxidante se une a la proteína en el sitio cercano a los residuos Tyr82 y Tyr25.

Para que la transferencia electrónica ocurra se supone en primer lugar que la Tyr82 y la Tyr25 se encuentran lo suficientemente cercanas para que se de el proceso. Posteriormente, el electrón por medio de enlaces de hidrógeno y saltos a través del espacio en una distancia de 3.49 Å se transfiere del anillo aromático de la Tyr25 al grupo carbonilo de la Cys79 unida al centro metálico, enseguida se da una transferencia a través de 4 enlaces a una distancia de 9.35 Å para llegar al azufre de la Cys79. Por último, ocurre una transferencia electrónica rápida a través del átomo de Fe_B al átomo de Fe_A . Por lo que posiblemente la aceleración de la

reacción en la presencia de DMSO ocurre al favorecerse esta transferencia electrónica intramolecular.

Adicionalmente estudiamos el efecto de la temperatura en la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca con $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ en ambos medios. Los resultados se presentan en la tabla 5.20 y la figura 5.36.

Tabla 5.20 Efecto de la temperatura en las constantes de rapidez de reacción de segundo orden en los diferentes medios de reacción para la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ con $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$, $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl), $\text{pH} = 8.0$ Tris/HCl.

Temperatura °C	H ₂ O $k_{\text{exp.}} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	DMSO/H ₂ O (25%) $k_{\text{exp.}} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
20.1	993.8	1.06×10^4
21.8	1083	1.13×10^4
22.6	1200	1.21×10^4
25	1483.3	1.33×10^4
27.5	1795.8	1.5×10^4

De los resultados se observa que los parámetros cinéticos cambian dependiendo del medio de reacción. La reacción se ve energéticamente favorecida al utilizar la mezcla DMSO/H₂O (25%) ya que el valor de entalpía de activación es $31.57 \pm 1.8 \text{ kJ/mol}$, mientras que el obtenido para la misma reacción en solución acuosa es de $58.4 \pm 3.2 \text{ kJ/mol}$. Los valores de ΔS^\ddagger son radicalmente diferentes en agua $\Delta S^\ddagger = 11.6 \pm 0.6 \text{ J/mol K}$ mientras que en el medio de reacción DMSO/H₂O $\Delta S^\ddagger = -60.02 \pm 2.7 \text{ J/mol K}$; se observa al igual que en el caso de la PCu que la entropía de activación es negativa en DMSO/H₂O lo que indica un cambio importante en la fuerza de asociación al cambiar el medio.

De los datos informados en la literatura se observa que al disminuir la carga del oxidante la entalpía de activación disminuye y por otro lado la entropía de activación se vuelve negativa. Lo que demuestra la importancia de las interacciones electrostáticas.²⁵

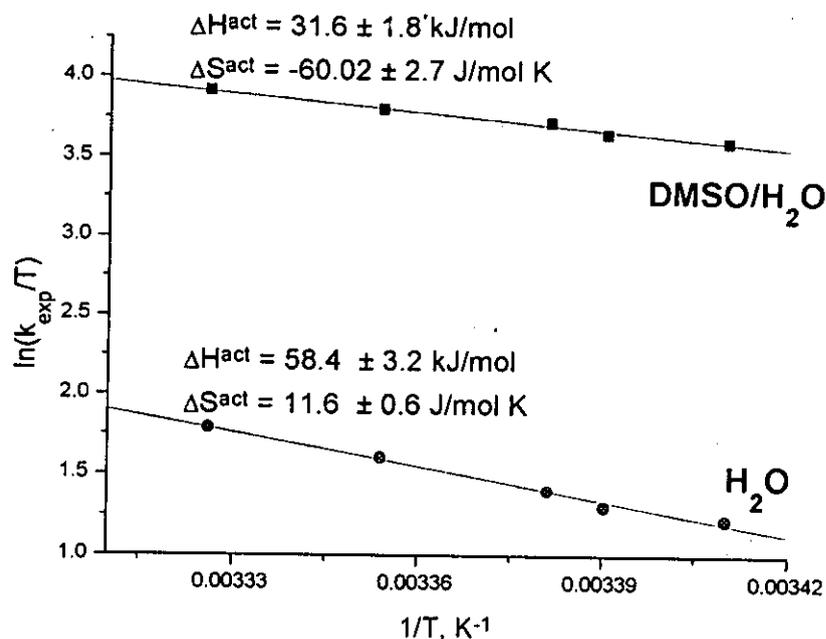


Figura 5.36. Efecto de la temperatura en la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ con $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$; Tris/HCl (20 mM) pH 8.0, $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl). • medio acuoso y ■ DMSO/H₂O (25%); donde k_{exp} es la constante experimental de segundo orden.

Mediante la relación isocinética, es decir una gráfica de ΔH^\ddagger ante ΔS^\ddagger , se puede proponer un mecanismo similar para la serie de compuestos estudiados. En la figura 5.37 se muestra la relación isocinética de los resultados de este trabajo comparados con los publicados por Sykes.²⁵

Se observa la misma tendencia que para las reacciones de transferencia con la PCu, a mayor carga del oxidante la entalpía y la entropía de activación son mayores.

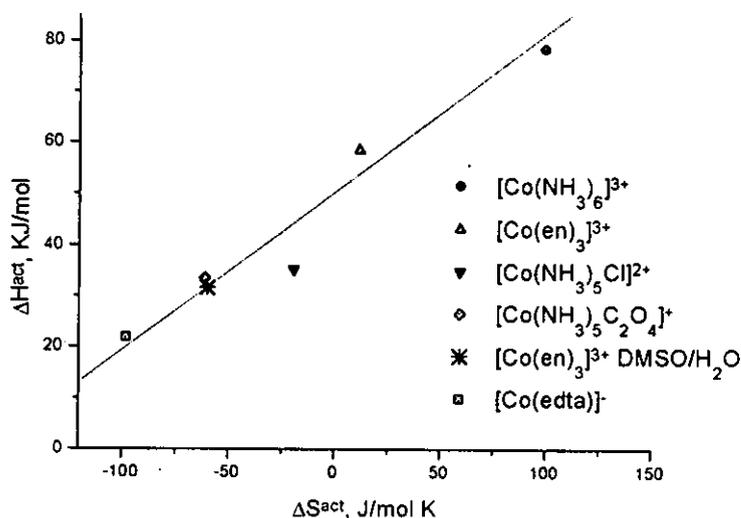


Figura 5.37. Gráfica de ΔH^{\ddagger} vs ΔS^{\ddagger} para las reacciones de transferencia electrónica entre $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ y diferentes oxidantes. Los valores para $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$

▲ en medio acuoso y * DMSO/ H_2O se obtuvieron en este trabajo.

5.6.2 Reacciones de transferencia electrónica entre Fd y compuestos de coordinación de derivados bencimidazólicos.

Las ferredoxinas transfieren solamente un electrón durante su ciclo redox y poseen potenciales muy bajos aproximadamente -420 mV. Este potencial tan bajo impone restricciones en el tipo reactivos redox que se pueden utilizar en estudios cinéticos. Existe una gran limitación en la elección de agentes reductores, únicamente se han realizado estudios con ditionito $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, indicando la participación del radical $\text{SO}_2^{\cdot-}$,²⁴ y con el radical catiónico de metilviológeno generado electroquímicamente.¹³

La mayoría de los oxidantes comunes utilizados en química poseen potenciales relativamente elevados y por tanto las reacciones con Fd reducida son extremadamente rápidas para estudiarse por técnicas de flujo.

Particularmente en las reacciones de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ se han utilizado complejos de Co(III) con ligantes donadores de nitrógeno que presentan bajos potenciales de reducción permitiendo ser estudiados cinéticamente por técnicas de flujo.

Los compuestos de coordinación que se han utilizado como reactivos redox en las reacciones con Fd son en su gran mayoría compuestos inertes a la sustitución. Entre los compuestos utilizados hasta el momento se encuentran $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{C}_2\text{O}_4]^+$, $[\text{Co}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$, $[\text{Co}(\text{acac})_3]$, $[(\text{NH}_3)_5\text{Co}(\text{NH}_2)\text{Co}(\text{NH}_3)_5]^{5+}$, $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ y $[\text{Co}(\text{edta})]^-$.^{13, 15, 27}

En el desarrollo del proyecto se sintetizaron compuestos de coordinación de los derivados bencimidazólicos de los iones metálicos Co(III) Cr(III) y Fe(III) con el fin de ensayarse como oxidantes de la $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca.

Los compuestos de cobalto(III) $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}(\text{NO}_3)_2$ (**Co-3**), $[\text{Co}(\text{2gb})_3](\text{CCl}_3\text{COO})_3$ (**Co-4**), $[\text{Co}(\text{2gb})_3]\text{Cl}_3$ (**Co-5**) y $[\text{Co}(\text{2amb})_3]\text{Cl}_3$ (**Co-7**) estables en disolución resultaron ser activos redox frente a $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$.

Las reacciones de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ con **Co-3** y **Co-7** muestran cinéticas limitantes. Los resultados se presentan en las figuras 5.38 y 5.39 se muestra que en ambos casos obedecen la ley de rapidez expresada en la ecuación 5.4. Para el compuesto **Co-3** se obtuvieron las constantes de rapidez $K = 759 \pm 144 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 28.7 \pm 5.6 \text{ s}^{-1}$, mientras que para **Co-7** $K = 654 \pm 57 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 53.8 \pm 3.5 \text{ s}^{-1}$. En ambos casos se observan constantes de asociación en el orden de las informadas para compuestos con carga 3+ en medio acuoso y fuerza iónica 0.1 M. Las constantes de rapidez para la transferencia electrónica son mayores a las informadas hasta el momento para compuestos con carga 3+, las cuales se encuentran en el intervalo de 2.7 a 20 s^{-1} .²⁵

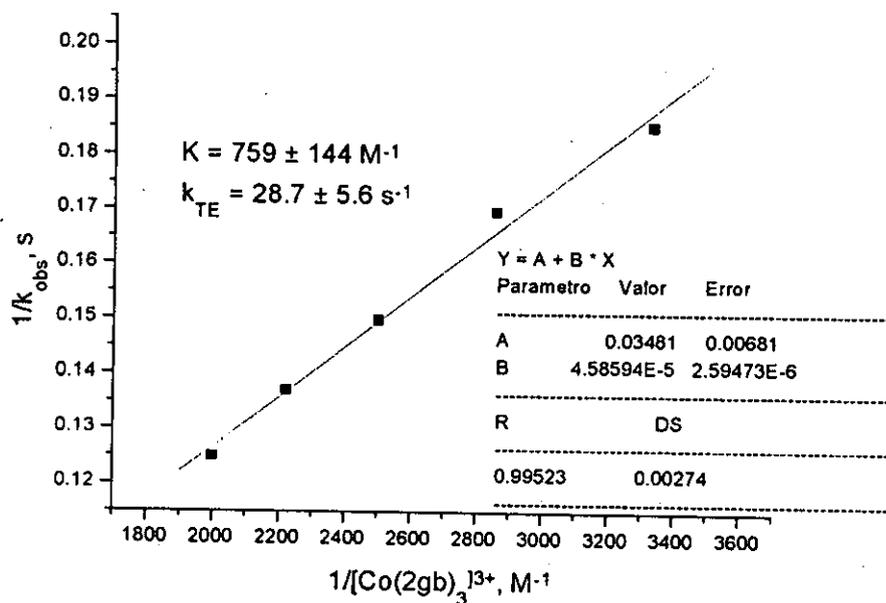


Figura 5.38. Reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca por Co-3.
 DMSO/ H_2O (25%), Tris/HCl pH= 8.0, I= 0.03 M (NaCl), T= 25°C.

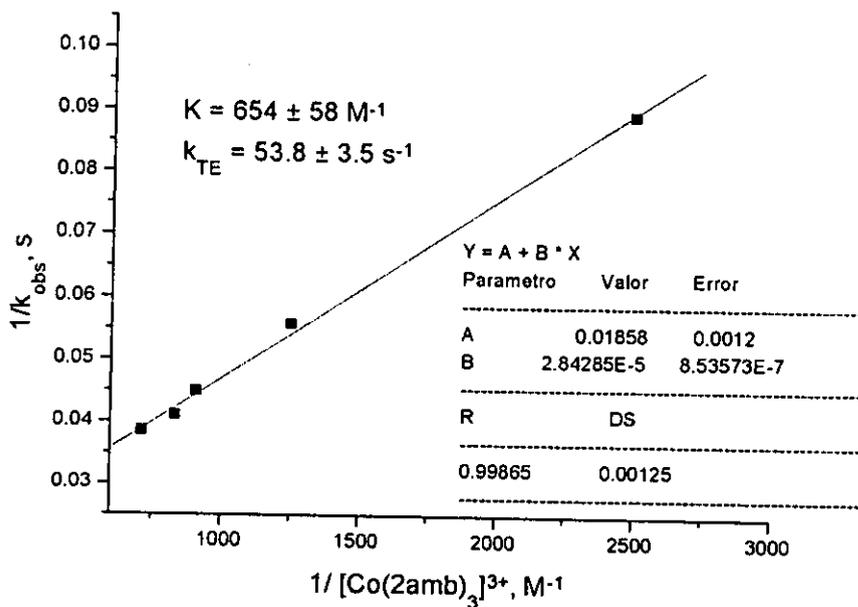


Figura 5.39. Reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca por Co-7.
 DMSO/ H_2O (25%), Tris/HCl pH= 8.0, I= 0.03 M (NaCl), T= 25°C.

Se llevó a cabo el estudio a diferentes temperaturas en las reacciones de oxidación de la ferredoxina con los compuestos bencimidazólicos de cobalto(III). Para este estudio se utilizaron condiciones de pseudo-primer orden y además concentraciones bajas de oxidante para simplificar la ley de rapidez $d[Fe_2S_2]^+/dt = k [Fe_2S_2]^+ [oxidante]$ y utilizar las constantes de rapidez de segundo orden. Los resultados se muestran en la tabla 5.21.

Tabla 5.21. Efecto de la temperatura en las constantes de rapidez de reacción de segundo orden en la oxidación de $[Fe_2S_2]^+$ por **Co-3** y **Co-7**, $I = 0.03 M$ (NaCl), $pH = 8.0$ Tris/HCl, DMSO/H₂O (25%).

Temperatura ° C	Co-3 $10^{-3} k_{exp}, M^{-1} s^{-1}$	Temperatura ° C	Co-7 $10^{-3} k_{exp}, M^{-1} s^{-1}$
21.0	19.4	21.2	22.8
23.5	23.9	22.5	26.8
25.0	28.3	25	29.3
27.6	31.2	26.6	39.6
29.7	37.6	28.9	51.3

De este estudio utilizando la ecuación de Eyring y de una gráfica de $\ln(k_{exp}/T)$ en función de T^{-1} se obtuvieron los parámetros cinéticos ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger los cuáles se presentan en la tabla 5.22.

Tabla 5.22. Constantes de segundo orden $k = K \cdot k_{TE}$ y parámetros de activación para la reacciones de oxidación de $[Fe_2S_2]^+$ de espinaca con los oxidantes de cobalto(III), DMSO/H₂O (25%), $pH = 8.0$, $I = 0.03 M$, $T = 25^\circ C$.

Oxidante	k $M^{-1} s^{-1}$	ΔH^\ddagger kJ/mol	ΔS^\ddagger J/mol K
$[Co(en)_3]^{3+}$	2.27×10^4	31.57	-60.0
$[Co(2gb)_3]^{3+}$	2.18×10^4	52.03	14.33
$[Co(amb)_3]^{3+}$	3.5×10^4	73.93	89.6

Al comparar los resultados anteriores con los presentados en la relación isocinética de la figura 5.37 se observa que los parámetros ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger tanto para **Co-3** como para **Co-7** corresponden a lo esperado para compuestos catiónicos con carga 3+, los cuales presentan un mecanismo de cinética limitante con un paso de asociación anterior a la transferencia electrónica.

Los compuestos de Fe(III) estables en disolución $[\text{Fe}(\text{2gb})_3](\text{NO}_3)_3$ (**Fe-1**) y $[\text{Fe}(\text{ntb})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (**Fe-2**), también fueron activos redox frente a $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca en las condiciones de DMSO/ H_2O (25%), Tris/HCl (20 mM) pH=8.0, I=0.03 M (NaCl) y en el intervalo de temperaturas de 20 a 30 °C.

En la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ con los compuestos de Fe(III) bencimidazólicos **Fe-1** y **Fe-2** en ambos casos se observa como se esperaba para compuestos catiónicos un mecanismo de cinética limitante como se muestra en las figuras 5.40 y 5.41 para **Fe-1** y **Fe-2** respectivamente.

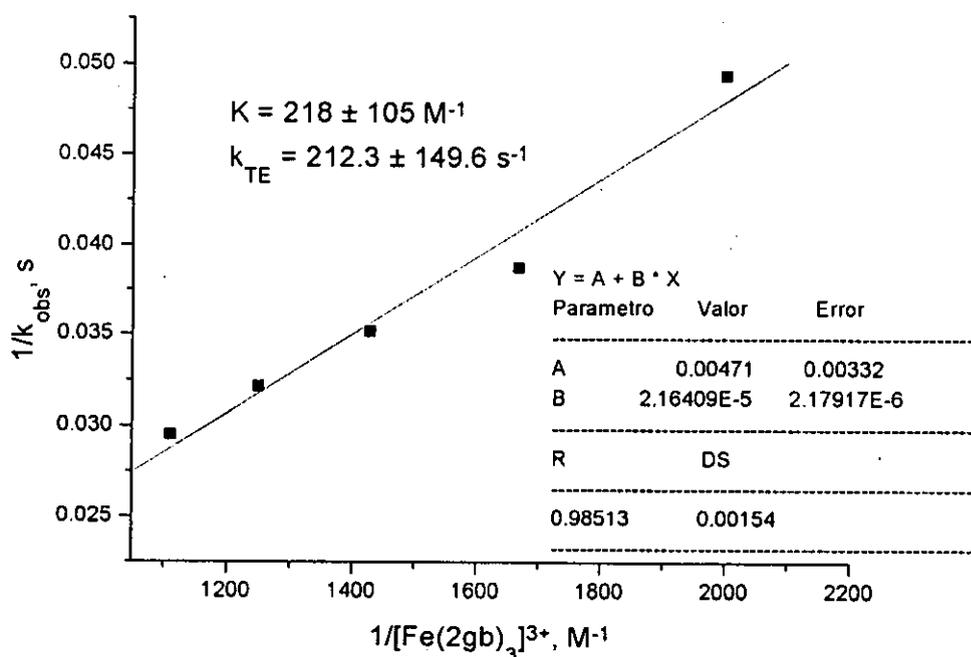


Figura 5.40. Reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca por **Fe-1**. DMSO/ H_2O (25%), Tris/HCl pH= 8.0, I= 0.03 M (NaCl), T= 21.5°C.

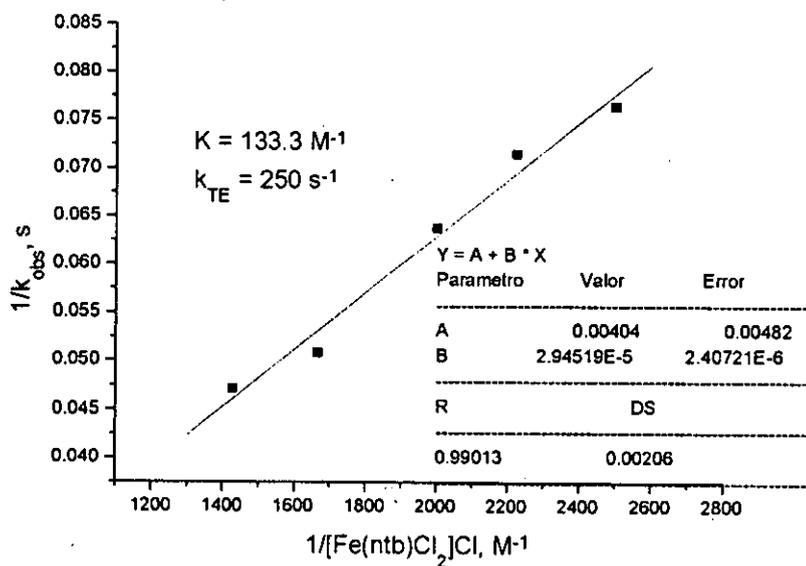


Figura 5.41. Reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca por Fe-2. DMSO/ H_2O (25%), Tris/HCl pH= 8.0, $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl), $T = 20.2^\circ\text{C}$.

En el caso de la Fd sí se observó asociación de los oxidantes de Fe(III) a la proteína anterior a la transferencia electrónica a diferencia de lo observado para PCu donde esta asociación no es observable. Aunque las constantes de asociación obtenidas para Fe-1 $K = 218 \pm 105 \text{ M}^{-1}$ y para Fe-2 $K = 133.3 \text{ M}^{-1}$ son pequeñas en comparación con los valores informados en H_2O , para compuestos con carga 3+ como por ejemplo para Co-3, Co-7 y $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ las constantes de asociación obtenidas son: 759.08, 654 y 1068 M^{-1} respectivamente, es decir nuevamente al igual que en el caso de PCu la asociación presentada por los compuestos de Fe(III) es pequeña. Las constantes de rapidez y asociación obtenidas para los compuestos de Fe(III) muestran un gran error debido a la asociación tan pequeña, pero no fue posible realizar determinaciones a concentración de oxidante mayor para corroborar el mecanismo. Por el contrario la transferencia electrónica, paso limitante de la reacción, ocurre más rápidamente, las constantes de rapidez que se presentan son del orden de 2 x

10^2 s^{-1} , mucho mayores a las informadas en la literatura que se encuentran en el intervalo de 2.7 a 20 s^{-1} .²⁵

De lo anterior se puede concluir que la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ por los compuestos de Fe(III) ocurre a grandes rapidezces teniéndose constantes de segundo orden Kk_{TE} para Fe-1 de $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $21.5 \text{ }^\circ\text{C}$ mientras que para Fe-2 de $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $20.2 \text{ }^\circ\text{C}$ estos son valores mayores que los obtenidos para los compuestos de cobalto(III) a 25°C tabla 5.22.

Se estudio el efecto de la temperatura en la rapidez de reacción para los compuestos de Fe(III) como oxidantes en la reacción de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca en DMSO/ H_2O (25%), $\text{pH} = 8.0$ Tris/HCl, $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl) utilizando concentración de oxidante baja para simplificar la ley de rapidez a una cinética de segundo orden. Los resultados se presentan en la figura 5.42.

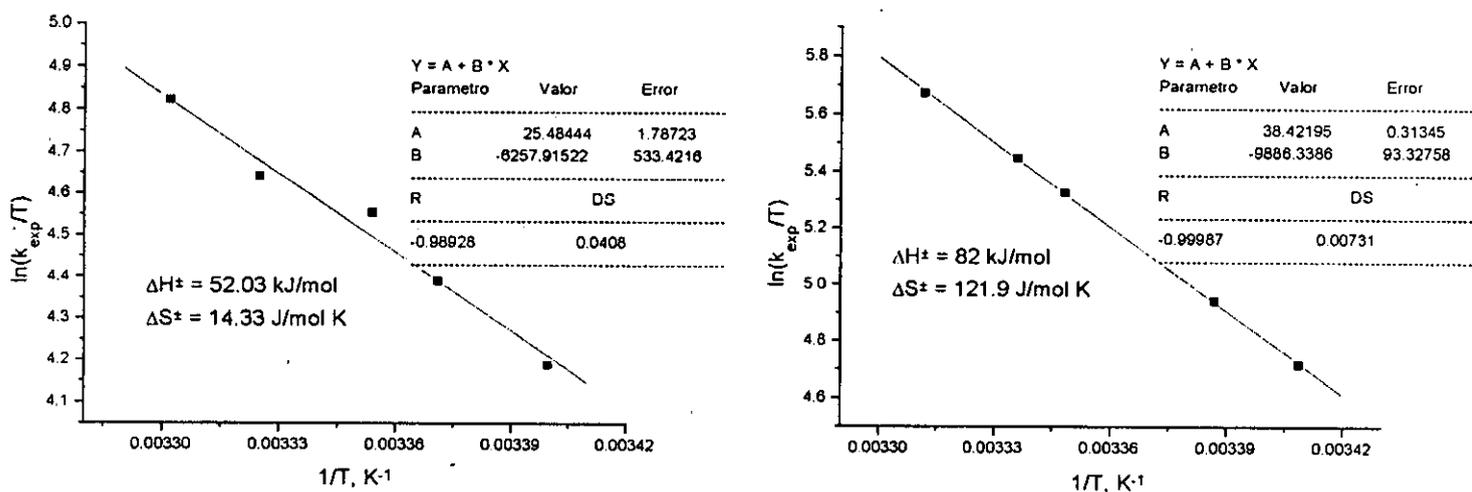


Figura 5.42. Efecto de la temperatura en la reacción de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ con los compuestos Fe-1 y Fe-2. Condiciones DMSO/ H_2O (25%), $\text{pH} = 8.0$ Tris/HCl (20mM), $I = 0.03 \text{ M}$ (NaCl). Gráfica izquierda Fe-1 y gráfica derecha Fe-2.

De los resultados se observa que el valor de ΔH^\ddagger es notablemente mayor para el caso de **Fe-2**, es decir al igual que en el caso de PCu la reacción con el compuesto que posee ntb como ligante se encuentra energéticamente menos favorecida que la reacción con **Fe-1** que posee tres 2gb como ligantes.

Al realizar la relación isocinética (figura 5.43) de los resultados obtenidos al utilizar los compuestos de cobalto(III) y hierro(III) con ligantes bencimidazólicos, **Co-3** (2gb), **Co-7** (2amb), **Fe-1** (2gb) y **Fe-2** (ntb), se observa que posiblemente el mecanismo de reacción es el mismo en todos los casos. Es de resaltar que ambos compuestos con el ligante 2gb, **Co-3** y **Fe-1**, poseen parámetros cinéticos prácticamente idénticos, es decir la energética de la reacción es la misma. Las reacciones con **Co-7** y **Fe-2** se encuentran energéticamente menos favorecidas.

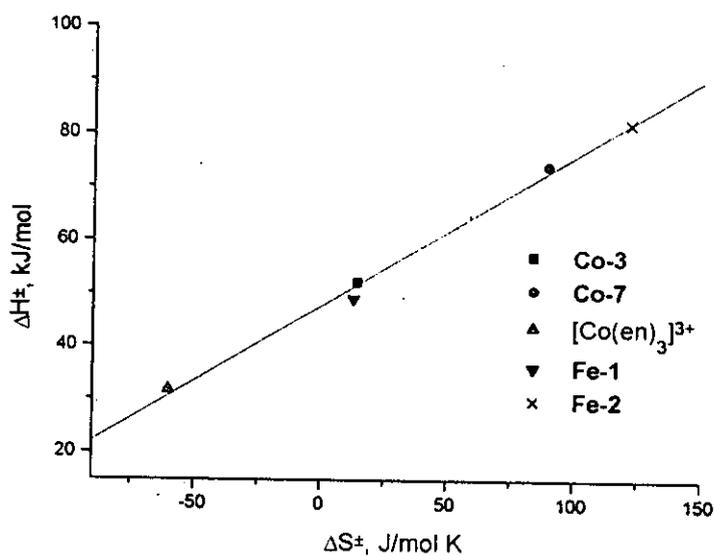


Figura 5.43. Relación isocinética para las reacciones de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^\ddagger$ de espinaca, DMSO/H₂O (25%), pH= 8.0 Tris/HCl, I= 0.03 M (NaCl).

Se llevaron a cabo reacciones de oxidación de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^\ddagger$ de espinaca en DMSO/H₂O (25%), pH= 8.0 Tris/HCl, I= 0.03 M (NaCl) con los compuestos

bencimidazólicos de Cr(III), los compuestos **Cr-1** $[\text{Cr}(\text{2gb})_3\text{Cl}[\text{ZnCl}_4]]$, **Cr-2** $[\text{Cr}(\text{2gb})_3\text{Cl}_3]$ y **Cr-7** $[\text{Cr}(\text{2pb})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ resultaron ser oxidantes de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ de espinaca en las condiciones de reacción DMSO/H₂O (25%), pH= 8.0 Tris/HCl, I= 0.03 M (NaCl). Anteriormente ya se había informado de reacciones de la Fd con compuestos de Cr(III), especialmente el caso de $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ como oxidante (-260 mV). Se informó que el mecanismo que obedece la reacción de Fd de espinaca es el de cinética limitante con las constantes correspondientes $K = 733 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE} = 16.5 \text{ s}^{-1}$ a 25 °C, pH= 8.0 (Tris/HCl) y I = 0.1 M (NaCl).²⁷

En el desarrollo del proyecto se observó que los compuestos son activos redox frente a $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$ en las condiciones de reacción utilizadas pero la rapidez de reacción es muy alta y no fue posible llevar a cabo el estudio cinético completo al tener problemas en las mediciones.

Se pudieron obtener constantes experimentales aproximadas de segundo orden al trabajar en concentraciones bajas del oxidante aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ M}$. Los resultados se muestran en la tabla 5.23.

Tabla 5.23. Constantes experimentales de segundo orden (k_{exp}). DMSO/H₂O (25%), pH =8.0 (Tris/HCl), I = 0.03 M (NaCl), T = 25°C.

Compuesto	$k_{\text{exp}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
Cr-1	$\sim 3 \times 10^4$
Cr-2	$\sim 3 \times 10^4$
Cr-7	$\sim 7 \times 10^4$

6. Conclusiones

- Se sintetizaron y caracterizaron nuevos compuestos de coordinación con los iones metálicos Co(III), Cr(III) y Fe(III) utilizando los ligantes bencimidazólicos 2gb, bbimpy, ntb, 4tb,2pb y 2amb, para utilizarse como oxidantes o inhibidores en las reacciones de transferencia electrónica en las metaloproteínas.
- Los ligantes bencimidazólicos 2gb, bbimpy, ntb, 4tb,2pb y 2amb se coordinan en todos los casos por medio del nitrógeno imidazólico y en forma de quelato.
- El mecanismo de la transferencia electrónica entre PCu ó Fd y los compuestos redox inorgánicos no cambia al variar el medio de reacción a DMSO/H₂O sugiriendo la formación de un compuesto precursor anterior a la transferencia electrónica.
- La presencia en el medio de reacción de DMSO favorece notablemente la transferencia electrónica intramolecular como lo indican las constantes de rapidez de la transferencia electrónica.
- Los compuestos de Fe(III) de ligantes bencimidazólicos son oxidantes de la PCu(I) en las condiciones de trabajo y observándose un mecanismo simple de segundo orden.
- Los compuestos de Co(III) y Cr(III) de ligantes bencimidazólicos son inhibidores de la oxidación de PCu(I) por [Co(fen)₃]³⁺ al unirse estos a la proteína bloqueando su actividad.
- Los compuestos de Co(III), Cr(III) y Fe(III) de ligantes bencimidazólicos son oxidantes de [Fe₂S₂]⁺, observándose que siguen el mecanismo propuesto anteriormente.
- La PCu(I) no se desnaturaliza en presencia de DMSO (25%), como lo indica su espectro de RMN.

7. Referencias

- 1) King-Díaz, B.; Barba-Behrens, N.; Montes-Ayala, J.; Castillo-Blum, S. E.; Escatín-Guzmán, C.; Iglesias-Prieto, R.; Lotina-Hennsen, B. *Z. Naturforsch.* 1998, **53C**, 987.
- 2) Cenicerós-Gómez, A. E.; King-Díaz, B.; Barba-Behrens, N.; Lotina-Hennsen, B.; Castillo-Blum, S. E. *J. Agric. Food Chem.* 1999, **47**, 3075.
- 3) Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **811**, 265.
- 4) Bond, A. M. *Inorg. Chim. Acta.* 1994, **226**, 293.
- 5) "Electron Transfer in Inorganic, Organic and Biological Systems." *Advances in Chemistry Series 228*, American Chemical Society, Washington, DC, 1991, Capítulo 2. pag. 7-25.
- 6) Lippin, A. G. "Metal Ions in Biological Systems", ed H. Sigel, M. Dekker, NY, 1981, Vol. 13, pp 15-71
- 7) Colman, P. M.; Freeman, H. C.; Guss, J. M.; Murata, M.; Norris, V. A.; Ramshaw, J. A. M.; Venkatappa, M. P. *Nature*, 1978, **272**, 319.
- 8) Guss J. M.; Freeman H. C. *J. Mol. Biol.*, 1983, **169**, 521.
- 9) Collyer, C.A.; Guss, J.M.; Sugimura, Y.; Yoshizaki, F.; Freeman, H. C. *J. Mol. Biol.*; 1990, **211**, 617.
- 10) Xue, Y.; Okvist, M.; Hansson, O.; Young, S. *Protein Sci.*, 1998, 2099.
- 11) Sykes, A. G. *Chem Soc. Rev.*, 1985, 283.
- 12) Rush, J. D.; Levine, F.; Koppenol, W. H. *Biochemistry*, 1988, **27**, 5876.
- 13) Armstrong, F. *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms.*, ed. A.G. Sykes. 1982, **1**, 65.
- 14) Tsukihara, T.; Fukuyama, K.; Mizushima, M.; Harioka, T.; Kusunoki, M.; Katsube, Y.; Hase, T.; Matsubara, H. *J. Mol. Biol.*, 1990, **216**, 399.
- 15) Adzamli, I. K.; Petrou, A.; Sykes, A. G.; Rao, K. K.; Hall, D. O. *Biochem. J.* 1983, **211**, 219.
- 16) Augustin, M. A.; Chapman, S. K.; Davies, D. M.; Watson, A. D.; Sykes, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, 1984, **20**, 281.

- 17) Modi, S.; Nordling, M.; Lundberg, L. G.; Hansson, Ö.; Bendall, D. S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1102**, 85.
- 18) Rosenberg, R. C.; Wherland, S.; Holwerda, R. A.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 6364.
- 19) Segal, M. G.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 4585.
- 20) Holwerda, R. A.; Knaff, D. B.; Gray, H. B.; Clemmer, J. D.; Crowley, R.; Smith, J. M.; Mauk, A. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 1142.
- 21) Mauk, A. G.; Bordignon, E.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 7654.
- 22) Lappin, A. G.; Segal, M. G.; Weatherburn, D. C.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 2297.
- 23) Handford, P. M.; Hill, H. A. O.; Lee, R. W.-K.; Henderson, R. A.; Sykes, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, 1980, **13**, 83.
- 24) Lambeth, D. O.; Palmer, G. *J. Biological Chem.* 1973, **248**, 6095.
- 25) Armstrong, F. A.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 7710.
- 26) Armstrong, F. A.; Henderson, R. A.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 6912
- 27) Lloyd, E.; Tomkinson, N. P.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1992, 753.
- 28) Buchanan, R. M.; O'Brien, R. J.; Richardson, J. F.; Latour, J.-M. *Inorg. Chim. Acta*. 1993, **214**, 33.
- 29) García-Lozano, J.; Server-Carrió, J.; Coret, E.; Folgado, J.-V.; Escrivà, E.; Ballesteros, R. *Inorg. Chim. Acta*. 1996, **245**, 75.
- 30) Aminabhavi, T. M.; Biradar, N. S.; Patil, S. B.; Hoffman, D. E. *Inorg. Chim. Acta*. 1986, **125**, 125.
- 31) Barba-Behrens, N.; Vázquez-Olmos, A.; Castillo-Blum, S. E.; Höjer, G.; Meza-Höger, S.; Hernández, R. M.; Rosales-Hoz, M. J.; Vicente, R.; Escuer, A. *Trans. Met. Chem.*, 1996, **21**, 31.
- 32) Wang, S.; Yu, S.; Luo Q.; Wang, Q.; Shi, J.; Wu, Q. *Trans. Met. Chem.*, 1994, **19**, 205

- 33) Udupa, M. R.; Krebs, B. *Inorg. Chim. Acta*, 1979, **32**, 1.
- 34) Chatlas, J.; Kaizaki, S.; Kita, E.; Kita, P.; Sakagami, N.; van Eldik, R. J. *Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 91.
- 35) Bhushan, H.; Mishra, L. K.; Jha, N. K. *Ind. J. Chem.*, 1982, **21A**, 1135.
- 36) Nishida, Y.; Oishi, N.; Kida, S. *Inorg. Chim. Acta*, 1980, **44**, 1257
- 37) Visswanathan, R.; Palaniandavar, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1995, 1259.
- 38) Visswanathan, R.; Palaniandavar, M.; Balasubramanian, T.; Muthitah, P. T. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 2519.
- 39) Sams, J. R.; Tsin, T. B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1976, 488.
- 40) Addison, A. W.; Burman, S.; Wahlgren, C. G.; Rajan, O. A.; Rowe, T. M.; Sinn, E. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1987, 2621.
- 41) Cardwell, T. J.; Edwards, A. J.; Hartshorn, R. M.; Holmes, R. J.; McFayden, W. D. *Aust. J. Chem.*, 1997, **50**, 1009.
- 42) Charbonnière, L. J.; Williams, A. F.; Piguet, C.; Bernardinelli, G.; Rivara-Minten, E. *Chem. Eur. J.*, 1998, **4**, 485.
- 43) Sheldrick, G. M. SHELX97-2 Users Manual. University of Göttingen, Alemania, 1997.
- 44) Borchet, M.T.; Wessels, J.S.C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **197**, 78.
- 45) Plesnicar, M.; Bendall, D.S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **216**, 192.,
- 46) Christensen, H. E. M.; Conrad, L.S.; Ulstrup, J. *Photosynthesis Research*, 1991, **28**, 89.
- 47) Monrad, L.Z.; Krogmann, D.W. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1141**, 105.
- 48) Krishnamurty, K. V.; Harris, G. M.; Sastri, V. S. *Chem. Rev.*, 1970, **70**, 171.
- 49) Bauer, H. F.; Drinkand, W. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 5031.
- 50) Pryzystal T. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 5545.
- 51) Langford, C. H.; Chung, F. M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 4485.
- 52) Petering, D.; Fee, J. A.; Palmer, G. *J. Biological Chem.*, 1971, **246**, 643.
- 53) Shuangxi, W.; Ying, Z.; Fangjie, Z.; Qiuying, W.; Liufang, W. *Polyhedron*, 1992, **11**, 1919.

- 54) Simon, E.; L'Haridon, P.; Pichon, R.; L'Her, M. *Inorg. Chim. Acta.* 1998, **282**, 173
- 55) Gable, R. W.; Hartshorn, R. M.; McFayden, W. D.; Nunno, L. *Aust. J. Chem.*, 1996, **49**, 625.
- 56) Thompson, L. K., Ramaswamy, B. S.; Seymour, E. A. *Can J. Chem.*, 1977, **55**, 878.
- 57) Lever, A. B. P. "Inorganic Electronic Spectroscopy" 2d. edición, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- 58) Levason, W.; Ogden, J. S.; Spicer, M. D. *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 2128.
- 59) Levason, W.; Spicer, M. D. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1990, 719.
- 60) Addison, A. W.; Hendriks, H. M. J.; Reedijk, J.; Thompson, L. K. *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 103.
- 61) Lane, T. J.; Nakagawa, I.; Walter, J. L.; Kandathil, A. J. *Inorg. Chem.*, 1962, **1**, 267.
- 62) Rajan, R.; Rajaram, R.; Nair, B. U.; Ramasami, T.; Mandal, S. K. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1996, 2019.
- 63) Wang, S.; Cui, Y.; Tan, R.; Luo, Q.; Shi, J.; Wu, Q. *Polyhedron*, 1994, **13**, 1661.
- 64) Cenicerós-Gómez, A. E.; Ramos-Organillo, A.; Hernández-Díaz, J.; Nieto-Martínez, J.; Contreras, R.; Castillo-Blum, S. E. *Heteroatom Chem*, 2000, en prensa.
- 65) Padilla-Martínez I.; Andrade-López, N.; Gama-Goicochea, M.; Aguilar-Cruz, E.; Cruz, A.; Contreras, R.; Tlahuext, H. *Heteroatom Chem.* 1996, **7**, 323.
- 66) Quiroz-Castro, M. E.; Barba-Behrens, N.; Contreras, R.; Bérges, S. Nöth, H. *Polyhedron*, 2000, **19**, 1479.
- 67) Andrade-López, N.; Ariza-Castolo, A.; Contreras, R.; Vázquez-Olmos, A.; Barba-Behrens, N.; Tlahuext, H. *Heteroatom. Chem.*, 1997, **8**, 397.
- 68) Heinrichs, M. A.; Hodgson, D. J.; Michelsen, K.; Pedersen, E. *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 3174.

- 69) Spiccia, L.; Fallon, G. D.; Markiewicz, A.; Murray, K. S.; Riesen, H. *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 1066.
- 70) Gafford, B. G.; Holwerda, R. A. *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 60.
- 71) Van Landschoot, R. C.; Van Hest, J. A. M.; Reedijk, J. J. *Inorg. Nucl. Chem.*, 1976, **38**, 185.
- 72) Cenicerós-Gómez, A. E.; Quiroz-Castro, M. E.; Barba-Behrens, N.; Bernès, S.; Nöth, H.; Castillo-Blum, S. E. *Polyhedron*, 2000, **19**(15), 1821.
- 73) Markley, J. L.; Ulrich, E. L.; Gerg, S. P.; Krogmann, D. W. *Biochemistry*, 1975, **14**, 4428.
- 74) McGinnis, J.; Sinclair-Day, J. D.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1986, 2007.
- 75) Pladziejewicz, J. R.; Brenner, M. S.; Rodeberg, D. A.; Likar, M. D. *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 1450.
- 76) Pladziejewicz, J. R.; Brenner, M. S. *Inorg. Chem.*, 1987, **26**, 3629.
- 77) Christensen, H. E. M.; Conrad, L. S.; Ulstrup, J. *Bioch. Biophys. Acta*, 1992, **1099**, 35.
- 78) He, S.; Modi, S.; Bendall, D. S.; Gray, J. C. *EMBO J.*, 1991, **10**, 4011.
- 79) Kyritsis, P.; Dennison, C.; McFarlane, W.; Nordling, M.; Vänngård, T.; Young, S.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1993, 2289.
- 80) Chapman, S. K.; Watson, A. D.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1983, 2543.
- 81) Sinclair-Day, J. D.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1986, 2069.
- 82) Driscoll, P. C.; Hill, H. A. O.; Redfield, C. *Eur. J. Biochem.*, 1987, **170**, 279.
- 83) Bertini, I.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Gasanov, R.; Luchinat, C.; Martini, G.; Safarov, N.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1999, **121**, 2037.
- 84) Armstrong, F. A.; Driscoll, P. C.; Hill, H. A. O.; Redfield, C. *J. Inorg. Biochem.*, 1986, **28**, 171.
- 85) Rawlings, J.; Wherland, S.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 1968.

Anexo I

Resumen de la determinación estructural del compuesto [Co(2gb)₃]Cl(NO₃)₂

Datos cristalográficos

Fórmula empírica	C ₂₄ H ₂₉ Cl Co N ₁₇ O ₇
Color, ambiente	Prisma rojo
Tamaño del cristal	0.38 x 0.32 x 0.26 mm ³
Montaje	Cristal montado en perfluoropolieteroil
Sistema Cristalino	Triclinico
Grupo espacial	$P\bar{1}$
Dimensiones de la celda	$a = 9.1432(1)$ $b = 12.6658(1)$ $c = 14.2365(2)$ Å $\alpha = 80.300(1)$ $\beta = 78.413(1)$ $\gamma = 74.237(1)^\circ$
Volumen	1542.95 (3) Å ³
Z	2
Peso fórmula	762.02
Densidad (calc.)	1.640 g.cm ⁻³
Coefficiente de absorción	0.718 mm ⁻¹
F(000)	784

Recolección de datos

Difractómetro	Siemens SMART-CD
Colectado en	München, Prof. Heinrich Nöth
Radiación	Mo-K _α ($\lambda = 0.71073$ Å)
Alto voltaje y corriente de tubo	50 KV, 30 mA
Temperatura	173 K
Monocromador	Cristal de grafito altamente orientado
Intervalo 2θ	3 - 58 °
Tipo de barrido	Hemisferio
Velocidad de barrido	Velocidad variable
Intervalo	$-10 \leq h \leq 11, -15 \leq k \leq 15, -17 \leq l \leq 17$
Reflexiones colectadas	8982
Reflexiones independientes ^(a)	4843 ($R_{int} = 1.65\%$)
Reflexiones con $F_o > 4 \sigma(F_o)$	4214
$\langle I / \sigma(I) \rangle$	16.51
Corrección de absorción	SADABS
Factores de transmisión	min = 0.7719, max = 0.8352

Refinamiento y resolución

Sistema utilizado	SHELXTL 5.03 y SHELX97-2
Estadísticas de Wilson	$\langle E^2 - 1 \rangle = 0.915$
Resolución	Métodos directos y mapas de Fourier
Esquema de ponderación	$w = \{\sigma^2(F_o^2) + (0.0572 P)^2 + 2.13 P\}^{-1}$ donde $P = (\max [F_o^2, 0] + 2 F_c^2) / 3$
Parámetros refinados	461
Índices R finales ($I > 2 \sigma(I)$) ^(a)	$R_1 = 4.03\%$, $wR_2 = 10.67\%$
Índices R finales (todos los datos) ^(a)	$R_1 = 4.80\%$, $wR_2 = 11.24\%$

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

Para R_{int} , ambas sumatorias involucran todas las reflexiones para las cuales más de un equivalente de simetría es promediado. Para S, m es el número de reflexiones observadas y n es el número de parámetros refinados.

Distancias de enlace [Co(2gb)₃]Cl(NO₃)₂ (Å)

Co(1)-N(32)	1.914(3)	Co(1)-N(23)	1.925(2)
Co(1)-N(52)	1.928(3)	Co(1)-N(12)	1.929(2)
Co(1)-N(43)	1.933(2)	Co(1)-N(3)	1.948(2)
N(1)-C(2)	1.344(3)	N(1)-C(8)	1.387(4)
C(2)-N(3)	1.324(4)	C(2)-N(10)	1.366(3)
N(3)-C(9)	1.409(3)	C(4)-C(9)	1.387(4)
C(4)-C(5)	1.394(4)	C(5)-C(6)	1.398(5)
C(6)-C(7)	1.381(5)	C(7)-C(8)	1.395(4)
C(8)-C(9)	1.403(4)	N(10)-C(11)	1.379(4)
C(11)-N(12)	1.293(4)	C(11)-N(13)	1.347(3)
N(21)-C(22)	1.363(3)	N(21)-C(28)	1.375(4)
C(22)-N(23)	1.334(4)	C(22)-N(30)	1.352(4)
N(23)-C(29)	1.416(4)	C(24)-C(29)	1.387(5)
C(24)-C(25)	1.394(4)	C(25)-C(26)	1.392(5)
C(26)-C(27)	1.377(5)	C(27)-C(28)	1.395(4)
C(28)-C(29)	1.396(4)	N(30)-C(31)	1.357(3)
C(31)-N(32)	1.311(4)	C(31)-N(33)	1.358(4)
N(41)-C(42)	1.353(3)	N(41)-C(48)	1.384(4)
C(42)-N(43)	1.320(4)	C(42)-N(50)	1.368(4)
N(43)-C(49)	1.413(4)	C(44)-C(45)	1.379(4)
C(44)-C(49)	1.385(5)	C(45)-C(46)	1.397(5)
C(46)-C(47)	1.375(5)	C(47)-C(48)	1.386(4)
C(48)-C(49)	1.404(4)	N(50)-C(51)	1.386(4)
C(51)-N(52)	1.289(4)	C(51)-N(53)	1.346(4)
N(81)-O(82)	1.224(5)	N(81)-O(81)	1.224(4)
N(81)-O(83)	1.243(4)		
N(91)-O(91)	1.243(3)		
N(91)-O(92)	1.250(4)	N(91)-O(93)	1.254(4)

Ángulos de enlace [Co(2gb)₃]Cl(NO₃)₂ (°)

N(32)-Co(1)-N(23)	87.88(10)	N(32)-Co(1)-N(52)	177.48(9)
N(23)-Co(1)-N(52)	93.97(10)	N(32)-Co(1)-N(12)	90.38(10)
N(23)-Co(1)-N(12)	90.71(9)	N(52)-Co(1)-N(12)	87.88(10)
N(32)-Co(1)-N(43)	95.03(10)	N(23)-Co(1)-N(43)	90.21(9)
N(52)-Co(1)-N(43)	86.69(10)	N(12)-Co(1)-N(43)	174.54(11)
N(32)-Co(1)-N(3)	89.43(10)	N(23)-Co(1)-N(3)	176.64(10)
N(52)-Co(1)-N(3)	88.67(10)	N(12)-Co(1)-N(3)	87.31(9)
N(43)-Co(1)-N(3)	92.01(9)		
C(2)-N(1)-C(8)	107.1(2)	N(3)-C(2)-N(1)	113.2(2)
N(3)-C(2)-N(10)	125.2(2)	N(1)-C(2)-N(10)	121.7(2)
C(2)-N(3)-C(9)	105.4(2)	C(2)-N(3)-Co(1)	121.23(18)
C(9)-N(3)-Co(1)	132.34(18)	C(9)-C(4)-C(5)	117.1(3)
C(4)-C(5)-C(6)	121.9(3)	C(7)-C(6)-C(5)	121.5(3)
C(6)-C(7)-C(8)	116.5(3)	N(1)-C(8)-C(7)	131.3(3)
N(1)-C(8)-C(9)	106.1(2)	C(7)-C(8)-C(9)	122.5(3)
C(4)-C(9)-C(8)	120.4(2)	C(4)-C(9)-N(3)	131.5(3)
C(8)-C(9)-N(3)	108.1(2)	C(2)-N(10)-C(11)	122.6(2)
N(12)-C(11)-N(13)	124.6(3)	N(12)-C(11)-N(10)	120.6(2)
N(13)-C(11)-N(10)	114.7(3)	C(11)-N(12)-Co(1)	126.6(2)
C(22)-N(21)-C(28)	108.4(3)	N(23)-C(22)-N(30)	129.8(2)
N(23)-C(22)-N(21)	110.8(3)	N(30)-C(22)-N(21)	119.5(3)
C(22)-N(23)-C(29)	106.5(2)	C(22)-N(23)-Co(1)	122.07(18)
C(29)-N(23)-Co(1)	131.5(2)	C(29)-C(24)-C(25)	117.6(3)
C(26)-C(25)-C(24)	121.9(4)	C(27)-C(26)-C(25)	121.0(3)
C(26)-C(27)-C(28)	117.2(3)	N(21)-C(28)-C(27)	131.2(3)
N(21)-C(28)-C(29)	106.6(2)	C(27)-C(28)-C(29)	122.3(3)
C(24)-C(29)-C(28)	120.1(3)	C(24)-C(29)-N(23)	132.2(3)
C(28)-C(29)-N(23)	107.7(3)	C(22)-N(30)-C(31)	118.6(2)
N(32)-C(31)-N(30)	124.4(3)	N(32)-C(31)-N(33)	120.3(3)
N(30)-C(31)-N(33)	115.3(3)	C(31)-N(32)-Co(1)	125.5(2)
C(42)-N(41)-C(48)	107.0(2)	N(43)-C(42)-N(41)	112.6(3)
N(43)-C(42)-N(50)	126.0(3)	N(41)-C(42)-N(50)	121.4(3)
C(42)-N(43)-C(49)	106.2(2)	C(42)-N(43)-Co(1)	121.7(2)
C(49)-N(43)-Co(1)	132.0(2)	C(45)-C(44)-C(49)	117.4(3)
C(44)-C(45)-C(46)	122.0(4)	C(47)-C(46)-C(45)	121.3(3)
C(46)-C(47)-C(48)	116.9(3)	N(41)-C(48)-C(47)	131.1(3)
N(41)-C(48)-C(49)	106.8(3)	C(47)-C(48)-C(49)	122.2(3)
C(44)-C(49)-C(48)	120.3(3)	C(44)-C(49)-N(43)	132.4(3)
C(48)-C(49)-N(43)	107.3(3)	C(42)-N(50)-C(51)	119.4(2)
N(52)-C(51)-N(53)	124.8(3)	N(52)-C(51)-N(50)	120.3(3)
N(53)-C(51)-N(50)	114.9(2)	C(51)-N(52)-Co(1)	127.1(2)
O(82)-N(81)-O(81)	118.9(4)	O(82)-N(81)-O(83)	119.2(4)
O(81)-N(81)-O(83)	121.8(4)		
O(91)-N(91)-O(92)	119.7(3)	O(91)-N(91)-O(93)	120.2(3)
O(92)-N(91)-O(93)	120.0(3)		

Resumen de la determinación estructural del compuesto [ContbCl]Cl(NO₃)

Datos cristalográficos

Fórmula empírica	[(C ₂₄ H ₂₁ N ₇)Co Cl] Cl (NO ₃) (O H ₂) _{2.5} (C ₂ H ₅ OH) _{0.3}		
Color, ambiente	Prisma regular violeta		
Tamaño del cristal	0.60 x 0.20 x 0.15 mm ³		
Sistema Cristalino	Triclinico		
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$		
Dimensiones de la celda	<i>a</i> = 13.418 (3)	<i>b</i> = 14.175 (3)	<i>c</i> = 17.623 (4) Å
	α = 91.51 (2)	β = 98.94 (2)	γ = 115.93 (2) °
Volumen	2961.1(11) Å ³		
Z	4		
Peso fórmula	658.18		
Densidad (calc.)	1.476 g.cm ⁻³		
Coefficiente de absorción	0.812 mm ⁻¹		
<i>F</i> (000)	1355		

Recolección de datos

Difractómetro	Siemens P4/PC
Colectado en	USAI, Fac. de Química, UNAM
Radiación	Mo-K α (λ = 0.71073 Å)
Alto voltaje y corriente de tubo	50 KV, 35 mA
Temperatura	298 K
Monocromador	Cristal de grafito altamente orientado
Intervalo 2 θ	3.22 - 45.00 °
Tipo de barrido	ω
Velocidad de barrido	Velocidad variable 3 a 40 °. mn ⁻¹ en ω
Intervalo	1 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -15 ≤ <i>k</i> ≤ 14, -18 ≤ <i>l</i> ≤ 18
Reflexiones colectadas	8787
Reflexiones independientes ^(a)	7603 (<i>R</i> _{int} = 4.06 %)
Reflexiones con <i>F</i> _o > 4 σ (<i>F</i> _o)	4562
< <i>I</i> / σ (<i>I</i>) >	7.75
Corrección de absorción	Gaussian face-indexed
Factores de transmisión	min = 0.917, max = 0.965

Refinamiento y resolución

Sistema utilizado	SHELXTL 5.03 y SHELX97-2
Estadísticas de Wilson	< <i>E</i> ² - 1 > = 0.926
Resolución	Métodos directos y mapas de Fourier
Esquema de ponderación	<i>w</i> = [σ^2 (<i>F</i> _o ²) + (0.1139 <i>P</i>) ² + 2.7615 <i>P</i>] ⁻¹ donde <i>P</i> = (max [<i>F</i> _o ² , 0] + 2 <i>F</i> _c ²) / 3
Parámetros refinados	806
Índices <i>R</i> finales (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)) ^(a)	<i>R</i> ₁ = 7.28 %, <i>wR</i> ₂ = 17.83 %
Índices <i>R</i> finales (todos los datos) ^(a)	<i>R</i> ₁ = 13.28 %, <i>wR</i> ₂ = 21.39 %

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

Para *R*_{int}, ambas sumatorias involucran todas las reflexiones para las cuales más de un equivalente de simetría es promediado. Para *S*, *m* es el número de reflexiones observadas y *n* es el número de parámetros refinados.

Distancias de enlace [Co(ntb)Cl]Cl(NO₃) (Å)

Co(1)-N(2)	2.035(7)	Co(1)-N(3)	2.036(6)
Co(1)-N(4)	2.037(6)	Co(1)-Cl(1)	2.313(3)
Co(1)-N(1)	2.390(7)		
N(1)-C(11)	1.459(10)	N(1)-C(1)	1.473(10)
N(1)-C(21)	1.481(9)	N(2)-C(12)	1.328(10)
N(2)-C(18)	1.417(10)	N(3)-C(22)	1.321(10)
N(3)-C(28)	1.407(10)	N(4)-C(2)	1.290(10)
N(4)-C(8)	1.415(10)	N(5)-C(2)	1.349(10)
N(5)-C(3)	1.368(11)	N(6)-C(12)	1.350(10)
N(6)-C(13)	1.361(10)	N(7)-C(22)	1.341(9)
N(7)-C(23)	1.379(11)	C(1)-C(2)	1.493(11)
C(3)-C(8)	1.385(12)	C(3)-C(4)	1.411(12)
C(4)-C(5)	1.336(13)	C(5)-C(6)	1.397(14)
C(6)-C(7)	1.398(11)	C(7)-C(8)	1.381(11)
C(11)-C(12)	1.482(12)	C(13)-C(18)	1.384(12)
C(13)-C(14)	1.405(12)	C(14)-C(15)	1.397(13)
C(15)-C(16)	1.396(14)	C(16)-C(17)	1.365(12)
C(17)-C(18)	1.370(12)	C(21)-C(22)	1.471(11)
C(23)-C(24)	1.393(12)	C(23)-C(28)	1.401(11)
C(24)-C(25)	1.385(14)	C(25)-C(26)	1.366(13)
C(26)-C(27)	1.402(11)	C(27)-C(28)	1.370(11)
Co(2)-N(32)	2.034(7)	Co(2)-N(34)	2.056(7)
Co(2)-N(33)	2.059(7)	Co(2)-Cl(2)	2.315(3)
Co(2)-N(31)	2.370(7)		
N(31)-C(31)	1.473(10)	N(31)-C(51)	1.493(10)
N(31)-C(41)	1.506(11)	N(32)-C(42)	1.302(10)
N(32)-C(48)	1.408(10)	N(33)-C(52)	1.339(11)
N(33)-C(58)	1.395(11)	N(34)-C(32)	1.326(10)
N(34)-C(38)	1.406(10)	N(35)-C(32)	1.340(11)
N(35)-C(33)	1.405(10)	N(36)-C(42)	1.358(10)
N(36)-C(43)	1.386(11)	N(37)-C(52)	1.356(10)
N(37)-C(53)	1.393(12)	C(31)-C(32)	1.484(11)
C(33)-C(34)	1.376(12)	C(33)-C(38)	1.389(12)
C(34)-C(35)	1.354(14)	C(35)-C(36)	1.409(14)
C(36)-C(37)	1.359(13)	C(37)-C(38)	1.406(12)
C(41)-C(42)	1.498(12)	C(43)-C(48)	1.370(12)
C(43)-C(44)	1.382(13)	C(44)-C(45)	1.341(15)
C(45)-C(46)	1.373(15)	C(46)-C(47)	1.385(13)
C(47)-C(48)	1.395(12)	C(51)-C(52)	1.467(13)
C(53)-C(54)	1.382(13)	C(53)-C(58)	1.390(13)

Continuación. Distancias de enlace [Co(ntb)Cl]Cl(NO₃) (Å)

C(54)-C(55)	1.356(15)	C(55)-C(56)	1.370(15)
C(56)-C(57)	1.391(13)	C(57)-C(58)	1.390(13)
N(51)-O(51)	1.115(11)	N(51)-O(52)	1.203(11)
N(51)-O(53)	1.224(14)		
N(61)-O(63)	1.18(2)	N(61)-O(61)	1.22(2)
N(61)-O(62)	1.34(3)		
N(71)-O(71)	1.22(2)	N(71)-O(73)	1.23(2)
N(71)-O(72)	1.23(2)		
C(81)-C(82)	1.53(2)	C(82)-O(83)	1.43(2)

Ángulos de enlace [Co(ntb)Cl]Cl(NO₃) (°)

N(2)-Co(1)-N(3)	111.9(2)	N(2)-Co(1)-N(4)	113.8(3)
N(3)-Co(1)-N(4)	117.1(3)	N(2)-Co(1)-Cl(1)	102.4(2)
N(3)-Co(1)-Cl(1)	104.6(2)	N(4)-Co(1)-Cl(1)	105.2(2)
N(2)-Co(1)-N(1)	76.3(3)	N(3)-Co(1)-N(1)	75.8(2)
N(4)-Co(1)-N(1)	75.6(2)	Cl(1)-Co(1)-N(1)	178.68(18)
C(11)-N(1)-C(1)	114.0(6)	C(11)-N(1)-C(21)	112.7(6)
C(1)-N(1)-C(21)	111.9(6)	C(11)-N(1)-Co(1)	105.1(5)
C(1)-N(1)-Co(1)	104.9(5)	C(21)-N(1)-Co(1)	107.4(5)
C(12)-N(2)-C(18)	104.6(7)	C(12)-N(2)-Co(1)	118.3(6)
C(18)-N(2)-Co(1)	136.4(6)	C(22)-N(3)-C(28)	106.3(6)
C(22)-N(3)-Co(1)	118.6(5)	C(28)-N(3)-Co(1)	135.0(5)
C(2)-N(4)-C(8)	105.5(7)	C(2)-N(4)-Co(1)	118.9(5)
C(8)-N(4)-Co(1)	134.4(6)	C(2)-N(5)-C(3)	107.3(7)
C(12)-N(6)-C(13)	107.8(7)	C(22)-N(7)-C(23)	108.2(7)
N(1)-C(1)-C(2)	107.6(7)	N(4)-C(2)-N(5)	113.0(7)
N(4)-C(2)-C(1)	121.6(7)	N(5)-C(2)-C(1)	125.4(8)
N(5)-C(3)-C(8)	106.1(7)	N(5)-C(3)-C(4)	132.5(9)
C(8)-C(3)-C(4)	121.4(9)	C(5)-C(4)-C(3)	117.5(9)
C(4)-C(5)-C(6)	121.3(9)	C(5)-C(6)-C(7)	122.3(9)
C(8)-C(7)-C(6)	116.0(9)	C(7)-C(8)-C(3)	121.3(8)
C(7)-C(8)-N(4)	130.7(8)	C(3)-C(8)-N(4)	107.9(7)
N(1)-C(11)-C(12)	109.7(7)	N(2)-C(12)-N(6)	112.3(8)
N(2)-C(12)-C(11)	121.0(8)	N(6)-C(12)-C(11)	126.6(8)
N(6)-C(13)-C(18)	106.7(7)	N(6)-C(13)-C(14)	131.1(9)
C(18)-C(13)-C(14)	122.2(9)	C(15)-C(14)-C(13)	115.6(9)
C(16)-C(15)-C(14)	121.7(9)	C(17)-C(16)-C(15)	120.7(9)

Continuación. Ángulos de enlace [Co(ntb)Cl]Cl(NO₃) (°)

C(16)-C(17)-C(18)	119.3(9)	C(17)-C(18)-C(13)	120.4(8)
C(17)-C(18)-N(2)	131.1(8)	C(13)-C(18)-N(2)	108.4(7)
C(22)-C(21)-N(1)	109.1(7)	N(3)-C(22)-N(7)	111.9(7)
N(3)-C(22)-C(21)	123.9(7)	N(7)-C(22)-C(21)	124.2(8)
N(7)-C(23)-C(24)	132.3(9)	N(7)-C(23)-C(28)	105.9(7)
C(24)-C(23)-C(28)	121.7(9)	C(25)-C(24)-C(23)	115.5(9)
C(26)-C(25)-C(24)	123.6(9)	C(25)-C(26)-C(27)	120.6(9)
C(28)-C(27)-C(26)	117.3(8)	C(27)-C(28)-C(23)	121.4(8)
C(27)-C(28)-N(3)	131.0(7)	C(23)-C(28)-N(3)	107.6(7)
N(32)-Co(2)-N(34)	108.9(3)	N(32)-Co(2)-N(33)	114.2(3)
N(34)-Co(2)-N(33)	120.3(3)	N(32)-Co(2)-Cl(2)	106.7(2)
N(34)-Co(2)-Cl(2)	104.1(2)	N(33)-Co(2)-Cl(2)	101.0(2)
N(32)-Co(2)-N(31)	76.7(3)	N(34)-Co(2)-N(31)	75.2(2)
N(33)-Co(2)-N(31)	76.7(3)	Cl(2)-Co(2)-N(31)	176.56(18)
C(31)-N(31)-C(51)	112.3(7)	C(31)-N(31)-C(41)	110.2(7)
C(51)-N(31)-C(41)	112.9(7)	C(31)-N(31)-Co(2)	107.3(5)
C(51)-N(31)-Co(2)	107.2(5)	C(41)-N(31)-Co(2)	106.5(5)
C(42)-N(32)-C(48)	105.5(7)	C(42)-N(32)-Co(2)	118.6(6)
C(48)-N(32)-Co(2)	135.9(6)	C(52)-N(33)-C(58)	105.9(7)
C(52)-N(33)-Co(2)	116.5(6)	C(58)-N(33)-Co(2)	136.5(6)
C(32)-N(34)-C(38)	104.9(7)	C(32)-N(34)-Co(2)	117.7(6)
C(38)-N(34)-Co(2)	136.8(5)	C(32)-N(35)-C(33)	107.5(7)
C(42)-N(36)-C(43)	106.6(7)	C(52)-N(37)-C(53)	108.8(8)
N(31)-C(31)-C(32)	106.1(7)	N(34)-C(32)-N(35)	113.0(8)
N(34)-C(32)-C(31)	122.4(8)	N(35)-C(32)-C(31)	124.5(8)
C(34)-C(33)-C(38)	122.3(9)	C(34)-C(33)-N(35)	132.7(9)
C(38)-C(33)-N(35)	104.9(8)	C(35)-C(34)-C(33)	117.3(10)
C(34)-C(35)-C(36)	120.9(10)	C(37)-C(36)-C(35)	122.9(9)
C(36)-C(37)-C(38)	115.9(9)	C(33)-C(38)-N(34)	109.6(7)
C(33)-C(38)-C(37)	120.7(8)	N(34)-C(38)-C(37)	129.6(8)
C(42)-C(41)-N(31)	107.7(7)	N(32)-C(42)-N(36)	112.7(8)
N(32)-C(42)-C(41)	123.4(8)	N(36)-C(42)-C(41)	123.8(8)
C(48)-C(43)-C(44)	122.8(10)	C(48)-C(43)-N(36)	106.3(7)
C(44)-C(43)-N(36)	130.9(10)	C(45)-C(44)-C(43)	116.7(10)
C(44)-C(45)-C(46)	122.3(10)	C(45)-C(46)-C(47)	121.9(10)
C(46)-C(47)-C(48)	116.1(9)	C(43)-C(48)-C(47)	120.2(8)
C(43)-C(48)-N(32)	108.9(8)	C(47)-C(48)-N(32)	130.9(8)
C(52)-C(51)-N(31)	107.4(7)	N(33)-C(52)-N(37)	110.7(8)

Continuación. Ángulos de enlace [Co(ntb)Cl]Cl(NO₃) (°)

N(33)-C(52)-C(51)	123.4(8)	N(37)-C(52)-C(51)	125.7(9)
C(54)-C(53)-C(58)	123.5(11)	C(54)-C(53)-N(37)	132.0(11)
C(58)-C(53)-N(37)	104.6(8)	C(55)-C(54)-C(53)	116.4(11)
C(54)-C(55)-C(56)	121.5(10)	C(55)-C(56)-C(57)	122.7(11)
C(58)-C(57)-C(56)	116.5(10)	C(57)-C(58)-C(53)	119.1(9)
C(57)-C(58)-N(33)	130.9(9)	C(53)-C(58)-N(33)	109.9(9)
O(51)-N(51)-O(52)	126.1(12)	O(51)-N(51)-O(53)	119.9(11)
O(52)-N(51)-O(53)	113.7(12)		
O(63)-N(61)-O(61)	127(4)	O(63)-N(61)-O(62)	126(3)
O(61)-N(61)-O(62)	107(3)		
O(71)-N(71)-O(73)	111(3)	O(71)-N(71)-O(72)	124(5)
O(73)-N(71)-O(72)	123(4)		
O(83)-C(82)-C(81)	120(4)		

Resumen de la determinación estructural del compuesto [Cr₂(μ-OH)₂(2gb)₄](ClO₄)₄

Datos cristalográficos

Fórmula empírica	[Cr ₂ (C ₈ H ₉ N ₅) ₄ (OH) ₂] (ClO ₄) ₄ (H ₂ O) _{4.67}
Color, ambiente	Púrpura, irregular
Tamaño del cristal	0.6 x 0.4 x 0.4 mm ³
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$
Dimensiones de la celda	<i>a</i> = 12.156 (2) <i>b</i> = 14.035 (2) <i>c</i> = 16.733 (3) Å α = 90.04 (1) β = 110.18 (1) γ = 106.96 (1) °
Volumen	2546.7 (6) Å ³
Z	2
Peso fórmula	1320.70
Densidad (calc.)	1.722 g.cm ⁻³
Coefficiente de absorción	0.738 mm ⁻¹
<i>F</i> (000)	1353

Recolección de datos

Difractómetro	Siemens P4/PC
Radiación	Mo-K α (λ = 0.71073 Å)
Alto voltaje y corriente de tubo	50 KV, 30 mA
Temperatura	298 K
Monocromador	Cristal de grafito
Intervalo 2 θ	3 - 50 °
Tipo de barrido	ω
Velocidad de barrido	Velocidad variable; 4 a 60 °. min ⁻¹ en ω
Intervalo de barrido (ω)	1.00 ° + separación entre posiciones K α 1 y K α 2
Reflexiones estándar	3 mediciones cada 97 reflexiones: 4 0 0, 4 4 8, 1 8 1
Corrección para estándar	min: 0.906, max: 1.001
Intervalo de índices	-1 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -16 ≤ <i>k</i> ≤ 16, -19 ≤ <i>l</i> ≤ 19
Reflexiones colectadas	10303
Reflexiones independientes (a)	8917 (<i>R</i> _{int} = 2.83 %)
Reflexiones con <i>F</i> _o > 4 σ (<i>F</i> _o)	6646
< <i>I</i> / σ (<i>I</i>) >	12.85
Corrección de absorción	12 ψ - barridos con χ cercano a 90 °
Factores de transmisión	min = 0.712, max = 0.758

Refinamiento y resolución

Sistema utilizado	SHELXTL 5.03 and SHELX97
Estadísticas de Wilson	< <i>E</i> ² - 1 > = 0.982
Resolución	Métodos directos y mapas de Fourier
Esquema de ponderación	<i>w</i> = [σ^2 (<i>F</i> _o ²) + (0.0959 <i>P</i>) ² + 4.42 <i>P</i>] ⁻¹ donde <i>P</i> = (max [<i>F</i> _o ² , 0] + 2 <i>F</i> _c ²) / 3
Parámetros refinados	739
Índices <i>R</i> finales (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)) (a)	<i>R</i> ₁ = 5.91 %, <i>wR</i> ₂ = 15.87 %
Índices <i>R</i> finales (todos los datos) (a)	<i>R</i> ₁ = 8.37 %, <i>wR</i> ₂ = 18.24 %

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

Para *R*_{int}, ambas sumatorias involucran todas las reflexiones para las cuales más de un equivalente de simetría es promediado. Para *S*, *m* es el número de reflexiones observadas y *n* es el número de parámetros refinados.

Distancias de enlace $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{2gb})_4](\text{ClO}_4)_4$ (Å)

Cr(1)-O(2)	1.960(3)	Cr(1)-O(1)	1.961(3)
Cr(1)-N(12)	2.021(3)	Cr(1)-N(32)	2.023(4)
Cr(1)-N(3)	2.045(3)	Cr(1)-N(23)	2.052(3)
Cr(2)-O(1)	1.953(3)	Cr(2)-O(2)	1.955(3)
Cr(2)-N(72)	2.019(3)	Cr(2)-N(52)	2.020(4)
Cr(2)-N(63)	2.056(3)	Cr(2)-N(43)	2.060(3)
N(1)-C(2)	1.352(6)	N(1)-C(8)	1.366(6)
C(2)-N(3)	1.327(5)	C(2)-N(10)	1.376(6)
N(3)-C(9)	1.401(5)	C(4)-C(9)	1.380(7)
C(4)-C(5)	1.384(7)	C(5)-C(6)	1.373(9)
C(6)-C(7)	1.374(9)	C(7)-C(8)	1.371(7)
C(8)-C(9)	1.400(7)	N(10)-C(11)	1.376(6)
C(11)-N(12)	1.292(6)	C(11)-N(13)	1.325(6)
N(21)-C(22)	1.351(6)	N(21)-C(28)	1.373(7)
C(22)-N(23)	1.325(6)	C(22)-N(30)	1.380(6)
N(23)-C(29)	1.395(6)	C(24)-C(25)	1.383(7)
C(24)-C(29)	1.397(7)	C(25)-C(26)	1.382(9)
C(26)-C(27)	1.376(9)	C(27)-C(28)	1.378(7)
C(28)-C(29)	1.395(6)	N(30)-C(31)	1.376(6)
C(31)-N(32)	1.303(5)	C(31)-N(33)	1.331(6)
N(41)-C(42)	1.353(6)	N(41)-C(48)	1.384(7)
C(42)-N(43)	1.328(6)	C(42)-N(50)	1.364(6)
N(43)-C(49)	1.404(6)	C(44)-C(45)	1.374(8)
C(44)-C(49)	1.394(7)	C(45)-C(46)	1.381(9)
C(46)-C(47)	1.383(9)	C(47)-C(48)	1.391(7)
C(48)-C(49)	1.384(7)	N(50)-C(51)	1.366(6)
C(51)-N(52)	1.300(6)	C(51)-N(53)	1.334(6)

Continuación. Distancias de enlace $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4](\text{ClO}_4)_4$ (Å)

N(61)-C(62)	1.362(6)	N(61)-C(68)	1.366(6)
C(62)-N(63)	1.324(5)	C(62)-N(70)	1.366(6)
N(63)-C(69)	1.406(5)	C(64)-C(65)	1.386(7)
C(64)-C(69)	1.395(7)	C(65)-C(66)	1.379(9)
C(66)-C(67)	1.375(9)	C(67)-C(68)	1.378(7)
C(68)-C(69)	1.400(7)	N(70)-C(71)	1.370(6)
C(71)-N(72)	1.299(6)	C(71)-N(73)	1.331(6)
Cl(1)-O(14)	1.414(5)	Cl(1)-O(13)	1.419(5)
Cl(1)-O(12)	1.423(5)	Cl(1)-O(11)	1.424(4)
Cl(2)-O(22)	1.399(5)	Cl(2)-O(24)	1.411(5)
Cl(2)-O(21)	1.421(5)	Cl(2)-O(23)	1.430(5)
Cl(3)-O(32)	1.382(4)	Cl(3)-O(34)	1.421(5)
Cl(3)-O(33)	1.426(6)	Cl(3)-O(31)	1.437(5)
Cl(4)-O(41)	1.363(5)	Cl(4)-O(44)	1.417(6)
Cl(4)-O(43)	1.432(6)	Cl(4)-O(42)	1.441(5)

Ángulos de enlace [Cr₂(μ-OH)₂(2gb)₄](ClO₄)₄ (°)

O(2)-Cr(1)-O(1)	75.83(11)	O(2)-Cr(1)-N(12)	92.50(14)
O(1)-Cr(1)-N(12)	168.30(14)	O(2)-Cr(1)-N(32)	168.65(13)
O(1)-Cr(1)-N(32)	92.86(13)	N(12)-Cr(1)-N(32)	98.82(15)
O(2)-Cr(1)-N(3)	93.25(13)	O(1)-Cr(1)-N(3)	95.54(13)
N(12)-Cr(1)-N(3)	84.10(14)	N(32)-Cr(1)-N(3)	88.72(14)
O(2)-Cr(1)-N(23)	95.31(13)	O(1)-Cr(1)-N(23)	92.78(13)
N(12)-Cr(1)-N(23)	89.10(14)	N(32)-Cr(1)-N(23)	84.14(14)
N(3)-Cr(1)-N(23)	169.29(14)		
O(1)-Cr(2)-O(2)	76.12(11)	O(1)-Cr(2)-N(72)	93.49(14)
O(2)-Cr(2)-N(72)	169.49(14)	O(1)-Cr(2)-N(52)	169.32(14)
O(2)-Cr(2)-N(52)	93.30(14)	N(72)-Cr(2)-N(52)	97.13(15)
O(1)-Cr(2)-N(63)	92.25(13)	O(2)-Cr(2)-N(63)	94.87(13)
N(72)-Cr(2)-N(63)	83.81(14)	N(52)-Cr(2)-N(63)	90.01(14)
O(1)-Cr(2)-N(43)	95.06(13)	O(2)-Cr(2)-N(43)	92.23(13)
N(72)-Cr(2)-N(43)	90.25(14)	N(52)-Cr(2)-N(43)	83.82(14)
N(63)-Cr(2)-N(43)	170.85(14)		
Cr(2)-O(1)-Cr(1)	104.03(12)	Cr(2)-O(2)-Cr(1)	104.01(12)
C(2)-N(1)-C(8)	106.8(4)	N(3)-C(2)-N(1)	113.2(4)
N(3)-C(2)-N(10)	125.6(4)	N(1)-C(2)-N(10)	121.2(4)
C(2)-N(3)-C(9)	104.9(3)	C(2)-N(3)-Cr(1)	123.4(3)
C(9)-N(3)-Cr(1)	131.7(3)	C(9)-C(4)-C(5)	117.5(5)
C(6)-C(5)-C(4)	121.5(6)	C(5)-C(6)-C(7)	121.6(5)
C(8)-C(7)-C(6)	117.5(6)	N(1)-C(8)-C(7)	131.5(5)
N(1)-C(8)-C(9)	106.9(4)	C(7)-C(8)-C(9)	121.6(5)
C(4)-C(9)-C(8)	120.4(4)	C(4)-C(9)-N(3)	131.3(4)
C(8)-C(9)-N(3)	108.3(4)	C(2)-N(10)-C(11)	122.8(4)
N(12)-C(11)-N(13)	125.6(4)	N(12)-C(11)-N(10)	120.8(4)
N(13)-C(11)-N(10)	113.7(4)	C(11)-N(12)-Cr(1)	127.5(3)
C(22)-N(21)-C(28)	106.4(4)	N(23)-C(22)-N(21)	113.3(4)
N(23)-C(22)-N(30)	126.0(4)	N(21)-C(22)-N(30)	120.7(4)
C(22)-N(23)-C(29)	105.0(3)	C(22)-N(23)-Cr(1)	122.8(3)
C(29)-N(23)-Cr(1)	132.1(3)	C(25)-C(24)-C(29)	116.7(5)
C(26)-C(25)-C(24)	122.2(6)	C(27)-C(26)-C(25)	121.5(5)
C(26)-C(27)-C(28)	116.9(6)	N(21)-C(28)-C(27)	130.7(5)
N(21)-C(28)-C(29)	106.9(4)	C(27)-C(28)-C(29)	122.4(5)
C(28)-C(29)-N(23)	108.4(4)	C(28)-C(29)-C(24)	120.3(4)
N(23)-C(29)-C(24)	131.3(4)	C(31)-N(30)-C(22)	122.8(4)
N(32)-C(31)-N(33)	125.4(4)	N(32)-C(31)-N(30)	120.5(4)
N(33)-C(31)-N(30)	114.1(4)	C(31)-N(32)-Cr(1)	127.0(3)

Continuación. Ángulos de enlace $[\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(2\text{gb})_4](\text{ClO}_4)_4$ (°)

C(42)-N(41)-C(48)	107.0(4)	N(43)-C(42)-N(41)	112.4(4)
N(43)-C(42)-N(50)	126.3(4)	N(41)-C(42)-N(50)	121.3(4)
C(42)-N(43)-C(49)	105.3(4)	C(42)-N(43)-Cr(2)	122.0(3)
C(49)-N(43)-Cr(2)	131.9(3)	C(45)-C(44)-C(49)	117.8(5)
C(44)-C(45)-C(46)	122.2(6)	C(45)-C(46)-C(47)	120.8(5)
C(46)-C(47)-C(48)	117.0(6)	N(41)-C(48)-C(49)	106.5(4)
N(41)-C(48)-C(47)	131.2(5)	C(49)-C(48)-C(47)	122.3(5)
C(48)-C(49)-C(44)	119.8(4)	C(48)-C(49)-N(43)	108.7(4)
C(44)-C(49)-N(43)	131.5(4)	C(42)-N(50)-C(51)	124.2(4)
N(52)-C(51)-N(53)	124.6(5)	N(52)-C(51)-N(50)	120.4(4)
N(53)-C(51)-N(50)	115.0(4)	C(51)-N(52)-Cr(2)	128.2(3)
C(62)-N(61)-C(68)	107.4(4)	N(63)-C(62)-N(61)	112.2(4)
N(63)-C(62)-N(70)	126.1(4)	N(61)-C(62)-N(70)	121.7(4)
C(62)-N(63)-C(69)	105.5(4)	C(62)-N(63)-Cr(2)	122.5(3)
C(69)-N(63)-Cr(2)	131.5(3)	C(65)-C(64)-C(69)	116.9(5)
C(66)-C(65)-C(64)	121.8(6)	C(67)-C(66)-C(65)	121.7(5)
C(66)-C(67)-C(68)	117.3(5)	N(61)-C(68)-C(67)	131.6(5)
N(61)-C(68)-C(69)	106.6(4)	C(67)-C(68)-C(69)	121.7(5)
C(64)-C(69)-C(68)	120.5(4)	C(64)-C(69)-N(63)	131.3(4)
C(68)-C(69)-N(63)	108.2(4)	C(62)-N(70)-C(71)	123.5(4)
N(72)-C(71)-N(73)	124.7(5)	N(72)-C(71)-N(70)	120.8(4)
N(73)-C(71)-N(70)	114.5(4)	C(71)-N(72)-Cr(2)	128.0(3)
O(14)-Cl(1)-O(13)	109.7(4)	O(14)-Cl(1)-O(12)	109.8(3)
O(13)-Cl(1)-O(12)	108.1(3)	O(14)-Cl(1)-O(11)	108.4(3)
O(13)-Cl(1)-O(11)	109.2(3)	O(12)-Cl(1)-O(11)	111.5(3)
O(22)-Cl(2)-O(24)	109.1(3)	O(22)-Cl(2)-O(21)	109.4(3)
O(24)-Cl(2)-O(21)	110.5(3)	O(22)-Cl(2)-O(23)	109.2(4)
O(24)-Cl(2)-O(23)	111.3(4)	O(21)-Cl(2)-O(23)	107.4(3)
O(32)-Cl(3)-O(34)	110.7(4)	O(32)-Cl(3)-O(33)	107.9(4)
O(34)-Cl(3)-O(33)	110.1(4)	O(32)-Cl(3)-O(31)	110.6(3)
O(34)-Cl(3)-O(31)	108.6(3)	O(33)-Cl(3)-O(31)	108.9(4)
O(41)-Cl(4)-O(44)	110.5(4)	O(41)-Cl(4)-O(43)	109.1(4)
O(44)-Cl(4)-O(43)	108.8(4)	O(41)-Cl(4)-O(42)	110.5(3)
O(44)-Cl(4)-O(42)	109.1(3)	O(43)-Cl(4)-O(42)	108.8(4)

Artículos Publicados.

Synthesis, X-ray and NMR characterisation of cobalt(III) coordination compounds with 2-guanidinobenzimidazolé. Agueda E. Cenicerós-Gómez, Noráh Barba-Behrens, Sylvain Bèrnes, Heinrich Nöth, Silvia E. Castillo-Blum. *Inorganica Chimica Acta*. 2000, **304**, 230-236.

Synthesis, X-ray and spectroscopic characterisation of chromium(III) coordination compounds with benzimidazolic ligands. Agueda E. Cenicerós-Gómez, Noráh Barba-Behrens, M. Elba Quiroz-Castro, Sylvain Bèrnes, Heinrich Nöth, Silvia E. Castillo-Blum. *Polyhedron*. 2000, **119**, 1821-1827.

NMR study of the coordinating behavior of 2,6-bis(benzimidazol-2'-yl)pyridine. Agueda E. Cenicerós-Gómez, Angel Ramos-Organillo, Julio Hernández-Díaz, Jonathan Nieto-Martínez, Rosalinda Contreras, Silvia E. Castillo-Blum. *Heteroatom Chemistry*. 2000, **11**, 392-398.