



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Formación y reactividad fosfodiesterolítica
de complejos de lantánidos con
aminoácidos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICA

P R E S E N T A

ELISA COLLADO FREGOSO



MEXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. J. Manuel Navarrete Tejero
Vocal	Prof. Francisco Rojo Callejas
Secretario	Prof. Anatoli K. Iatsimirski
1er. Suplente	Prof. Silvia Elena Castillo Blum
2o. Suplente	Prof. Juvenal Flores de la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

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

Asesor del tema: Dr. Anatoli K. Iatsimirski

Supervisor técnico: Dra. Claudia Paola Gómez-Tagle Chávez

Sustentante: Elisa Collado Fregoso

Agradecimientos

Al Dr. Anatoli por haberme guiado durante este trayecto. A Paola Gómez-Tagle por su ayuda incansable.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado para la revisión del manuscrito.

A mi papá, por su apoyo incondicional, por sus consejos, por sus enseñanzas. A Josué por mostrarme permanentemente otra forma de ver la vida. A mi mamá por sus acciones siempre bien intencionadas.

A mi demás familia por estar siempre conmigo.

A mis amigos por recordarme la importancia de la diversión y acompañarme en los momentos difíciles.

A mis compañeros del laboratorio por haber hecho tan agradables los momentos de trabajo.

A la UNAM.

A DGAPA por el apoyo económico para la realización de este trabajo mediante el proyecto DGAPA-PAPIIT IN 204805.

A la vida... por que soy muy afortunada.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 213 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, en la Unidad de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM.

Índice general

1. Introducción	8
2. Antecedentes	11
2.1. Estabilidad de fosfodiésteres frente a la hidrólisis	11
2.2. Hidrólisis no catalizada de fosfodiésteres. Rupturas C-O y P-O	13
2.3. Hidrólisis catalizada de fosfodiésteres	16
2.3.1. Los iones metálicos como catalizadores en la hidrólisis de fosfodiésteres.	16
3. Objetivos de la tesis	29
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos particulares	29
4. Parte experimental	31
4.1. Reactivos	31
4.1.1. Sustrato	31
4.1.2. Ligantes	32
4.1.3. Sales metálicas y otras	32
4.2. Ácidos, bases, disolventes y buffers	34
4.3. Equipo	35
4.4. Software	35
4.5. Síntesis y caracterización de Ba(DEP) ₂	36
4.6. Técnicas experimentales empleadas	38

4.6.1. Espectrofotometría y Cinética	38
4.6.2. Potenciometría	42
5. Resultados y discusión	45
5.1. Sistema Ln(III)- 4-ICA	46
5.1.1. Reactividad	46
5.1.2. Estudios espectrofotométricos	57
5.1.3. Estructura de los hidroxocomplejos	61
5.1.4. Análisis de resultados y otros estudios cinéticos	64
5.1.5. Efecto inhibitor de aniones: cinética, potenciometría y espectrofotometría . . .	70
5.2. Sistema Ln (III)- 2-ICA	80
5.3. Sistema Ln (III)-4-IA, Ln = La, Nd	84
6. Conclusiones	87
A. Modelo cinético de hidrólisis consecutivas	89
B. Dependencia de la absorbancia de nitrofenolato con el pH	93
C. Constantes de formación de hidroxocomplejos en Hyperquad	95

Símbolos y abreviaturas

ΔG°	Energía libre de Gibbs estándar
ΔS	Cambio de entropía
2-ICA	2-Imidazol carboxilato
4-IA	4-Imidazol acetato
4-ICA	4-Imidazol carboxilato
18-cw-6	18-corona-6 (éter corona)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	Aspartato
ATP	Adenosintrifosfato
Bicina	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina
Bis-Tris	2,2-bis(hidroximetil)-2,2,2'-nitritrietanol
BNPP	bis-(4-nitrofenil)fosfato
BTP	1,3-Bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano
DEP	Dietilfosfato
DO2A	1,7-dicarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano
DPP	Difenilfosfato
Glu	Glutamina

Gly	Glicina
HEDTA	Ácido N-(2-hidroxietyl)etilendiamin-N,N',N''-triacético
I	Fuerza iónica
K21DA	Ácido 1,7-diaza-4,10,13-trioxaciclopentadecano-N,N'-diacético
k_{Nu}	Constante de velocidad de segundo orden para un nucleófilo
$k_{obs,1}$	Constante de velocidad de primer orden para la hidrólisis de BNPP
$k_{obs,2}$	Constante de velocidad de primer orden para la hidrólisis de MNPP
LD ₅₀	Dosis letal media
Ln	Lantánido
Lys	Lisina
MNPP	Mononitrofenilfosfato
P5L	Péptido de 20 residuos
PDE	Fosfodiesterasas de AMP cíclico
pK _a	Constante logarítmica de disociación ácida
pK _s	Constante logarítmica de solubilidad
PNPDPP	(p-Nitrofenil)-difenilfosfato
PNPMP	(p-Nitrofenil)-metilfosfato
PP	Fenilfosfato
Prob(t)	Probabilidad de que un parámetro sea diferente de cero en un ajuste
r	Coeficiente de linearidad en un ajuste mediante mínimos cuadrados
S _N 1	Sustitución nucleofílica, mecanismo unimolecular
S _N 2	Sustitución nucleofílica, mecanismo bimolecular

Capítulo 1

Introducción

La reactividad fosfodiesterolítica se refiere a la tendencia de hidrolizar un fosfodiéster, *figura 1*. Los enlaces P-O de los diésteres fosfato tienen una gran reactividad termodinámica hacia la hidrólisis, debido a que los valores de ΔG° asociados son negativos. Sin embargo, son inertes cinéticamente debido a que el proceso hidrolítico posee altas energías de activación [53], lo que los hace ser compuestos sumamente estables a condiciones similares a las fisiológicas.

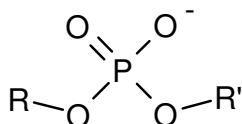


Figura 1. Fosfodiéster en forma básica, R y R' pueden ser alifáticos o aromáticos.

Esta situación es de gran importancia en sistemas biológicos, ya que el esqueleto del material genético tal como el ADN y el ARN está unido por este tipo de enlace. Así, los diésteres fosfato han sido usados como modelo para la ruptura catalizada de ARN.

El tiempo de vida medio de estas macromoléculas se ha estimado de 100 años y de 100 millones de años para ARN y ADN respectivamente [53]. La diferencia pronunciada de reactividad entre éstos radica, como se muestra en la *figura 2*, en que el ARN presenta un nucleófilo interno, correspondiente al hidroxilo de la posición 2'

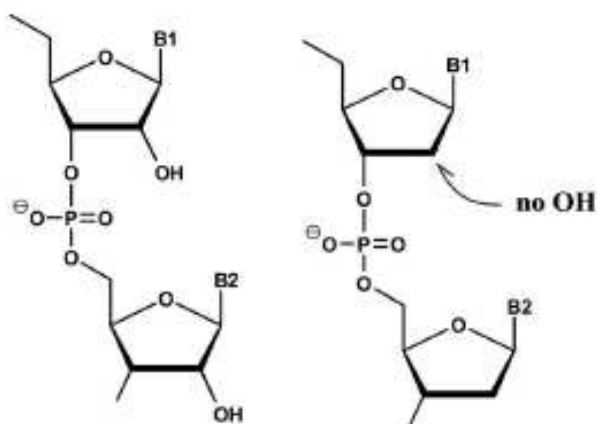


Figura 2. Fragmentos de ARN y de ADN

Por otro lado, existen fosfotriésteres que son altamente tóxicos y se han producido en grandes cantidades para emplearse como insecticidas y armas químicas, figura 3 [53]. Este tipo de compuestos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, responsable de la transmisión de los impulsos nerviosos [60].

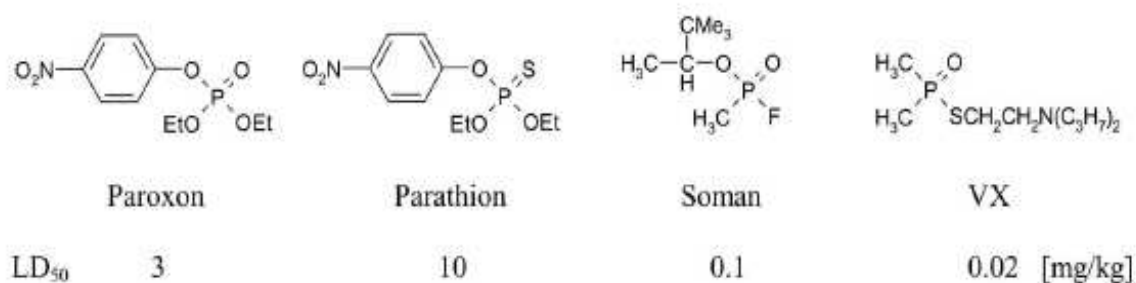


Figura 3. Insecticidas y armas químicas que presentan enlaces fosfoéster o análogos y sus respectivas dosis letales medias.

De acuerdo con lo expuesto, es de interés especial para algunas ramas científicas como la ingeniería genética y la biología molecular por un lado y la química ambiental, por otro lado, romper los enlaces P-O de fosfoésteres, sin embargo, resulta evidente que es necesario usar catalizadores para poder llevar a cabo estas rupturas. Naturalmente, la escisión de los enlaces de fosfoésteres se lleva a cabo

por una gran cantidad de enzimas, entre las que se encuentran las llamadas nucleasas o endonucleasas de restricción, que llegan a provocar aceleraciones hasta de 16 órdenes de magnitud [61] y por lo tanto constituyen el modelo a seguir debido a la gran eficiencia de su catálisis. Por otro lado, el desarrollo de nucleasas artificiales ha adquirido un gran auge últimamente, y con escasas excepciones, la mayoría de los sistemas catalíticos estudiados contienen iones metálicos, de los cuales los lantánidos han sobresalido por su gran eficiencia catalítica.

En este el presente trabajo se estudiaron sistemas que imitan en cierta medida la acción de las enzimas naturales, obteniéndose resultados, si bien aún no comparables con las enzimas naturales, si excelentes de acuerdo con lo que se ha reportado en la literatura respecto a nucleasas artificiales.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Estabilidad de fosfodiésteres frente a la hidrólisis

Como se mencionó anteriormente, los fosfodiésteres son compuestos sumamente estables, de hecho son éstos los que tiene la mayor energía de activación de entre sus análogos mono y trisustituídos. La gran estabilidad de los fosfodiésteres se debe a la densidad electrónica del oxígeno que protege al enlace del ataque de nucleófilos, haciendo que la energía de activación sea excepcionalmente alta. Ahora, los fosfomonoésteres tienen dos oxígenos cargados negativamente por lo que la explicación anterior podría parecer contradictoria, sin embargo es necesario aclarar que para estos últimos el mecanismo es diferente: se ha encontrado que su reactividad es más pronunciada cuando se encuentran en la forma monoaniónica, que propicia una transferencia de protón intramolecular que a su vez permite formar un mejor grupo saliente. Las diferencias en estabilidad frente a la hidrólisis de los diferentes fosfoésteres se pueden notar en sus respectivas constantes de hidrólisis espontánea (a pH neutro) y catalizada por base mostrados en la *tabla 1*. En la *figura 4* se muestran las estructuras de los sustratos abreviados.

Tabla 1. Hidrólisis de diferentes tipos de fosfoésteres a 25°C ^{a)}

No.	Sustrato	Tipo de fosfoéster	k_{OH} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{H_2O} (s^{-1})	Ref.
1	trietilfosfato	triéster	$3.73 \times 10^{-5b)}$	$8.8 \times 10^{-8c)}$	[13]
2	PNPDPP	triéster	$3.45 \times 10^{-1d)}$	$9.7 \times 10^{-6d)}$	[6]
3	BNPP	diéster	1.08×10^{-5}	1.1×10^{-11}	[27]
4	PNPMP	diéster	$5 \times 10^{-5e)}$	$1.97 \times 10^{-9e)}$	[3]
5	dimetilfosfato	diéster	3×10^{-12}	1.9×10^{-19}	[53]
6	MNPP	monoéster		$7.0 \times 10^{-8f)}$	[29]
7	etilfosfato	monoéster		$6.09 \times 10^{-6g)}$	[13]

a) las constantes se calcularon a partir de la energía de activación de las reacciones correspondientes, b) a 37.5°C, c) a 82°C, 60 % dioxano, 40 % H₂O d) 60 % dioxano, 40 % H₂O, e) a 30°C, f) a 39°C, g) a 100°C, ruptura P-O no demostrada.

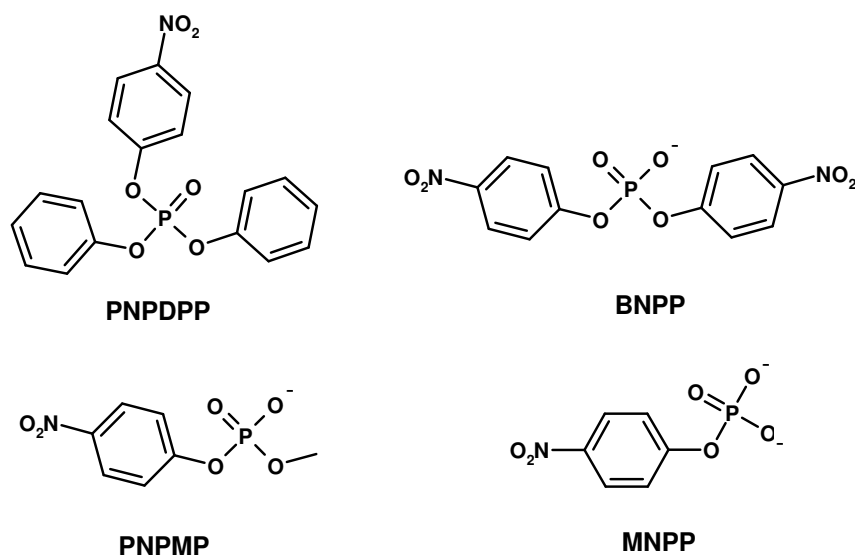


Figura 4. Ésteres fosfato usados comúnmente en experimentos cinéticos.

2.2. Hidrólisis no catalizada de fosfodiésteres. Rupturas C-O y P-O

En trabajos anteriores [3], [6], [13], [29], [53], [69] se ha informado que durante la hidrólisis de un fosfoéster, la ruptura de enlaces P-O no es la única posibilidad de reacción, ya que también se ha detectado, que los enlaces C-O, también pueden sufrir ruptura, y aunque en fosfotriésteres no se ha hallado este tipo de ruptura, en fosfodiésteres y fosfomonoésteres puede competir si el átomo de fósforo se encuentra muy desactivado para ser atacado nucleofílicamente [13], [69], por ejemplo, si tiene varios grupos electrodonadores. Entonces, en los fosfoésteres arílicos predomina la ruptura P-O y en los alquílicos la ruptura C-O, [53]. Así, para fosfoésteres alquílicos, las constantes de hidrólisis espontáneas son aproximaciones considerando la fracción de ruptura P-O, para, por ejemplo, dimetilfosfato (ver *tabla 1*) la fracción llega apenas al 10%, por lo tanto la constante observada para la hidrólisis neutra es de $3 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$. Este diéster es un modelo que sirve para estimar la hidrólisis no catalizada de ADN. Para fosfomonoésteres alquílicos encontramos la misma situación.

En principio, una posibilidad de discriminación entre ambos procesos consiste en llevar a cabo una hidrólisis con el nucleófilo marcado isotópicamente, por ejemplo con H_2^{18}O u $^{18}\text{OH}^-$. En éste trabajo se usó el sustrato BNPP, *figura 4*, que está activado hacia la ruptura P-O debido a que tiene grupos altamente electroattractores. La fracción de hidrólisis de enlace P-O en BNPP es de al menos 80% [3]. Así, en este estudio consideraremos únicamente la ruptura P-O, cuyo mecanismo se describe a continuación. También se explicarán los factores intrínsecos del fosfodiéster que modifican la constante de velocidad.

La hidrólisis de los fosfodiésteres ocurre mediante una sustitución nucleofílica. Por mucho tiempo se consideró que seguía un mecanismo disociativo $\text{S}_{\text{N}}1$, sin embargo debido a que se ha encontrado que la velocidad de la reacción depende del nucleófilo y además ocurre una inversión de la configuración al término de la reacción, [53] actualmente se cree que el mecanismo es tipo $\text{S}_{\text{N}}2$. En este mecanismo de adición-eliminación, el que un nucleófilo ataca al P, que es el centro electropositivo, formando un intermediario pentacoordinado con la estructura de una bipirámide trigonal, en el que el nucleófilo y el grupo saliente se encuentran en posiciones axiales, con distancias al fósforo mayores que las ecuatoriales [5]. Finalmente el grupo saliente -preferentemente el de pK_a más bajo- es eliminado, *figura 5*. En el

caso de fosfodiésteres acíclicos, se ha propuesto que no se forma un intermediario, sino que la reacción ocurre concertadamente pasando por un estado de transición, sin embargo esto está en discusión todavía [35].

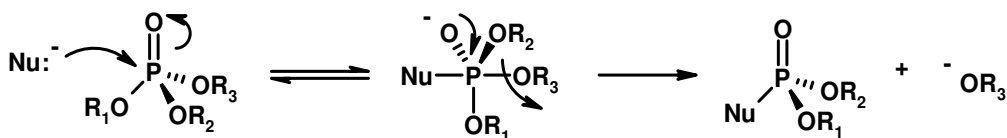


Figura 5. Mecanismo de adición eliminación en un a) fosfodiéster si $R_i = OH$, $i = 1$ ó 2 o en un b) fosfotriéster si $R_i \neq OH$, $i = 1, 2, 3$. $pK_a (R_3) < pK_a (R_2, R_1)$

La constante de velocidad k , depende principalmente del pK_a del grupo saliente y de la reactividad intrínseca del nucleófilo. La dependencia de la constante de hidrólisis con respecto a la acidez del grupo saliente en hidrólisis de diésteres del tipo $(RO)_2PO_2^-$ se puede expresar con una relación logarítmica del tipo: [59]

$$\log k = mpK_a + b \quad (2.1)$$

En donde los parámetros m y b son indicativos indirectos del tipo de mecanismo que sigue la reacción: la pendiente m se refiere a la influencia del pK_a del grupo saliente y por lo tanto que tan disociativa es la reacción, la ordenada al origen b está relacionada con la reactividad intrínseca del nucleófilo y por lo tanto en que tan concertada es la reacción. En la *tabla 2* se encuentra un ejemplo de estos parámetros para agua y OH^- como nucleófilos usando diferentes grupos salientes activados R , $R = 2,4$ -dinitrofenilo, 4-nitrofenilo, fenilo y metilo, en orden creciente de basicidad.

Tabla 2. Parámetros m y b para H_2O y OH^- en la hidrólisis de diésteres del tipo $(RO)_2PO_2^-$ [59]

Nucleófilo	m	b
H_2O	-1.06 ± 0.08	-4.59
OH^-	-0.08 ± 0.03	0.74

De estos valores se puede observar que el hidróxido es un nucleófilo más reactivo, puesto que su valor de b es mayor, y que cuando la hidrólisis se realiza a pH neutro en medio acuoso la influencia del pK_a del grupo saliente es mucho más pronunciado, de acuerdo con las pendientes.

Se puede realizar un análisis similar para relacionar la velocidad de una reacción con el tipo de nucleófilo. En general podemos decir que mientras más básico es un nucleófilo es más reactivo, sin embargo no siempre es así. Así, si se grafica el logaritmo de la constante de velocidad con respecto al pK_a de los nucleófilos, (coordenada de Brønsted) la correlación no es muy buena como se aprecia en la *figura 6*, ya que, en realidad la velocidad depende de la nucleofilia, que no siempre es proporcional a la basicidad. En este caso el significado de los parámetros m y b es contrario: la pendiente m indica que tan dependiente es la velocidad de la reacción con la basicidad del nucleófilo y la ordenada está relacionada con la influencia del pK_a del grupo saliente.

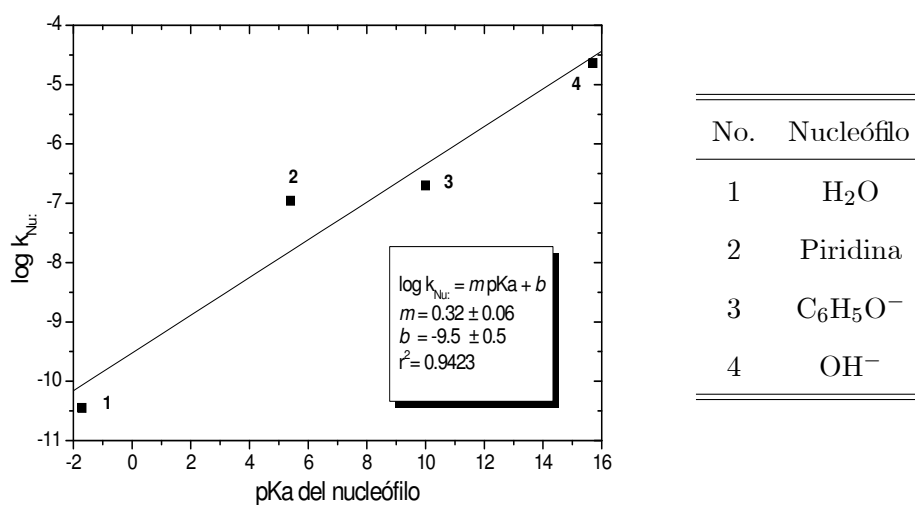


Figura 6. Gráfica de Brønsted para nucleófilos (k_{Nu} , $M^{-1}s^{-1}$ hacia la hidrólisis de PNPMP a $30^{\circ}C$)[3]

Para los diésteres fosfato no activados, es decir aquellos que no contienen grupos electroattractores como nitrofenilos o nucleófilos internos como los β -hidroxifosfatos es difícil obtener una relación del tipo de la ecuación 2.1, puesto que las reacciones son demasiado lentas (ver *tabla 1* renglón 5) y sólo se pueden hacer extrapolaciones.

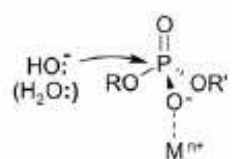
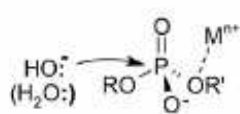
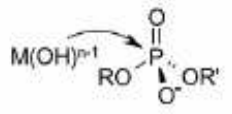
2.3. Hidrólisis catalizada de fosfodiésteres

Se pueden considerar varios tipos de catálisis [25] ácido-base, nucleofílica (inter e intramolecular) y con cationes, no obstante es común encontrar cooperación entre los tipos de catálisis, sobre todo cuando se emplean iones metálicos, que es nuestro tópico de interés.

2.3.1. Los iones metálicos como catalizadores en la hidrólisis de fosfodiésteres.

Existen varios mecanismos propuestos a través de los cuales los metales catalizan la fosfodiesterólisis, todos ellos implican la cooperación con algún tipo de catálisis ácida o básica y todos se llevan a cabo mediante un ataque de un nucleófilo ya sea o no coordinado al catión metálico, *tabla 3*.

Tabla 3. Mecanismos más comunes propuestos para la hidrólisis de ésteres fosfato [53], [68]

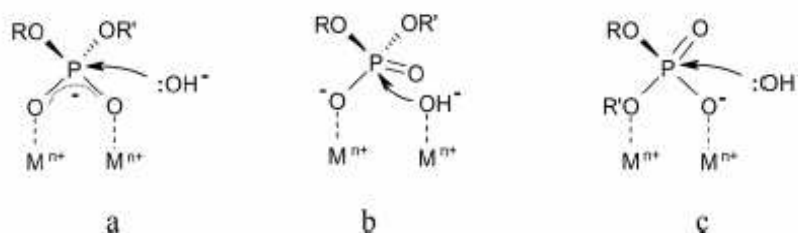
No.	Mecanismo	Descripción
1	Activación del sustrato como ácido de Lewis 	El ion metálico se une al oxígeno fosforílico de tal manera que promueve un efecto inductivo sobre la densidad electrónica del fósforo, propiciando así el ataque de un nucleófilo.
2	Activación del grupo saliente 	El ion metálico se coordina al grupo saliente de tal manera que baja su basicidad acelerando así la reacción. Ver 2.1
3	Activación del nucleófilo 	Disminuye el pK _a del ácido conjugado del nucleófilo, así, a un mismo valor de pH aumenta la concentración de nucleófilo. En sistemas acuosos se conoce como activación de agua.

No.	Mecanismo	Descripción
4	Activación nucleofílica ácida 	Es una combinación del mecanismo 1 y 3. Al mismo tiempo que el catión metálico se une al O fosforílico, aumenta la concentración del nucleófilo, propiciando el ataque de ambas maneras.
5	Catálisis básica general 	Similar al mecanismo 4, sin embargo la especie que lleva a cabo la activación es un hidróxido de metal.
6	Catálisis ácida general 	Similar al mecanismo 2, en cuanto a que se activa el grupo saliente sin embargo, la especie que realiza esto es el acuo-metal, que además está unido al oxígeno fosforílico, disminuyendo la densidad electrónica del P.

Un aspecto importante sobre los mecanismos **1-4** es que es imposible distinguirlos con cationes lábiles como lantánidos, [53] puesto que las especies se pueden encontrar en un rápido equilibrio antes de la hidrólisis [68]. Sin embargo, se han llevado a cabo estudios con complejos mononucleares y dinucleares de cationes metálicos inertes para determinar la magnitud de la aceleración producida por cada uno de los principales tipos de catálisis (**1**, **2** y **3**) [68]. Las estimaciones que resultaron de estos estudios, dan una idea de la magnitud de la catálisis. La activación del nucleófilo (**3**) es la que provoca la mayor aceleración, con un incremento de 8 órdenes de magnitud con respecto a la hidrólisis no catalizada de dimetilfosfato. La activación del grupo saliente (**2**) no se ha detectado directamente sin embargo se estima que su contribución a la catálisis podría llegar a ser hasta de 6 órdenes de magnitud. Finalmente, el efecto producido por la activación tipo ácido de Lewis (**1**), es menor, ($< 10^2$, con complejos mononucleares en hidrólisis de fosfodiésteres) sin embargo, en complejos binucleares donde hay cooperatividad se obtuvo una aceleración mayor que el cuadrado de la producida por un

sólo ion metálico ($> 10^5$).

Si las activaciones fueran aditivas, podrían llegar a producir una aceleración de hasta 16 órdenes de magnitud, comparable a la catálisis producida por enzimas. Sin embargo, en algunos casos, como en los de especies binucleares, que en muchos sistemas son las responsables de la reactividad [8], [38], [59], [67], [68], se podría esperar que la aceleración fuera más que aditiva. Los mecanismos con estas especies involucran a ambos iones metálicos, como se plantea en el *esquema 1*. El mecanismo **a** implica una doble activación tipo ácido de Lewis, en el mecanismo **b**, uno de los iones metálicos funciona como activador tipo ácido de Lewis y el otro metal lleva a cabo una activación del nucleófilo. Igualmente es factible que se lleve a cabo una activación ácida por parte de uno de los cationes metálicos conjunta con una activación del grupo saliente, realizada por el otro catión, como se muestra en **c**. Al igual que los mecanismos que involucran un sólo centro metálico, es imposible distinguir entre estos tres mecanismos cuando se usan cationes lábiles.



Esquema 1. Posibles mecanismos de catálisis de complejos dinucleares.

Existe una gran variedad de cationes metálicos que se han encontrado actúan como catalizadores en la hidrólisis de fosfodiésteres: varios iones metálicos alcalinotérreos, (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) [61] de transición, (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) [18], [60], [67], [68], lantánidos trivalentes (La^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} y Dy^{3+}) [8], [11], [38], [39], [59], [60], y cationes metálicos tetravalentes (Zr^{4+} , Ce^{4+} , Th^{4+}) [44], [30], [64].

Cada grupo de cationes metálicos tiene una química en disolución diferente y requiere de ciertas características para catalizar la hidrólisis de fosfodiésteres. Por ejemplo, los sistemas con cationes tetravalentes han exhibido las mayores reactividades encontradas en la literatura, (aceleración de hidrólisis de BNPP hasta 10 órdenes de magnitud, comparadas con la hidrólisis no catalizada) [44] sin embargo, debido a que sus valores de pK_a son muy bajos, sólo se pueden estudiar a pH ácido, es

decir, lejos de las condiciones fisiológicas, además, sus hidroxocomplejos tienden a formar oligómeros, lo que complica su química en disolución y provoca que los estudios hayan sido preferentemente cualitativos [60]. Por otro lado, para que los sistemas con cationes alcalinotérreos presenten efectos notables, deben contener disolventes apróticos como DMSO para disminuir la energía de activación del estado de transición, debido a la desestabilización de aniones [61]. Muchos cationes metálicos también necesitan la estabilización por medio de ligantes orgánicos. Este es el caso de los lantánidos, como será discutido en la sección 2.3.1.

Las ventajas más notables de usar sistemas catalíticos que contienen iones metálicos es que, como se explicó, éstos pueden tener varias maneras de actuar frente a los sustratos, es decir, sus mecanismos son variados y pueden llevar a cabo más de una función a la vez, sobre todo cuando los sistemas son diméricos. A continuación se abordará el mecanismo de acción de las enzimas, que constituyen el modelo a seguir en sistemas artificiales.

Fosfoesterólisis enzimática

Las enzimas pueden clasificarse por el tipo de reacción que catalizan. Un tipo muy importante de reacciones que catalizan son las -llamadas por los bioquímicos- reacciones de *transferencia de grupos*. Es decir, son aquellas en las que se rompen enlaces de un grupo perteneciente a una molécula y posteriormente este grupo se une a otra molécula, en otras palabras, son reacciones de sustitución nucleofílica.

En los procesos bioquímicos, las rupturas P-O generalmente se llevan a cabo mediante reacciones de transferencia de grupo, puesto que en muchos casos se transfiere un grupo fosfato de una molécula a otra, mediante el ataque nucleofílico de la especie aceptora.

Existe una gran cantidad de transferasas que catalizan reacciones en las que se rompen enlaces P-O, de hecho, ciertos autores [42] clasifican las transferencias o desplazamientos en el átomo de fósforo aparte, debido a la importancia que tienen, ya que están involucradas en todos los aspectos energéticos del metabolismo. Dentro de este grupo todavía existen otras clasificaciones dependiendo de la identidad del nucleófilo y del aceptor: cuando la transferencia es al agua, la enzimas son llamadas *fosfatasas*, cuando se transfieren de un grupo de una molécula a otro de la misma molécula son

mutasas, las que transfieren un grupo fosforilo del ATP al agua son *ATPasas* y las que transfieren el fosforilo del ATP a otro nucleófilo son las *quinasas*. Todas éstas rompen enlaces de fosfomonoésteres, no obstante, también existen transfencias en fosforilos sustituidos, que se llevan a cabo por el gran grupo de las *fosfodiesterasas*, entre las cuales se encuentran las *fosfolipasas C y D*, las *polimerasas*, las *nucleasas* y las responsables de la ruptura de AMP cíclico, también conocidas como *PDE's* [42]. También existen *fosfotriesterasas*, sin embargo nuestro interés se centra en las fosfodiesterasas puesto que son éstas las que sirven de modelo para los sistemas artificiales aquí descritos. Es importante hacer notar que una gran cantidad de enzimas dentro de todas estas clasificaciones son metaloenzimas, es decir, usan cationes metálicos -generalmente alcalinotérreos o de transición divalentes- para llevar a cabo la catálisis. Un ejemplo de estas enzimas es la hexoquinasa, partícipe en la glucólisis, que usa Mg^{2+} o Mn^{2+} , [58]. Algunas, incluso, llegan a contener hasta tres cationes metálicos en su sitio activo como es el caso de las fosfatasa alcalinas [34].

Las nucleasas son las enzimas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster que unen los polímeros de ácidos nucleicos (como ARN y ADN) transfiriendo los grupos nucleotílicos a un grupo hidroxilo del agua [15], [42]. Algunas polimerasas tienen actividad de nucleasa, tal es el caso de la Polimerasa I de ADN presente en la *Escherichia coli*. [15]

Las nucleasas pueden, a su vez clasificarse en endonucleasas y exonucleasas dependiendo del lugar en donde realizan el corte dentro del ADN o ARN. Las exonucleasas cortan los últimos fosfodiésteres de la cadena, liberando el nucleótido final (o inicial) de la cadena. Por el contrario, las endonucleasas hacen cortes en posiciones no finales de las cadenas.[15] Las llamadas *endonucleasas de restricción* tienen gran importancia en el campo de la tecnología de ADN recombinante o más comunmente llamada ingeniería genética, puesto que reconocen y cortan ADN en secuencias específicas generando fragmentos más pequeños [45]. Hay una gran cantidad de literatura al respecto [15], [42], [45], [58].

Existen dos diferentes mecanismos usados por las nucleasas para romper los enlaces fosfodiésteres del ADN o ARN. Uno de ellos es una hidrolítico, es decir el agua activada por la enzima (hidroxilo) es el nucleófilo, y el otro, usado por algunas endonucleasas de reparación de ADN, implica el rompimiento inicial de un enlace C-O y una posterior ruptura del enlace P-O. Este tipo de reacción normalmente se lleva a cabo por liasas y no necesita agua.

El mecanismo hidrolítico es el que se quiere imitar en este estudio. Las enzimas utilizan varios procesos para disminuir la energía de activación de la reacción. Se cree que usan mecanismos de catálisis ácida y básica generales, *vide supra*, sin embargo también estabilizan electrostáticamente las cargas en los intermediarios y estados de transición así como de los grupos salientes.

A continuación se describe detalladamente la estructura y mecanismo catalítico de *EcoRI*, la endonucleasa de restricción más común y conocida, aislada de la bacteria *Escherichia coli*.

Ejemplo 1 *EcoRI*

La enzima *EcoRI* es una enzima dimérica que cataliza la ruptura de ADN de doble hélice en la secuencia palindrómica de bases G↓AATTC, con una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) del orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo cual implica una aceleración de 17 órdenes de magnitud, comparando con el estimado para el ADN. (Ver *tabla 1*) Esta nucleasa necesita Mg^{2+} , ya que, si no está presente, aunque se une específicamente al ADN, no se lleva a cabo la catálisis [24].

Actualmente, se sabe que el centro catalítico de esta enzima está formado por un complejo monocatónico, en el que el magnesio, hexacoordinado, se encuentra localizado en un pequeño triángulo formado por una de las hélices del ADN y una cadena poliprotéica perteneciente a la enzima doblada, ver *figura 7*.

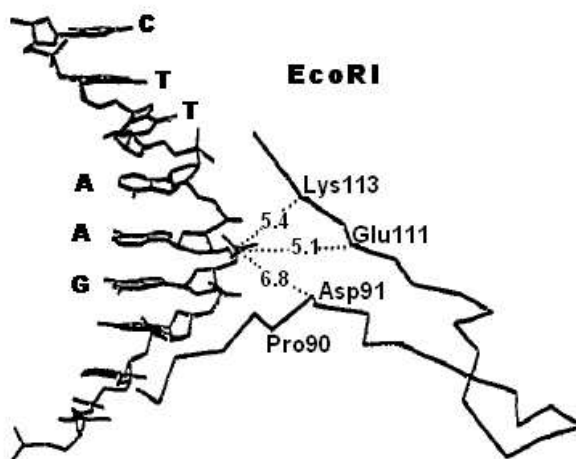


Figura 7. [24]. Sitio catalítico en el que se encuentra el Mg^{2+} , interactuando por un lado con la cadena de ADN (en esta figura, a la izquierda y para claridad, se ilustró sólo una hélice) y por otro lado con los extremos carboxilados de algunos aminoácidos.

El rompimiento ocurre con una inversión en la configuración del átomo de fósforo, y hay evidencia suficiente para creer que el nucleófilo es una molécula de agua activada por un grupo fosfato adyacente al fosfato con el enlace lábil. De acuerdo con información experimental [23], [24], se sabe que el mecanismo procede de la siguiente manera: (ver *figura 8*) una base general, X^- , que es un oxígeno perteneciente al grupo fosfato 3' sustrae nucleofílicamente un protón al agua atacante, formando así OH^- , que concertadamente ataca al átomo de fósforo con el enlace lábil. El Mg^{2+} actúa como ácido de Lewis polarizando el enlace lábil P-O y por lo tanto incrementando la electrofilia del P. Además, una segunda molécula de agua en la esfera de coordinación del magnesio estabiliza el grupo saliente, protonando al oxígeno del lado 5' al enlace lábil. Los otros dos ligandos que estabilizan al magnesio son los aminoácidos Asp91 y Glu111.

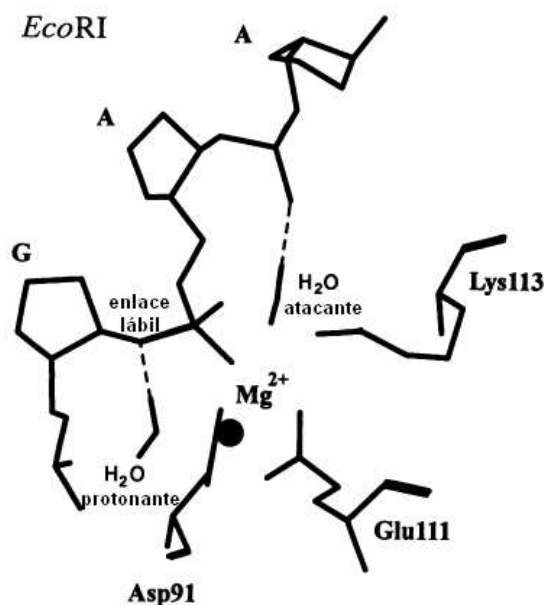


Figura 8. [23]. Modelo molecular del centro catalítico de EcoRI. Para mayor claridad sólo se ilustran los aminoácidos y el esqueleto fosfoazucarado directamente implicados en el mecanismo catalítico. La molécula de H_2O forma un puente de hidrógeno con el fosfato del grupo 3' al enlace lábil. La segunda agua de hidratación se une mediante un puente de hidrógeno al grupo saliente.

La selectividad de la enzima es tan grande que la sustitución del Mg^{2+} por Mn^{2+} provoca que la reacción sea mucho más lenta, se estima que esta desaceleración puede llegar hasta 10^6 veces. Por otro

lado, si se sustituye con Ca^{2+} o Ba^{2+} la enzima se inhibe completamente.[63]

De acuerdo con lo explicado, resulta evidente que el modelo mecanístico a seguir es el utilizado por las enzimas, debido a su gran eficiencia y selectividad, las enzimas usan todas las herramientas posibles (prácticamente todos los mecanismos explicados en el apartado 2.3.1) lo cual explica ampliamente el porqué de tan eficiente catálisis. Es difícil diseñar un sistema que imite todos los rasgos mecanísticos de las enzimas, sin embargo esa es la meta final.

Uso de sistemas catalíticos con lantánidos. Coordinación de lantánidos.

De acuerdo con las características de los centros activos enzimáticos resulta evidente que para que los sistemas artificiales sean eficientes deben contener cationes metálicos que sean capaces de coordinar nucleófilos sin disminuir demasiado su nucleofilia. Si además es posible formar especies dinucleares, el efecto se sinergiza, como se discutió en la sección 2.3.1.

En años recientes, los complejos de lantánidos han llamado la atención por su alta reactividad fosfodiesterolítica. Se ha observado que son más activos que los complejos de metales de transición por tener mayores estados de oxidación (son cationes de Lewis más ácidos) y por tener números de coordinación mayores, lo cual permite tener interacción con los sustratos y albergar mayor cantidad de nucleófilos. La flexibilidad de la esfera de coordinación de los lantánidos les permite unirse fuertemente tanto al estado basal como al de transición en la catálisis [4]. Asimismo, los complejos dinucleares, frecuentemente encontrados en sistemas con lantánidos [8], [11], [38], [39], [59], actúan con un efecto combinado como el que se describió en el *esquema 1*, teniendo así un efecto catalítico elevado.

Además, tienen mecanismos hidrolíticos que generan productos definidos a diferencia de los procesos de óxido-reducción que presentan los sistemas de complejos de Cu^{2+} y Fe^{3+} , lo cual es importante para las posibles aplicaciones en ingeniería genética [53]. De acuerdo con esto, las ventajas sobre sistemas análogos con cationes de transición son notables.

Examinemos más detenidamente las propiedades coordinativas de los lantánidos.

Los cationes trivalentes de lantánidos se comportan como ácidos duros de Lewis [53] y consecuentemente tienen preferencia de unión con aniones duros como el oxígeno. Además sus enlaces son predominantemente electrostáticos y no direccionales. Sus números de coordinación son grandes (hasta

12) y no se ha encontrado una relación entre el radio iónico y el número de coordinación, tampoco con las constantes de estabilidad con diversos aniones, como acetato, que no siguen tendencias definidas. La primera característica se explica en parte por el efecto de contracción que los lantánidos presentan, sin embargo este efecto no explica que se hayan encontrado discontinuidades en las constantes de formación con algunos aniones [53]. En estudios previos se ha explicado que este comportamiento se debe a que existen diferencias en la esfera de coordinación de los lantánidos más pesados, afectando la entropía asociada a la reacción de sustitución de moléculas de agua [19], [49].

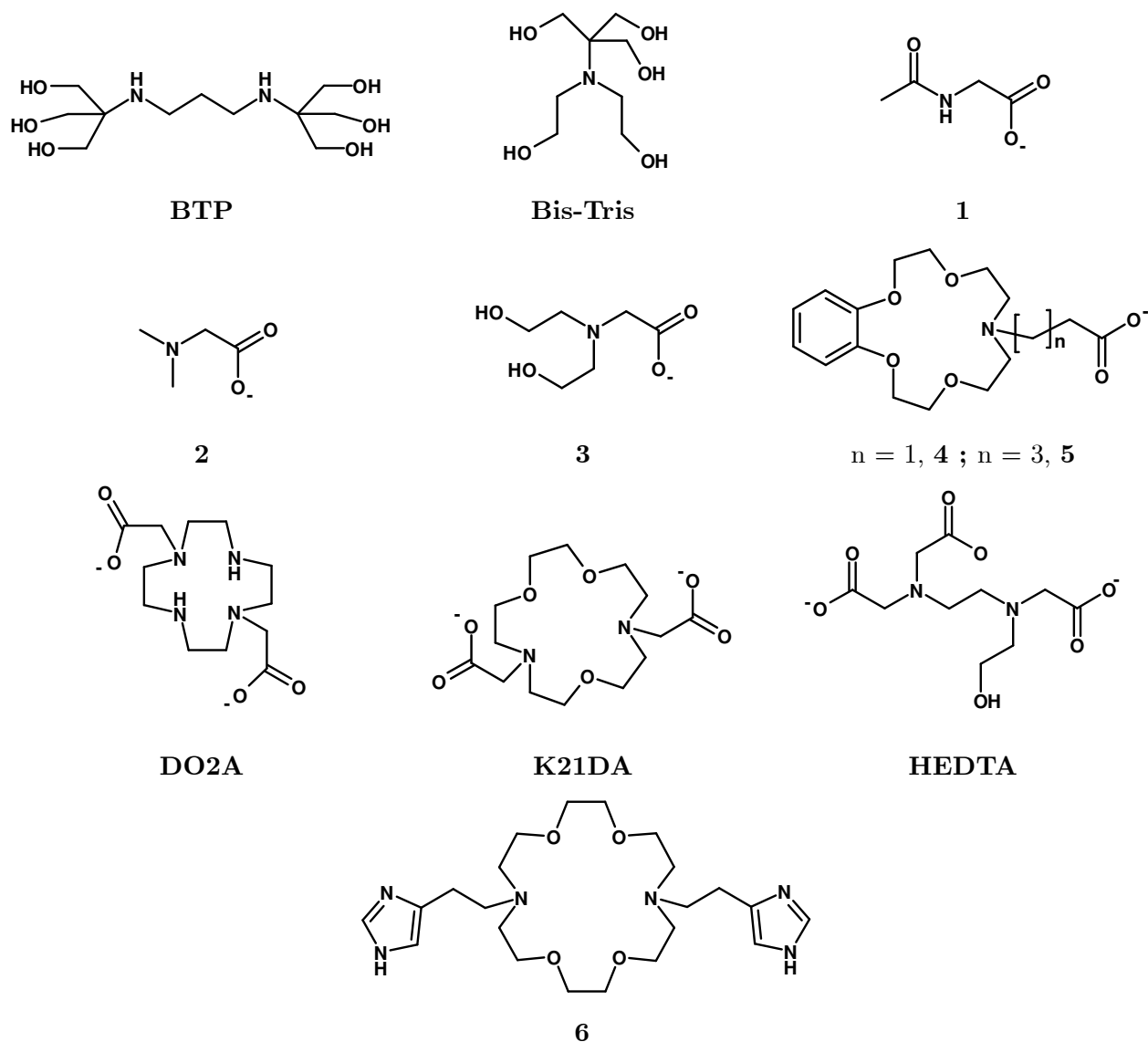
Por otro lado, la acidez de los acuaciones de lantánidos aumenta al disminuir el radio iónico, los pK_a varían de 9.33 para La a 8.17 para Lu. Consecuentemente una cantidad apreciable de hidróxidos se ha formado ya a pH 7, lo cual es indeseable siempre, ya que éstos son muy insolubles ($pK_s \simeq 10^{-20} - 10^{-22} M^{-4}$) y fácilmente coprecipitan con iones inorgánicos simples como nitrato o cloruro, que disminuyen todavía más su solubilidad [37]. A pesar de esto, hay evidencia de formación apreciable de hidroxoespecies mono y dinucleares cuando están estabilizados con ligantes orgánicos apropiados. Es evidente entonces, que la selección del ligante es de gran importancia si se quiere estabilizar suficientemente las hidroxoespecies presumiblemente activas.

Existe una gran cantidad de ligantes que se han empleado con el propósito de generar complejos suficientemente estables y activos hacia la fosfoesterólisis. Entre ellos se encuentran los polihidroxilados [16], [17], los que contienen porciones carboxiladas [8], [46], α -aminoácidos y péptidos y sus derivados [38], [28], [62], y ligantes macrocíclicos polidentados como éteres corona con diferentes sustituyentes [10], [43], [48], [51], [53]. Muchos de estos trabajos también reportan complejos con ligantes mixtos. En la *tabla 4* se condensan datos cinéticos para la ruptura de BNPP por lantánidos con diferentes ligantes mostrados en el *esquema 2*. Como los sistemas siguen diferentes leyes de velocidad y muchas veces éstas no se conocen con exactitud, se incluyeron las constantes de velocidad observadas a las condiciones dadas de concentración, temperatura y pH. También se incluyeron las constantes de formación de los complejos Ln-ligante 1:1.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la ruptura de BNPP y constantes de formación para sistemas $Ln(III)$ -ligante

Catión	Ligante y condiciones	[Ln], mM	$k_{obs,1}$, s ⁻¹	$\log \beta_{110}$	Ref.
La(III)	sin ligante, pH 7.0, 50°C	2	5.6×10^{-6}	-	[53]
Sm(III)	sin ligante, pH 7.7, 37°C	3	4.4×10^{-4}	-	[62]
Eu(III)	sin ligante, pH 7.0, 50°C	2	1.0×10^{-4}	-	[53]
Er(III)	sin ligante, pH 7.0, 50°C	2	3.2×10^{-4}	-	[53]
La(III)	BTP 20 mM, pH 9.3, 25°C	2	4.5×10^{-4}	2.3	[16]
La(III)	Bis-Tris 0.5 mM, pH 9.8, 50°C	0.5	7.3×10^{-3}	4.7	[46]
Sm(III)	Arg 90 mM, pH 8.4, 37°C	3	5.4×10^{-4}	1.0	[62]
La(III)	Gly 5 mM, pH 9.2, 25°C	1.5	3.0×10^{-3}	3.1 ± 0.1	[38]
La(III)	1 5 mM, pH 9.3, 25°C	1.5	6.0×10^{-4}	2.11 ± 0.06	[38]
La(III)	2 5 mM, pH 9.25, 25°C	1	4.3×10^{-3}	2.77 ± 0.03	[38]
La(III)	3 5 mM, pH 9.5, 25°C	5	1.1×10^{-4}	4.7 ± 0.3	[8]
Eu(III)	P5L (péptido) 0.1 mM, pH 9.0, 37°C	0.1	5.0×10^{-7}	3.85	[28]
Eu(III)	4 5 mM, pH 7.0, 50°C	5	7.9×10^{-5}	3.45 ± 0.04	[51]
Eu(III)	5 5 mM, pH 7.0, 50°C	5	1.1×10^{-3}	4.10 ± 0.04	[51]
La(III)	DO2A 1 mM, pH 9.21, 25°C	1	1.25×10^{-5}	$10.9 \pm 0.1^a)$	[10]
Eu(III)	DO2A 1 mM, pH 8.33, 25°C	1	2.2×10^{-5}	$13.0 \pm 0.1^a)$	[10]
Eu(III)	K21DA 1 mM, pH 8.5, 25°C	1	1.0×10^{-7}	$11.85^a)$	[10]
Eu(III)	6 5 mM, pH 7.0, 50°C, 7% MeOH	5	5.68×10^{-4}	$1.23^c)$	[50]
Eu(III)	HEDTA 1 mM, pH 8.43, 25°C	1	1.69×10^{-7}	$15.5 \pm 0.1^b)$	[10]
Sm(III)	18-cw-6 3mM, Arg 15mM, pH 7.0, 37°C	3	6.25×10^{-4}	$6.25^d)$	[48]

a) Tomadas de [9], b) Tomada de [70], c) En H₂O/MeOH 4:1, d) Constante β_{111} donde i = Ln(III), j = corona, k = α -aa, $\beta_{110} = 3,37$, $\beta_{101} = 1,29$



Esquema 2.

Como puede observarse en la *tabla 4*, la mayor parte de los ligandos que han sido usados para desarrollar sistemas con actividad fosfoesterolítica presentan constantes de velocidad observadas más grandes que los cationes lantánidos sin ligante, (ver las primeras 4 líneas) y aunque en la mayoría de los casos los pHs son mayores para los sistemas con ligante, es necesario recordar que sin ligante los sistemas empiezan a precipitar a valores de pH apenas por arriba de la neutralidad. Los mejores efectos de aceleración ($k_{obs,1}$ arriba de 10^{-3} s^{-1}) se lograron con sistemas con $\text{Ln} = \text{La(III)}$, sin embargo los valores de pH son grandes (arriba de 9). A valores neutros de pH, el mejor sistema es el formado

por Eu(III)-**5** no obstante, este sistema fue estudiado a 50°C. El sistema combinado Sm(III)-corona- α -aa presenta también una muy buena aceleración a 37°C. Todos estos sistemas tienen en común que sus constantes de formación para los complejos 1:1 Ln-ligante no son muy grandes. Los complejos macrocíclicos que tienen constantes de formación muy grandes, presentan constantes de velocidad muy por debajo a las que presentan los lantánidos libres (ver los sistemas Ln-corona y Ln-HEDTA). Por otro lado, si la constante de formación es muy pequeña, como el caso de Sm(III)-Arg, o La-BTP se necesita una concentración elevada de ligante, para favorecer la complejación. Ésto no siempre es deseable, por que algunos ligantes, como veremos más adelante, ejercen un efecto inhibitorio a concentraciones grandes. Las variaciones de $k_{obs,1}$ y $\log \beta_{110}$ de los sistemas La-derivado α -aa apoyan la idea de que los mejores sistemas son aquellos que tienen constantes de formación intermedias.

Otra característica importante de los ligantes es su basicidad. Se prefieren ligantes cuyo pK_a sea cercano a 7, o menor, para asegurar que a las condiciones de trabajo, éste se encuentre totalmente desprotonado y haya una concentración efectiva elevada para la complejación con el catión. Ésto también es una desventaja para los sistemas Ln- α -aa, puesto que sus valores de pK_a son mayores a 9.

El sistema Eu-P5L, a pesar de tener una constante de formación intermedia, presenta una reactividad muy baja. El problema con los péptidos relativamente grandes como P5L (12 aminoácidos) es que la orientación requerida para formar el complejo activo con el ion metálico y el sustrato puede implicar conformaciones termodinámicamente desfavorables del péptido [53]. Por otro lado si se usa un sólo aminoácido como cofactor, los resultados pueden ser mucho mejores, como es el caso del sistema combinado anteriormente mencionado.

Ahora, comparando los sistemas con α -aa, podríamos afirmar que la interacción de lantánido con una porción guanidino (de Arg) no es favorable para la complejación. Por otro lado, los sistemas Eu(III)-**4** y Eu(III)-**5** sólo difieren en la longitud de la cadena de la porción carboxílica de la corona, no obstante al aumentar de 2 a 4 metilenos, la actividad aumenta en más de 2 órdenes de magnitud. Probablemente el carboxilo interactúe con el catión, favoreciéndose la unión si la cadena aumenta. Finalmente, notamos que la introducción de porciones imidazólicas en la corona **6** resultó en un aumento pronunciado de la reactividad.

Resumiendo, tenemos entonces que el ligante a usar debe tener un pK_a cercano a 7 y debe formar

complejos Ln-ligante con constantes de formación intermedias. Además es deseable que presente al menos un carboxilo en la estructura y podría ser conveniente la presencia de un fragmento imidazólico. También sería deseable que el ligante tuviera un N en posición α de tal manera que fuera un derivado de aminoácido.

De acuerdo con estas características, se escogieron los ligantes derivados de aminoácidos mostrados en la *figura 9*, que tienen constantes de formación intermedias (alrededor de 4 para el complejo 1:1 metal-ligante) y valores de pK_a cercanos a la neutralidad (alrededor de 6.5), *vide infra*. Además si pensamos que el ligante interacciona con el catión metálico con un oxígeno y un nitrógeno adyacentes, los complejos formarían ciclos de cinco miembros, que son muy estables [2].

Así, en este trabajo se estudiaron los sistemas formados por cationes Ln (III) ($Ln = La^{3+}, Pr^{3+}, Nd^{3+}, Eu^{3+}$ y Dy^{3+}) estabilizados con éstos ligantes, caracterizando las especies responsables de la actividad catalítica y variando las condiciones de reacción (como pH, fuerza iónica, concentración y relación metal-ligante), y también se estudió el efecto inhibitor de aniones con atención especial a ésteres y fosfoésteres, ya que permiten, como se verá posteriormente esclarecer el mecanismo de reacción. Se prestó especial énfasis en el ligante 4-ICA ya que sus complejos con Ln(III) presentaron actividad fosfodiesterolítica sobresaliente.

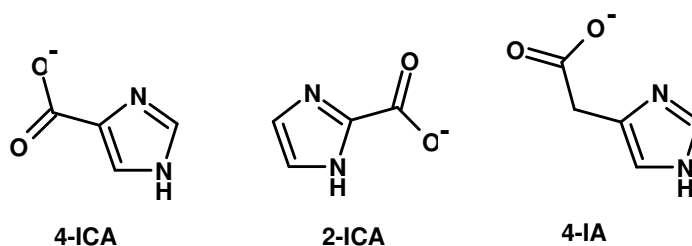


Figura 9. Ligantes usados en este trabajo. La mayor cantidad de estudios se realizaron con 4-ICA.

Debido a que este sistema se escogió considerando los resultados obtenidos anteriormente e imitando los centros activos de las enzimas, se esperaba que alguno de los sistemas presentara una actividad elevada que pudiera permitir, en principio, el diseño de una aplicación práctica.

Capítulo 3

Objetivos de la tesis

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, resulta muy conveniente, tanto para las potenciales aplicaciones en ingeniería genética como las dirigidas hacia química ambiental, el desarrollo de sistemas catalíticos eficientes para la hidrólisis de ésteres fosfato, particularmente diésteres fosfato, debido a su alta estabilidad.

3.1. Objetivo general

Estudiar la actividad catalítica de complejos de cationes de lantánidos trivalentes (La, Pr, Nd, Eu, Dy) con los ligantes 4-ICA, 2-ICA y 4-IA hacia la hidrólisis acuosa de un fosfodiéster modelo (BNPP).

3.2. Objetivos particulares

- ▷ Evaluar la actividad catalítica de los sistemas con las diferentes combinaciones de metal-ligante. Encontrar los óptimos de actividad para cada caso en función de las diferentes variables: pH, concentraciones y relaciones de concentración.
- ▷ Comparar y explicar las diferencias en actividad que pudieran presentarse entre los sistemas al variar los iones metálicos o ligantes y las demás condiciones de reacción.
- ▷ Para los sistemas que presenten actividad fosfodiesterolítica sobresaliente, correlacionar la distribu-

ción de especies en disolución, con los resultados cinéticos para identificar a la o las posibles especies activas.

- ▷ Analizar mediante estudios cinéticos y de equilibrios en disolución, el efecto de algunos aniones comunes (Cl^- , NO_3^- , ClO_4^-) y de ciertos carboxilatos y fosfoésteres (acetato, bromoacetato, difluoroacetato y dietilfosfato) en la hidrólisis de BNPP para poder esclarecer ciertos detalles mecanísticos de la catálisis.

Capítulo 4

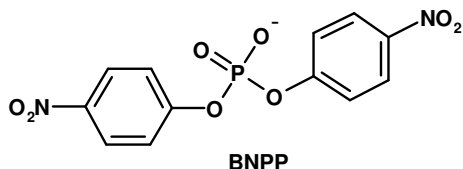
Parte experimental

En este capítulo se describen los materiales y las técnicas que se usaron para llevar a cabo la parte experimental que requirió este trabajo. En el apéndice se presenta información más vasta sobre las ecuaciones utilizadas para realizar los ajustes de los resultados cinéticos.

4.1. Reactivos

4.1.1. Sustrato

Para los experimentos cinéticos se utilizó como un sustrato modelo activado, el bis-4-nitrofenilfosfato, BNPP, *esquema 3*. La hidrólisis de este fosfodiéster es irreversible produciendo en dos pasos consecutivos el anión nitrofenolato, que puede monitorearse midiendo su absorbancia en el visible, ya que tiene un máximo de absorbancia a 400 nm. y un coeficiente de absortividad molar de $18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (Ver sección 4.5.1 y apéndice).



bis-4-nitrofenilfosfato, sal de sodio

Aldrich, 99.99 % pureza

Masa molar 362.2 g/mol , pK_a 1.04^{a}

Recristalizado de una mezcla de etanol/agua

Esquema 3. Sustrato modelo utilizado para los estudios cinéticos

^{a)} Calculado a partir del programa ACD pKa Ver. 3.00 de Advanced Chemistry Development Inc.

4.1.2. Ligantes

Los tres ligantes que se usaron y que se presentan en la *figura 9*, y en la *tabla 5*, se usaron como sales de sodio, para esto se prepararon disoluciones de concentración conocida que se neutralizaron con disolución de hidróxido de sodio valorado.

Tabla 5. Características de los ligantes usados

	Ácido 4-imidazolcarboxílico, sólido
4-ICA	Aldrich, 98 % pureza. Masa molar 112.09 g/mol, pK _a 6.23, ^{a)} 6.59 ^{b)}
	Ácido 1-H-2-imidazol carboxílico, sólido
2-ICA	Aldrich, 97 % Masa molar 112.09 g/mol, pK _a 6.59 ^{b)}
	Ácido 4-imidazol acético clorhídrico
4-IA·(HCl)	Aldrich, 98 % pureza. Masa molar 162.58 g/mol, pK _a 7.7 ^{b)}

a) Obtenido en este trabajo, ver capítulo 5.1.2.

b) Calculado a partir del programa ACD pKa Ver. 3.00 de Advanced Chemistry Development Inc.

4.1.3. Sales metálicas y otras

Se prepararon disoluciones estándar de concentración conocida de las sales que se presentan en la *tabla 6*, y en caso de ser necesario se neutralizaron con disolución de hidróxido de sodio valorado. A partir de estas disoluciones se tomaron alícuotas para hacer los experimentos.

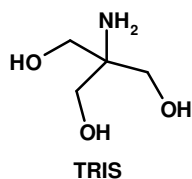
Tabla 6. Sales usadas

LnX ₃	La(ClO ₄) ₃	Perclorato de lantano, disolución al 40 %
		Aldrich, 99.9 % pureza
		Masa molar 437.26 g/mol, pK _a (acuoiion) 9.33
	Pr(ClO ₄) ₃	Perclorato de praseodimio, disolución al 40 %
		Aldrich, grado reactivo
		Masa molar 439.26 g/mol, pK _a (acuoiion) 8.82
	Nd(ClO ₄) ₃	Perclorato de neodimio, disolución al 50 %
		Strem Chemicals, 99.9 % pureza
		Masa molar 442.67 g/mol, pK _a (acuoiion) 8.70
	Nd(NO ₃) ₃	Nitrato de neodimio hexahidratado, sólido
		Strem Chemicals, 99.9 % pureza
		Masa molar 438.35 g/mol
	Eu(ClO ₄) ₃	Perclorato de europio, disolución al 50 %
		Aldrich, 99.9 % pureza
		Masa molar 450.31 g/mol, pK _a (acuoiion) 8.59
	Dy(ClO ₄) ₃	Perclorato de disprosio, disolución al 40 %
		Aldrich, grado reactivo
		Masa molar 460.85 g/mol, pK _a (acuoiion) 8.37
NaX,	NaCl	Cloruro de sodio, sólido
		Aldrich, pureza ≥ 99.0 %
		Masa molar 58.44 g/mol
	NaNO ₃ ⁻	Nitrato de sodio, sólido
		Aldrich, grado reactivo
		Masa molar 84.99 g/mol

		Perclorato de sodio, sólido
	NaClO ₄	Aldrich, pureza $\geq 98.0\%$ Masa molar 122.44 g/mol
		Acetato de sodio, sólido
	CH ₃ COONa	Técnica Química, 99.9% pureza Masa molar 82.04 g/mol, pK _a 4.75, [47]
		Ácido Bromoacético, sólido
	CH ₂ BrCOONa	Aldrich, grado reactivo, 97% pureza Masa molar 138.95 g/mol, pK _a 2.90 [22]
		Difluoroacetato de sodio, líquido
	CHF ₂ COONa	Aldrich, 98% pureza Masa molar 96.03 g/mol, pK _a 1.34 [47]
Fosfatos		Difenilfosfato de sodio, sólido 99% pureza
	DPP(Na)	Aldrich, 99% pureza Masa molar 250.19 g/mol, pK _a 1.85 [47]
		Dietilfosfato de bario, sólido
	Ba(DEP) ₂	Sintetizado, ver sección 4.4. Masa molar 443.27 g/mol, pK _a 1.39 [31]

4.2. Ácidos, bases, disolventes y buffers

Todos los experimentos cinéticos y potenciométricos se llevaron a cabo en disoluciones acuosas, para los experimentos cinéticos se usó el buffer TRIS, *esquema 4*, para fijar el pH alrededor de 8. El agua que se usó fue en todos los casos destilada y desionizada mediante el sistema Barnsted Nanopure. Para modificar el pH de las disoluciones se usaron NaOH, previamente estandarizada frente a biftalato de potasio como patrón primario; y HCl previamente valorado con la sosa estandarizada. Para las titulaciones potenciométricas, se usó como titulante metilamina previamente valorada con HCl.



Tris(hidroximetil)-aminometano, sólido

Aldrich, pureza $\geq 99.99\%$

Masa molar 121.14 g/mol, pKa 8.09 [40]

Esquema 4. Buffer utilizado para los estudios cinéticos

4.3. Equipo

Las mediciones de volúmenes se realizaron con micropipetas Pipetman Gilson con volúmenes variables. Las mediciones de pH se realizaron con dos potenciómetros digitales: para los estudios cinéticos, uno con precisión de centésimas, ORION, modelo 420-A y para los estudios potenciométricos uno con precisión de milésimas ORION, modelo 710-A. Se usó un electrodo combinado ORION Thermo ROSS para los estudios potenciométricos y uno CORNING para los estudios cinéticos, que permiten el uso de amortiguadores derivados del TRIS. Para la calibración de los electrodos se usaron amortiguadores de pH frescos, a 25°C, pH 4.00, 7.00 y 10.00 (Aldrich, precisión de ± 0.01). Durante los experimentos cinéticos como potenciométricos se mantuvo la temperatura constante mediante un baño recirculador Fischer Scientifics Isotemp 1016S ($\pm 0.1^\circ\text{C}$), verificando la temperatura con un termómetro digital Digi-Thermo ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). Las mediciones espectrofotométricas en la región del visible y del ultravioleta se realizaron con dos equipos: un Hewlett-Packard 8453 con sistema multiceldas termostatado y un UNICAM UV 500 con sistema multiceldas termostatado. Los espectros de RMN- ^1H y de ^{31}P se obtuvieron en un espectrómetro Varian Gemini 300 NMR de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química de la UNAM y los análisis elementales se realizaron en un analizador elemental FISOONS EA1108 para la determinación de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre, también de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química.

4.4. Software

Para llevar a cabo el tratamiento de los datos mediante ajustes lineales y no lineales se utilizó el programa Microcal Origin Ver. 5.1 de Microcal Software, Inc. Los valores de pK_a de los ligantes

fueron calculados para comparar con los valores experimentales, con el programa ACD pK_a Ver. 3.00 de Advanced Chemistry Development Inc. Las constantes de equilibrio fueron calculadas con el programa Hyperquad 2000 Ver. 2.1 NT. y los diagramas de especies se realizaron a partir de las constantes de equilibrio calculadas usando el programa Species Ver. 0.8 Academic Software 1999 de K.J. Powell. [1]

4.5. Síntesis y caracterización de Ba(DEP)₂

Se sintetizó dietil fosfato de bario mediante una hidrólisis básica de trietilfosfato, usando un exceso de Ba(OH)₂•8H₂O. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 48 horas y se eliminó el exceso de bario como carbonato burbujando dióxido de carbono a la disolución hasta tener un pH cercano a 7. La disolución se evaporó a sequedad para obtener la sal de bario, que posteriormente se recristalizó de una mezcla agua/etanol 1:17 como se describe en la referencia [32].

La identificación del producto de reacción se llevó a cabo con las técnicas espectroscópicas RMN de ¹H y de ³¹P y análisis elemental. Para obtener los espectros de resonancia se prepararon disoluciones del producto con 20% de D₂O en tubos de resonancia Aldrich de 5mm. Como referencia se tomó la señal de H₂O en 4.68 ppm. En las *figuras 10* y *11* se muestran los espectros obtenidos, que representan la estructura esperada del compuesto: el espectro de protón presenta sólo dos señales que concuerdan con las esperadas para los metilos y metilenos equivalentes. El espectro de ³¹P presenta sólo una señal que corresponde a la presencia de un sólo tipo de fósforo.

El análisis elemental se utilizó para confirmar la fórmula del producto y saber si éste tenía agua de hidratación. Se obtuvieron los siguientes resultados: %C: 21.48699 y %H: 4.55519; que coinciden con los esperados dentro del límite del error: %C: 21.66 y %H: 4.55

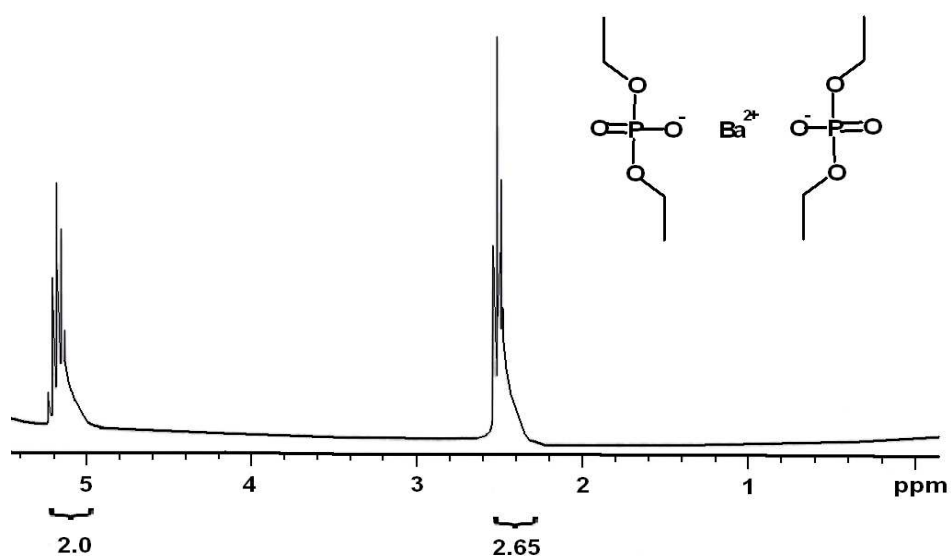


Figura 10. Espectro de RMN-¹H del producto de reacción

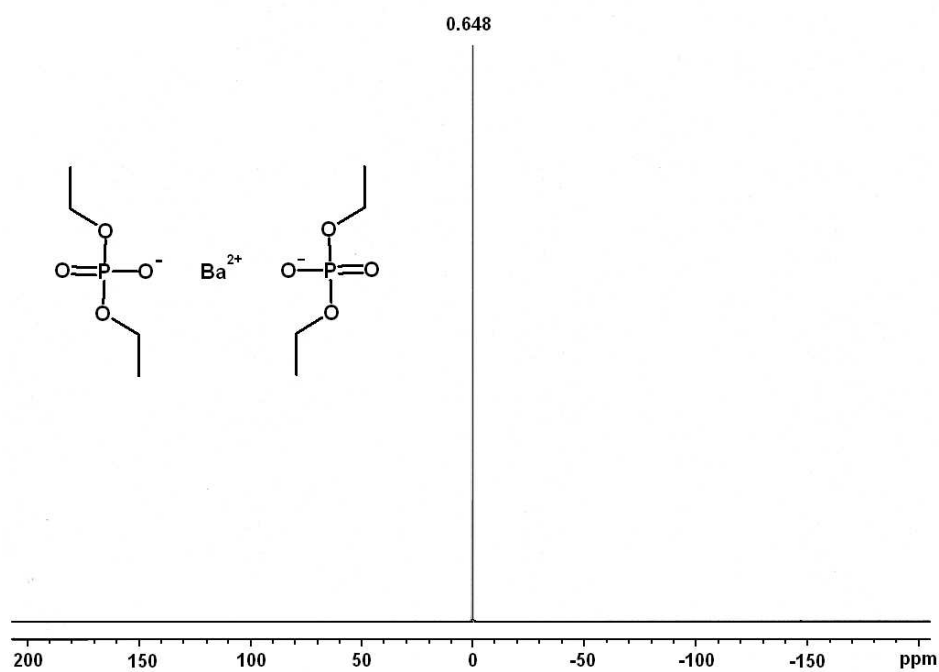


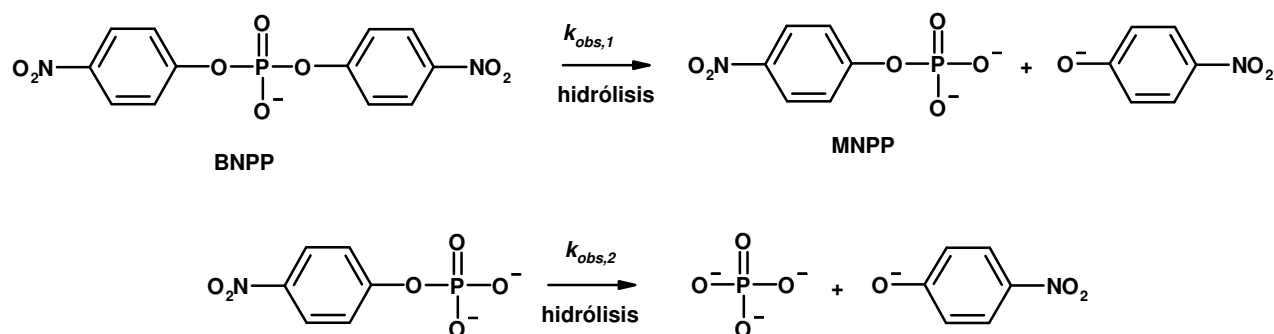
Figura 11. Espectro de RMN-³¹P del producto de reacción

4.6. Técnicas experimentales empleadas

4.6.1. Espectrofotometría y Cinética

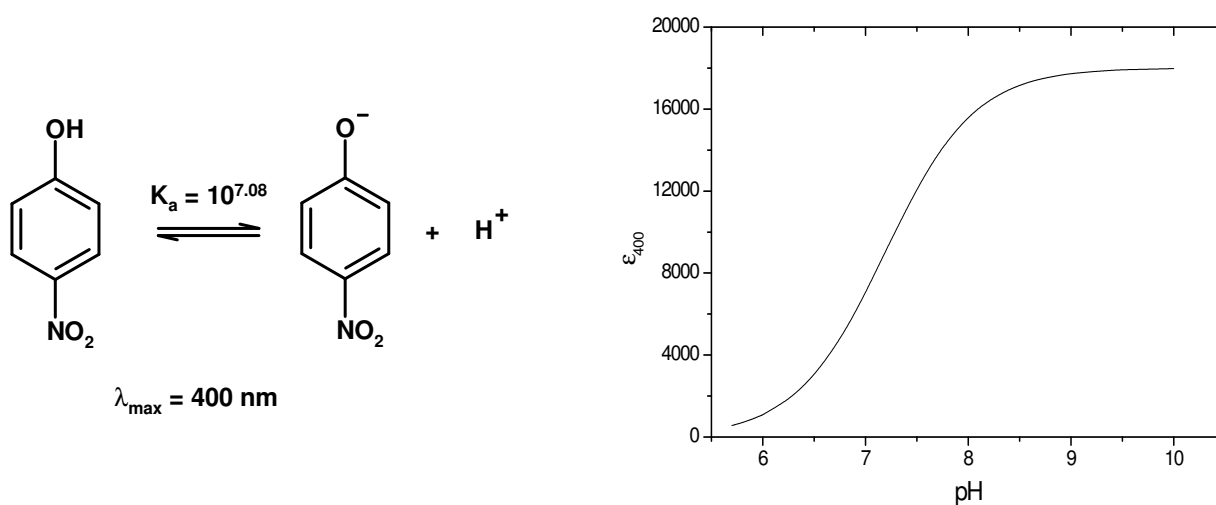
Los experimentos cinéticos se llevaron preparando las disoluciones de reacción en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, combinando las cantidades apropiadas de disoluciones frescas de ligante, Ln(III), TRIS como amortiguador de pH y HCl o NaOH para ajustar el pH, a temperatura constante ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Se midió el pH al inicio y al final de la reacción para verificar que no hubiera diferencia. Para iniciar la reacción se agregó la cantidad apropiada de disolución estándar de BNPP, tal que el volumen total del sistema fuera de 2.5 mL. De acuerdo con lo que se ha encontrado anteriormente en nuestro grupo de trabajo [60] la adición de sales (ya sea de cloruros o de percloratos) para fijar la fuerza iónica provoca un descenso pronunciado en la reactividad (ver sección 5.1.5). Además, al variar los valores de pH o la concentración del ión metálico en los intervalos de trabajo, la fuerza iónica apenas cambia un 5% del total, por eso se decidió no fijar esta variable.

Las reacciones de hidrólisis de BNPP se siguieron midiendo espectrofotométricamente la aparición del anión 4-nitrofenolato a 400 nm., ver *esquema 5*. En la *figura 12a* se muestran los espectros de absorción de la mezcla de reacción, en donde se advierte un pequeño máximo a 289 nm que disminuye con el tiempo, debido a la desaparición de BNPP y un máximo a 400 nm que aumenta al aumentar la concentración de nitrofenolato. Nótese también el punto isobéptico, que indica que hay una sola especie que se está formando.



Esquema 5

En todos los experimentos se usó la absorción molar del 4-nitrofenolato corregida por la ionización incompleta del producto, es decir parte del producto se encuentra protonado y esto cambia la absorbancia (ver apéndice). Las disoluciones de este anión son muy coloridas, así su espectrofotometría en el UV-visible es sencilla y sensible ya que permite detectar cantidades del orden de 10^{-6} M. [60]. Ver *esquema 6*.



Esquema 6. pK_a del anión 4-nitrofenolato y variación de su coeficiente de absorptividad molar de acuerdo al pH (ver apéndice).

Las curvas cinéticas obtenidas (datos de absorbancia contra tiempo) se ajustaron a un modelo de hidrólisis consecutivas en el que primeramente se libera un equivalente de 4-nitrofenolato quedando MNPP y posteriormente se libera una segunda molécula de 4-nitrofenolato y como remanente quedando fosfato, ver *esquema 5*. Al resolver las ecuaciones diferenciales que se obtienen para encontrar la concentración del 4-nitrofenolato en cualquier tiempo, se llega a la *ecuación 4.1* (ver apéndice). Para llevar a cabo los ajustes no lineales por mínimos cuadrados se empleó el programa Origin Ver. 5.1. En la *figura 12b* se muestra una gráfica de A vs t ajustado de acuerdo con la *ecuación 4.1*.

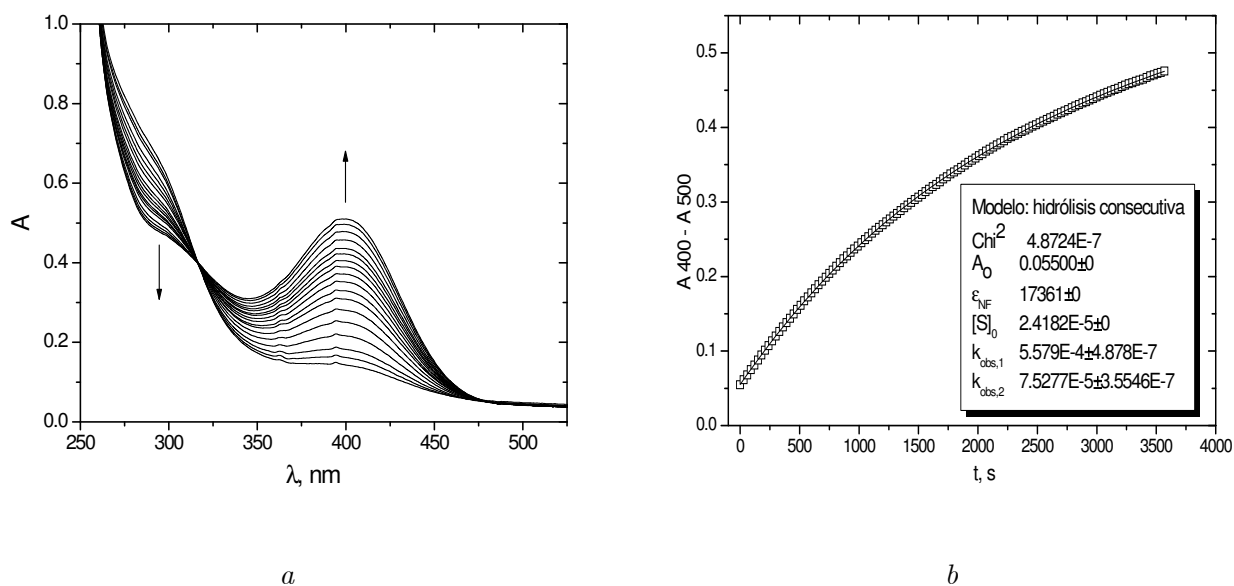


Figura 12. a. Ejemplo de espectros obtenidos a diferentes tiempos en un experimento cinético. b. Ejemplo de curva cinética a 400 nm ajustada de acuerdo con la ecuación 4.1. Los sistemas consisten en Nd(III), 4-ICA 2mM cada uno, BNPP 0.0274 mM, TRIS 100 mM, a pH = 8.65.

$$A(t) = A_0 + \varepsilon_{NF}(pH)l[BNPP]_0 \left[2 + \frac{k_{obs,1}e^{-k_{obs,2}t} + (k_{obs,1} - 2k_{obs,2})e^{-k_{obs,1}t}}{k_{obs,2} - k_{obs,1}} \right] \quad (4.1)$$

Donde $A(t)$ es la absorbancia a cualquier tiempo y A_0 es la absorbancia a $t = 0$. En principio, esta cantidad debería ser 0 sin embargo en realidad, ya pasaron algunos segundos de la reacción antes de empezar a leer y se requiere esta pequeña corrección.

ε_{NF} es el coeficiente de absortividad molar (escrito con la dependencia del pH explícitamente), l es la longitud de paso óptico, que para los experimentos cinéticos siempre fue de 1 cm.

$[BNPP]_0$ es la concentración inicial de sustrato, que siempre es mucho menor que los demás componentes tal que la velocidad de la reacción sólo depende de éste. Esta cantidad se corrigió en todos los casos considerando el error experimental de absorbancia inicial, cambiando la concentración inicial del sustrato. El factor de corrección es la cantidad $\left(1 - \frac{A_0}{A_{inf}}\right)$. Finalmente $k_{obs,1}$ y $k_{obs,2}$ son las

constantes de velocidad de la hidrólisis de BNPP y MNPP respectivamente. Las constantes empleadas en este trabajo corresponden a $k_{obs,1}$, que son las constantes de hidrólisis del fosfodiéster.

Se realizaron titulaciones espectrofotométricas en sistemas con Nd(III), aprovechando que éste presenta bandas de absorción hipersensibles y que se emplean para fines analíticos, entre 570 y 590 nm, y alrededor de 800 nm, como se aprecia en su espectro de UV-visible en la *figura 13*. Estas bandas del ion metálico han sido empleadas para estudios de su coordinación [57], [71] ver sección 5.1.3.

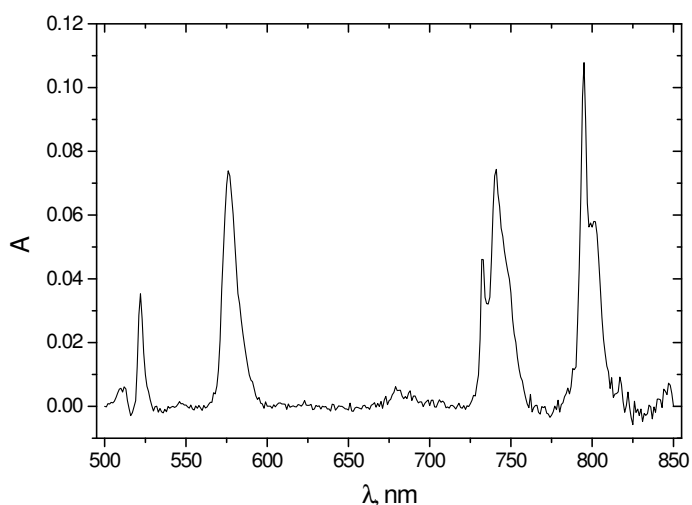


Figura 13. Espectro visible-UV de Nd(ClO₄)₃ 1mM, pH = 5.85.

En general, el coeficiente de absortividad molar para las transiciones de electrones en los orbitales f, es muy pequeño, por lo que se usaron celdas de 5 cm de paso óptico. El procedimiento experimental que se siguió para estas titulaciones consiste en preparar en la celda 10 a 15 mL de disolución, que contiene Nd(III) y ligante en concentraciones de 2 a 4 mM cada uno, TRIS 10 mM y NaCl 50 mM. El pH se varió añadiendo alícuotas de disoluciones de base o ácido. En algunos casos se varió la concentración de alguna sal, añadiendo alícuotas de una disolución estándar de dicha sal. El pH se mide antes y después de terminar la titulación. Para estos casos el equipo utilizado fue un UNICAM UV 500 con precisión de 0.1nm y software versión 3.2.

4.6.2. Potenciometría

Las titulaciones potenciométricas fueron realizadas en una celda de 75 mL, a temperatura constante ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$) y bajo presión constante de nitrógeno para evitar la presencia de CO_2 en la disolución, ya que los carbonatos de lantánidos son muy insolubles [37]. Se fijó la fuerza iónica agregando una disolución de NaCl de concentración conocida. Las mediciones de pH se realizaron con un electrodo combinado Orion ROSS 810 y un potenciómetro digital Orion modelo 710-A. El volumen inicial de las titulaciones fue de 25 mL.

El electrodo se calibró usando amortiguadores estándar, como se describió en la sección 4.2, posteriormente se calibró en términos de la concentración de protones, llevando a cabo una titulación de ácido clorhídrico de concentración conocida con hidróxido de sodio o metilamina.

Llevando a cabo un balance de masas de los componentes presentes en la disolución, se puede llegar a la ecuación general de una titulación de ácido fuerte con base fuerte: [26]

$$V = \frac{V_0(C_{H_0} - [H]f + K_w[H]^{-1})}{C_B + [H]f - K_w[H]^{-1}} \quad (4.2)$$

Donde V es el volumen de las adiciones de base B , con concentración C_B ,

V_0 es el volumen inicial de la celda (en nuestro caso, siempre 25 mL)

C_{H_0} es la concentración inicial del ácido titulado,

K_w es la constante de disociación del agua,

$[H]$ es la concentración de protones tomada directamente de las lecturas de pH (no corregida, *vide infra*) y

f es el factor de corrección, función de la temperatura, los coeficientes de actividad y el potencial de unión líquida (junction potential) [26].

Así, conociendo V , V_0 , C_B , C_{H_0} y $[H]$ es posible calcular f y K_w experimental, esto se realizó mediante un ajuste de mínimos cuadrados. La calibración del electrodo en términos de la concentración de protones es necesaria por lo siguiente: formalmente, la diferencia de potencial producida por un cambio en el pH está definida en términos de la actividad del protón, por lo tanto las constantes de formación que se determinen usando los valores de pH directamente de las mediciones potenciométri-

cas, serán constantes mixtas. Dado que las constantes de formación están definidas en términos de concentraciones, es conveniente tener valores de pH en términos de concentración, esto se logra con el factor f de acuerdo con la ecuación 4.3, donde pH' se refiere al pH tomado directamente de las titulaciones.

$$pH = pH' - \log f \quad (4.3)$$

En la *figura 14* se muestra un ejemplo de titulación con su respectivo ajuste por mínimos cuadrados de acuerdo con la ecuación 4.2. Entonces, al obtener un valor de f confiable, los valores de pH obtenidos en las titulaciones posteriores de los sistemas de interés (Ln(III) + ligante) se corrigieron de acuerdo con la ecuación 4.3. Es necesario tomar en cuenta que la fuerza iónica debe mantenerse constante adicionando un exceso de una sal inerte para evitar variaciones adicionales de la diferencia de potencial estándar que pudieran repercutir en las mediciones del pH [26].

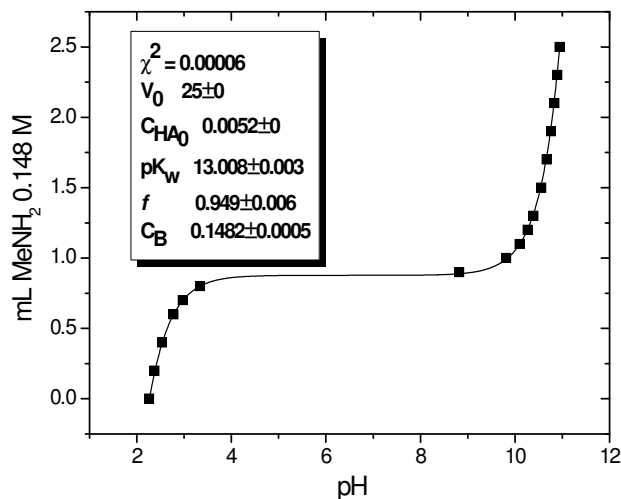


Figura 14. Ejemplo de calibración del electrodo. Para encontrarse dentro de los límites aceptables del error experimental, f debe valer entre 0.8 y 1.25. [26]

La preparación de un sistema típico a titular consiste en mezclar las cantidades adecuadas de disoluciones estándar de Ln(III), ligante, NaCl para fijar la fuerza iónica y en casos particulares alguna otra sal. Las concentraciones de ion metálico y ligante se emplearon entre 1 y 5mM; el NaCl a 50mM. Las concentraciones de las sales eventualmente agregadas variaron entre 5 a 10 mM. A la disolución termostatada, desgasificada y en atmósfera de N₂ se le adiciona pequeños volúmenes (de 5 a 100 μ L) de base, generalmente metilamina, de concentración conocida. Se siguieron las recomendaciones de la referencia [37]. Las constantes de equilibrio se determinaron con la ayuda del programa Hyperquad 2000 Ver. 2.1 NT.

Capítulo 5

Resultados y discusión

El primer paso en el análisis de los sistemas aquí presentados fue, en todos los casos, la determinación de la reactividad, o, en otras palabras la evaluación de la eficacia de los sistemas como catalizadores para la hidrólisis de BNPP. Para ésto, se estudió la reactividad de los sistemas con La(III), como representante de los lantánidos y porque en estudios anteriores ha mostrado tener la mayor reactividad. Los sistemas con los ligantes 4-ICA, 2-ICA y 4-IA presentaron constantes de velocidad observadas para la primera hidrólisis ($k_{obs,1}$) del orden de 10^{-3} s^{-1} , lo cual, comparando con estudios realizados en nuestro grupo de trabajo, los ubicaba como sistemas que merecían la pena ser estudiados con detalle. En la *tabla 7* se comparan estos resultados con los obtenidos con dos sistemas estudiados anteriormente.

De acuerdo con los datos de esta tabla, resulta claro que los sistema aquí estudiados presentan ventajas sobre los otros sistemas, ya que a concentraciones muy pequeñas la reactividad ya es muy grande, además el sistema permite trabajar con relaciones equimolares de Ln-ligante o incluso con mayor concentración de ion metálico, como se verá más adelante. Desafortunadamente, con los ligantes 2-ICA y 4-IA los sistemas son inestables a $\text{pH} > 9$, y por esto se estudiaron en menor detalle que el sistema con 4-ICA, sin embargo sus reactividades son muy altas a valores de pH menores, lo cual puede presentar ventajas.

Tabla 7. Constantes de velocidad observadas de la hidrólisis de BNPP a 25°C. **1, 2, 3** La(III), ligante 2mM cada uno, TRIS 10 mM, **4.** La(III), Bicina 5mM cada uno, **5.** La(III), BTP 2mM y 20 mM respectivamente.^{a)}

Sistema, Ln(III) = La con:	pH	$k_{obs,1}$ (s ⁻¹)
1. 4-ICA, este trabajo	9.04	8.9×10^{-4}
	9.52	2.37×10^{-3}
2. 2-ICA, este trabajo ^{b)}	8.97	1.2×10^{-3}
3. 4-IA, este trabajo ^{b)}	8.98	6.71×10^{-4}
4. Bicina, [8]	8.6	1.13×10^{-4}
	9.5	1.11×10^{-4}
5. BTP, BisTrispropano, [16]	9.0	2.0×10^{-4}
	9.3	4.4×10^{-4}
BNPP (hidrólisis no catalizada) [27]		1.1×10^{-11}

^{a)} En este caso, las disoluciones equimolares no son estables [16], ^{b)} La disolución es inestable a pH > 9.

5.1. Sistema Ln(III)- 4-ICA

5.1.1. Reactividad

Se estudió la dependencia de la constante de velocidad observada ($k_{obs,1}$) con el pH para los cinco cationes lantánidos, (La, Pr, Nd, Dy y Eu) y se encontró que este ligante estabiliza suficientemente los sistemas, tal que se puede llegar a valores de pH por arriba de 9.5 sin que las disoluciones sean inestables. En la *figura 15* se muestran los resultados de la variación de la $k_{obs,1}$ con respecto al pH.

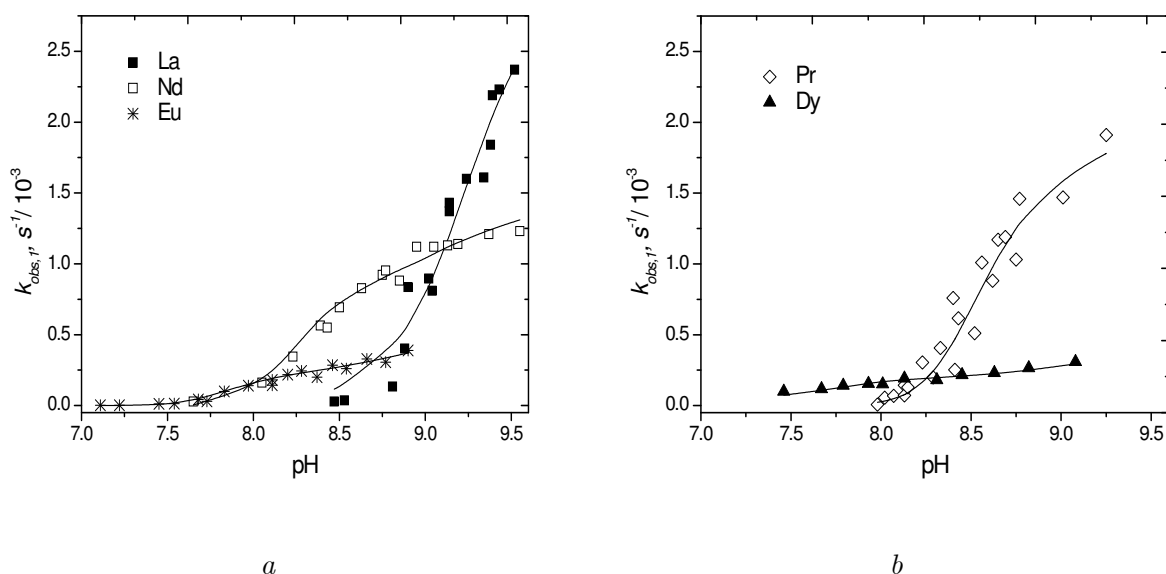


Figura 15. Gráficas de la dependencia de la constante de velocidad, $k_{obs,1}$, de a. La (III), Nd (III) y Eu (III); y b. Pr(III) y Dy (III), 2mM cada uno, en función del pH para la hidrólisis de BNPP en agua, Tris 10 mM, 4-ICA 2 mM. Las líneas son constantes de velocidad calculadas, ver apartado 5.1.2.

Primeramente puede observarse que a valores de pH mayores, se advierte un aumento en la rapidez de hidrólisis, que nos indica cualitativamente la presencia OH^- en las especies responsables de la reactividad. Al comparar estas dependencias, se encontraron importantes diferencias en la reactividad. El orden de reactividad fosfodiesterolítica observado a pH arriba de 9 es: La(III) > Pr(III) > Nd(III) > Eu(III) > Dy(III) y destaca la alta actividad catalítica de La(III)-4-ICA. Se observa que mientras más ácido es el catión, la reactividad observada es menor si se compara a valores de pH básico, es decir, la aparición de actividad catalítica se da a menores valores de pH para los cationes más ácidos y viceversa. Por otro lado, el hecho de que la máxima reactividad alcanzada sea mayor para los cationes más básicos podría parecer contradictoria, puesto que, al avanzar en la serie lantánida, los cationes tienen mayor densidad de carga y por lo tanto se esperaría que fueran mejores electrófilos y su contribución en el mecanismo catalítico fuera mayor, sin embargo es necesario caracterizar las especies en disolución para poder hacer un análisis adecuado. Este comportamiento ha sido también reportado para otros sistemas estudiados [38], [39], [16], [17], [53], [59], [60].

Equilibrios en disolución: potenciometría

Primeramente se llevó a cabo la titulación del ligante, para obtener el valor de pK_a experimental. En la *figura 16* se muestra este experimento. En la gráfica podemos apreciar la distribución de las especies protonadas y desprotonadas, mostrando en su intersección, en la cual, $pH = pK_a$, que el valor de pK_a experimental del ligante obtenido para este trabajo, 6.23. Este valor esta en acuerdo con el valor calculado.

Una vez que este valor fue determinado, se procedió a determinar la identidad de las especies presentes en disolución, para ésto se caracterizaron los equilibrios de los sistemas metal-ligante a diferentes concentraciones. No existen muchas técnicas que nos permitan realizar estudios en disolución, sin embargo entre las que se pueden usar, se encuentra la potenciometría, la conductimetría y RMN. Debido a que la técnica más sencilla y accesible, y que además provee mayor información para nuestros propósitos es la potenciometría, fue mediante titulaciones potenciométricas que se realizó este estudio. En la *figura 17* se muestran dos gráficas con titulaciones de diferentes iones metálicos a las mismas condiciones y de Nd(III) con diferente relación metal-ligante.

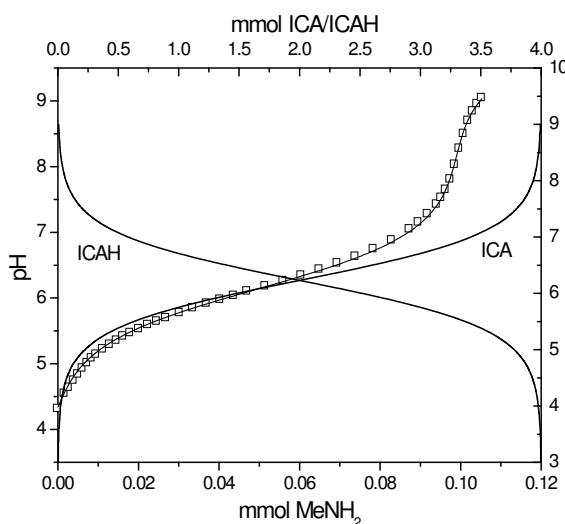


Figura 16. Titulación de 4-imidazol carboxilato (4-ICA) 4 mM, V = 25 mL, I = 0.5M. Titulante: metilamina 0.112 M. Las líneas muestran la distribución de especies mostrando el valor de pK_a encontrado.

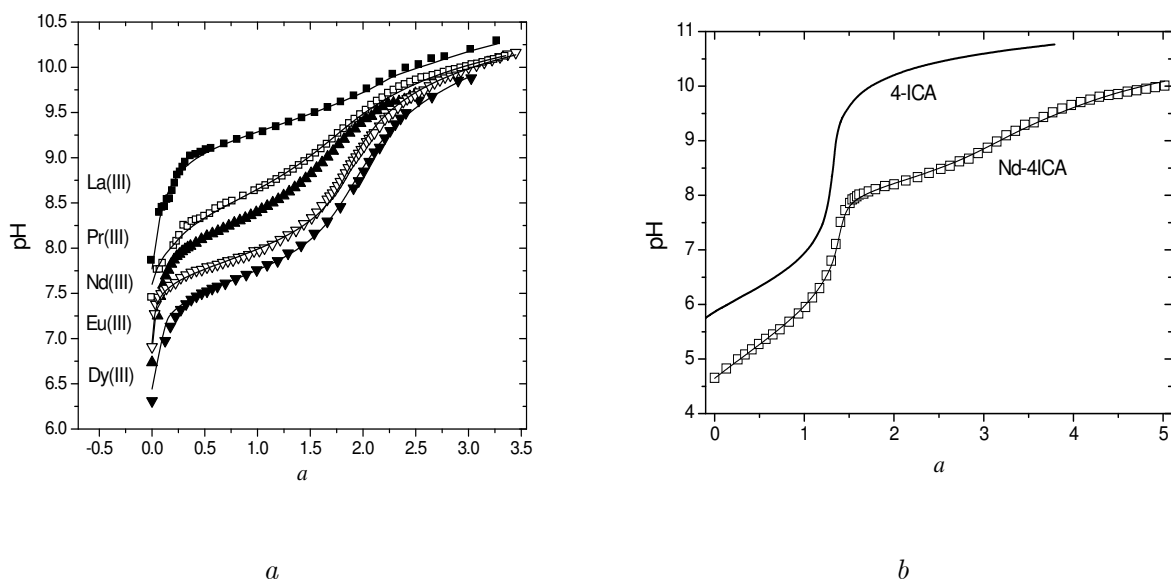


Figura 17. Titulaciones de los sistemas $Ln-4-ICA$, $I = 0.5M$. Titulante: metilamina $0.12 M$. a. Ln $2mM$, $4-ICA$ $3mM$, $V = 25mL$; b. Nd $2mM$, $4-ICA$ $4 mM$ $V = 25 mL$, a es el número de equivalentes (mol de base por mol de ion metálico). En los dos casos las líneas continuas son ajustes teóricos (vide infra).

Las diferencias en las curvas de los metales se deben por un lado a que su pK_a varía y por otro lado a que las especies que se forman son diferentes y tienen diferentes constantes de formación, lógicamente las mesetas de las curvas tienden a estar ubicadas en valores de pH próximos a sus respectivos valores de pK_a . Cualitativamente se nota que al ir de La a Dy las curvas se desplazan hacia abajo sugiriendo que los complejos formados son más estables, además aún con Dy no se observa un salto pronunciado al final de la titulación lo cual sugiere que se forman consecutivamente hidroxocomplejos de diferentes estequiometrías. En la gráfica *b* se aprecia notablemente el aumento de consumo de base al pasar de un sistema con ligante a uno con ligante y catión metálico, es decir que a una concentración fija de titulante, el pH del sistema con ligante es más alto que el pH del sistema con ligante y catión metálico. Esto nos indica cualitativamente que en el sistema con ion metálico están apareciendo especies hidroxiladas que dejan en disolución una cantidad adicional de protones para neutralizar.

Un enfoque conveniente para analizar los datos potenciométricos es graficar las funciones de Bjerrum (\bar{n}) para cada sistema como función del pH. Esta función está definida como los moles de hidróxido

unidos al ión metálico por mol de metal: $\bar{n} = ([OH^-]_T - [OH^-]) / [M]_T$ donde el subíndice T indica concentración total. La $[OH^-]_T$ es la concentración de metilamina protonada y la $[OH^-]$ es la concentración de hidróxido libre, calculadas en cada punto de acuerdo con el pK_a experimental y con las lecturas de pH corregido, respectivamente. Es útil analizar esta función, puesto que da una indicación de la estequiometría de los complejos. En la *figura 18a* se muestra las funciones de Bjerrum de acuerdo con los datos presentados en la *figura 17a* y en la *figura 18b* se muestran las funciones de Bjerrum para La, Nd y Dy a dos concentraciones diferentes.

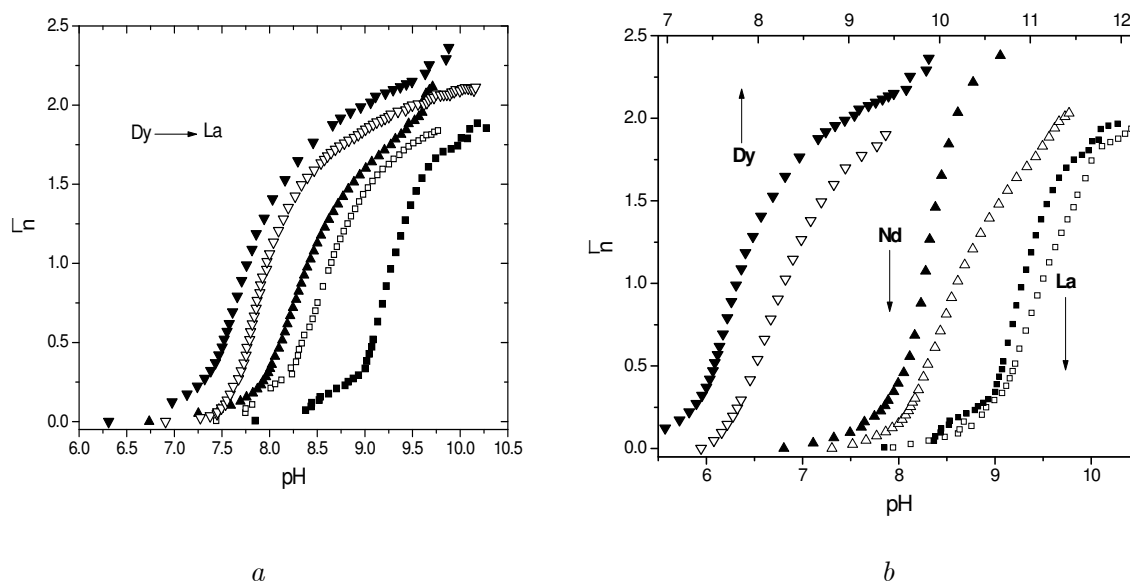


Figura 18. Funciones de Bjerrum calculadas para a. Los 5 iones metálicos en condiciones de la figura 12a: ▼ para Dy, ▽ para Eu, ▲ para Nd, □ para Pr y ■ para La; b. Sistemas con $Ln^{3+} 2mM Ln = Dy, Nd$ y La a diferentes concentraciones de 4-ICA: ▽, △, □ 6mM; ▼, ▲, ■ 3,1 y 3mM respectivamente.

Como se observa en la *figura 18a*, para La y Pr \bar{n} llega a 2, lo cual quiere decir que el hidroxocomplejo mayor tiene estequiometría $m:h = 1:2$, (metal-hidróxido) mientras que para los demás iones metálicos, se alcanzan valores más altos que oscilan en 2.5. Los valores fraccionarios indican que existen complejos binucleares con la composición mínima $m:h = 2:5$ ó $M_2(OH)_5$.

Ahora, en la *figura 18b*, se nota que el aumento en la concentración de ligante no afecta notablemente la curva de La, contrario a lo que sucede con las curvas de Nd y Dy, que se desplazan pronunciadamente hacia valores menores de \bar{n} , llegando, al final de la titulación al valor de 2. El

primer caso indica que, o existe sólo un hidroxocomplejo o varios con la misma relación $m:l$ (metal-ligante) probablemente pequeña. El caso de los demás iones metálicos indica otramente que existe competencia entre el ligante y los hidróxidos por el metal de tal manera que a relaciones mayores de $m:l$ se favorecen los complejos con mayor cantidad de hidróxidos, así al disminuir esta relación el hidroxocomplejo más alto tiene estequiometría $m:l = 1:2$.

Siguiendo estas conclusiones, se propuso para lantano un modelo con un solo hidroxocomplejo con $mlh = 112$. El ajuste de este modelo se muestra en la línea punteada de la *figura 19*, que pasa muy cerca de los puntos experimentales, sin embargo a valores pequeños de a y a pHs altos, el ajuste no es muy bueno puesto que el modelo pasa por arriba de los puntos experimentales; esto quiere decir que existe algún otro hidroxocomplejo con una relación $i:k$ más pequeña. Entonces se incluyó el complejo $mlh = 111$: éste mejoró notablemente la calidad del ajuste (línea sólida). Ahora, como se sabe que los hidroxocomplejos de lantánidos tienden a agregarse en disolución, no sería raro pensar en la existencia de los complejos con $mlh = 222$ y 224 . La inclusión del primer complejo empeoró el ajuste, sin embargo la combinación de los complejos 111 y 224 fue el mejor ajuste en términos estadísticos. (Ver apéndice)

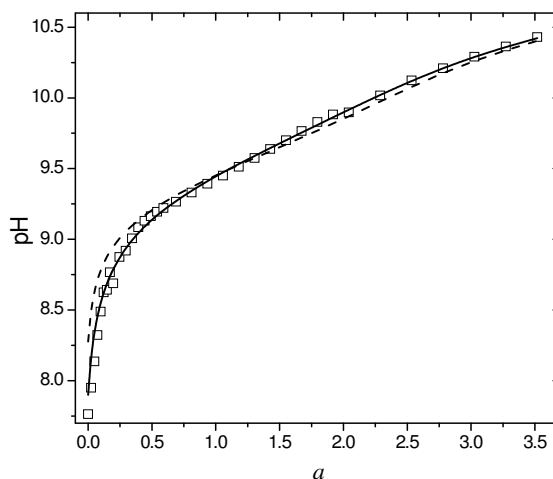


Figura 19. Curva de titulación de una mezcla de La(III) 2mM y 4-ICA 6mM. La línea punteada es el ajuste con el modelo que incluye únicamente la especie con $mlh = 112$; la línea sólida incluye también el complejo 111.

Con Pr se intentó usar el mismo modelo, sin embargo los ajustes no fueron satisfactorios. (ver la

línea punteada de la *figura 20*) Las desviaciones son por exceso y defecto a valores de a intermedias. Esto puede indicar que existe un hidroxocomplejo con estequiometría intermedia, por ejemplo $m:h = 2:3$. Se incluyeron entonces sucesivamente complejos con ésta estequiometría y $l = 2,3$ y 4. Los mejores parámetros estadísticos se obtuvieron con la inclusión del complejo $mlh = 233$ (línea sólida).

Para los demás cationes, el procedimiento fue diferente. El análisis de las funciones de Bjerrum sugirieron la existencia del hidroxocomplejo más alto con estequiometría $m:h = 2:5$. Las titulaciones con concentraciones pequeñas de ligante fueron ajustadas incluyendo complejos con esta estequiometría y $l = 1,2$. Posteriormente se realizaron los ajustes para las curvas con concentraciones mayores de ligante; para los tres cationes se encontró que las especies que mejoraban el ajuste son las encontradas para Pr: $mlh = 233$ y 224. La inclusión de hidroxocomplejos menores no mejoró los ajustes.

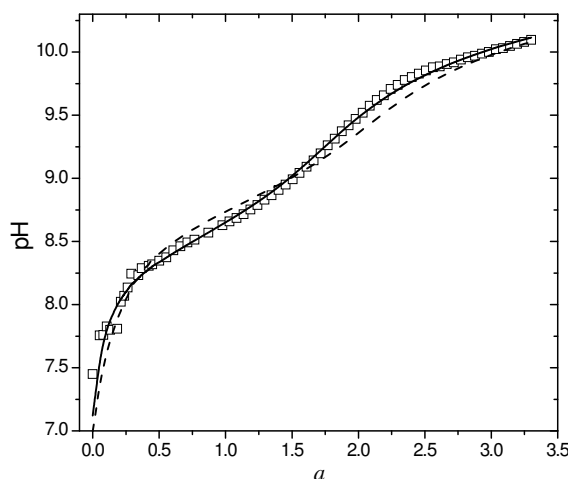


Figura 20. Curva de titulación de una mezcla de Pr(III) 2mM y 4-ICA 3mM. La línea punteada es el ajuste con el modelo que incluye las especies con $mlh = 111$ y 224; la línea sólida incluye además el complejo 233.

En la *figura 21a* y *21b* se ilustra el procedimiento seguido para la obtención del modelo del sistema con Eu(III). La titulación del sistema con Eu 3mM y 4-ICA 2mM se ajustó con modelos que incluyen las especies $mlh = 215$, 225 y 214. El único ajuste que se acerca a la curva experimental es el que incluye el complejo 215. Ahora, se ajustó una segunda curva de titulación con condiciones inversas: Eu 2mM y 4-ICA 3mM. Si sólo se incluye el complejo 215 el ajuste es malo (línea punteada en la

figura 21b) y pasa por abajo de los puntos experimentales. Esto indica que existen otras especies que consumen menor cantidad de hidróxido y que son predominantes en estas condiciones, por lo tanto, se incluyó el complejo con $mlh = 112$, cuya curva sigue mucho mejor los puntos experimentales, pero pasa por debajo en algunas zonas (línea de puntos pequeños). Entonces se pensó que era probable que el dímero de éste pudiera estar contribuyendo. Efectivamente el ajuste que incluye las dos especies dinucleares es mucho mejor (línea sólida). También se incluyó la especie intermedia con $mlh = 233$ que, aunque no mejoró el aspecto del ajuste con respecto a los puntos experimentales, si presenta mejores parámetros estadísticos, ver apéndice.

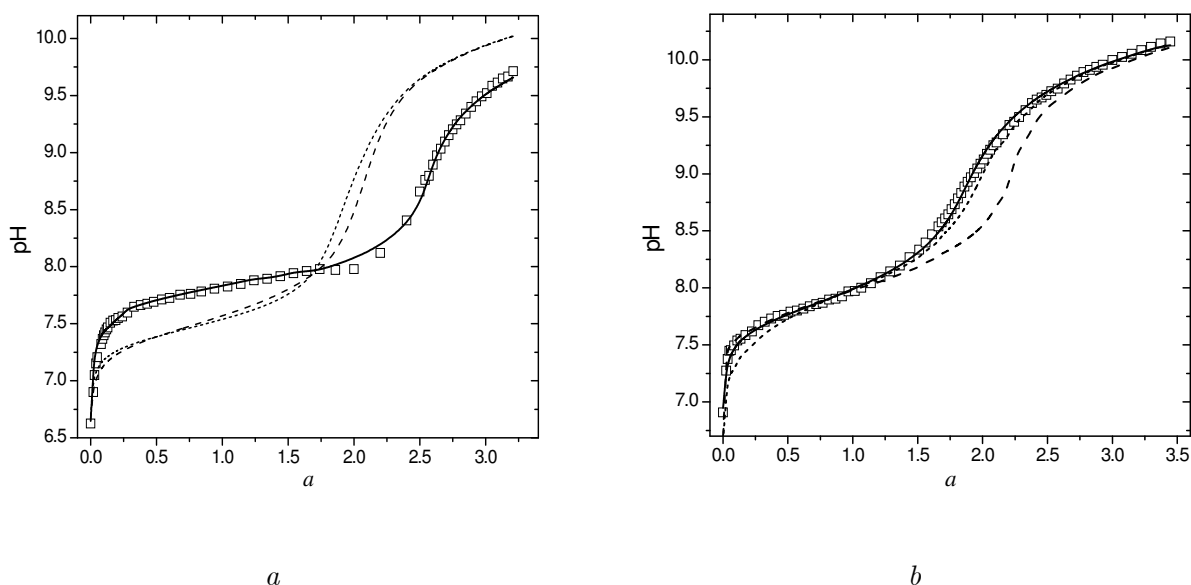


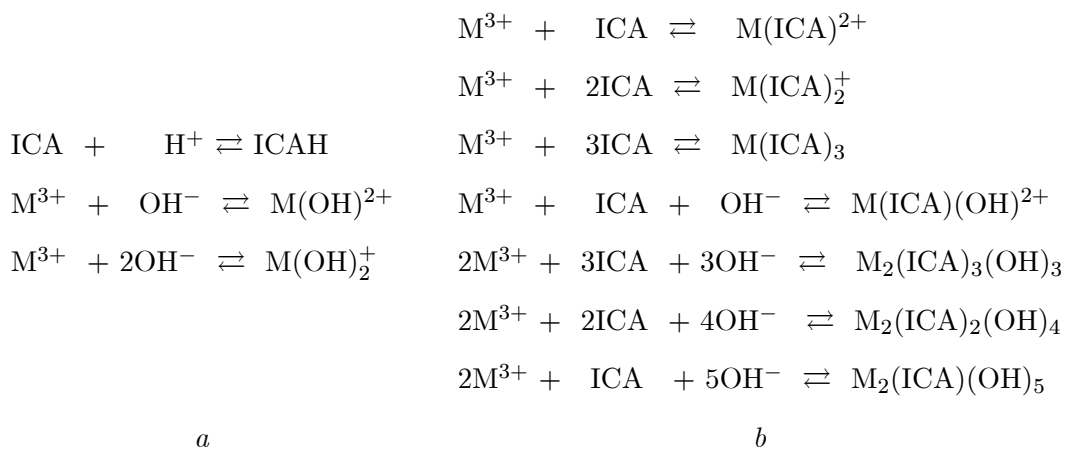
Figura 21. Ejemplo de ajustes con dos sistemas de *Eu-4ICA*. a. *Eu(III)* 3mM y *4-ICA* 2mM; la línea punteada larga (-) corresponde al ajuste con la especie con $mlh = 225$ y la línea punteada corta (-) corresponde al ajuste con la especie 214. La línea sólida corresponde al ajuste con la especie 215. b. *Eu(III)* 2mM y *4-ICA* 3mM; la línea punteada larga (-) corresponde al ajuste únicamente con la especie con $mlh = 215$ y la línea punteada corta (-) corresponde al ajuste con la especie 112. La línea sólida corresponde al ajuste con las especies 215 y 224.

Entonces resumiendo, se propusieron modelos que incluyeran la existencia de hidroxocomplejos con estequiometrías congruentes con los resultados de los análisis de las funciones de Bjerrum y que pudieran describir lo mejor posible el comportamiento de las titulaciones con varias relaciones met-

al:ligante. Se incluyeron, con constantes fijas, los equilibrios de disociación del agua, del ligante y de dos hidróxidos simples de Ln, reportados en la literatura, [65] *esquema 7a* y se probó la existencia de diferentes especies hidroxiladas, ajustando al menos tres curvas de titulación con cada catión metálico en diferente proporción con respecto al ligante. Se encontró que el modelo de equilibrios que mejor se ajustó a la totalidad de los datos experimentales es el comprendido por el *esquema 6a* y el *esquema 7b*.

En la *tabla 8* se muestran las constantes de formación de los complejos, propuestas de acuerdo con los datos experimentales y usadas para calcular los valores de pH teóricos y así obtener los ajustes que se muestran como líneas continuas en la *figura 15*.

Llama la atención que la totalidad de los complejos dinucleares, que posiblemente sean los responsables de la reactividad, son todos neutros, sin embargo anteriormente en nuestro grupo de trabajo se observó la misma tendencia de actividad en complejos neutros de lantánidos con ligantes tipo amino alcohol (aunque mucho menos reactivos) [17], [16] y con sistemas con Ce, en los que las especies activas son oxo e hidroxoespecies cercanamente neutras [36].



Esquema 7. a)

a) Se obvió el equilibrio del agua. $4-ICA = ICA$

Tabla 8. Logaritmos de las constantes de formación globales de los complejos de Ln (III) Ln = La, Pr, Nd, Eu y Dy con 4-ICA a 25°C, I = 0.5M.^{a) b)}

Especie	Log β_{mlh}	La	Pr	Nd	Eu	Dy
M(ICA) ²⁺	β_{110}	3.84±0.09	4.20±0.06	4.22±0.05	4.4±0.1	4.46±0.02
M(ICA) ₂ ⁺	β_{120}	7.10±0.02	7.62±0.06	7.72±0.08	8.00±0.02	8.08±0.01
M(ICA) ₃	β_{130}		10.7	10.38±0.02	10.5±0.6	10.8
M(ICA)(OH) ²⁺	β_{111}	8.9±0.3	9.4±0.4			
M ₂ (ICA) ₃ (OH) ₃	β_{233}		31.0±0.1	32.2±0.3	34.1±0.6	34.5±0.1
M ₂ (ICA) ₂ (OH) ₄	β_{224}	30.3±0.1	33.6±0.2	34.2±0.2	36.9±0.4	36.7±0.2
M ₂ (ICA)(OH) ₅	β_{215}			36.6±0.3	38.5±0.3	38.2±0.1

^{a)}Las constantes son los valores promedio de al menos tres titulaciones de catión metálico y ligante a diferentes concentraciones. ^{b)}Las constantes de formación de los hidroxocomplejos fueron convertidas de los valores originales arrojados por el programa, ver apéndice.

De la tabla podemos observar, que como se ha reportado [49] las constantes de formación de los complejos aumentan al avanzar en la serie lantánida. Esto se debe a las características termodinámicas de la coordinación: considerando que las reacciones transcurren mediante el desplazamiento de moléculas de agua de coordinación, el ΔS asociado a la reacción es favorable debido a que el número de productos es mayor que el de reactivos, además, este efecto es más pronunciado para los lantánidos más pesados puesto que en éstos la coordinación con agua es más fuerte y por lo tanto el desorden causado es mayor [19].

Ahora, con los datos de las constantes de formación de las especies en disolución se pueden obtener los diagramas de distribución de especies usando el programa Species, como se indicó anteriormente. El intervalo de valores de pH de interés es aquél en el que encontramos reactividad fosfodiesterolítica de los sistemas, es decir para este caso, burdamente de 7.5 a 9.8. Con ésto podemos sobreponer los datos y atribuir la reactividad a alguna(s) de las especies activa(s), como se verá en la sección 5.1.4. En la *figura 22* se muestra la distribución de especies de las hidroxoespecies y del catión metálico libre para el sistema con Nd(III) a dos relaciones diferentes de Nd-4ICA

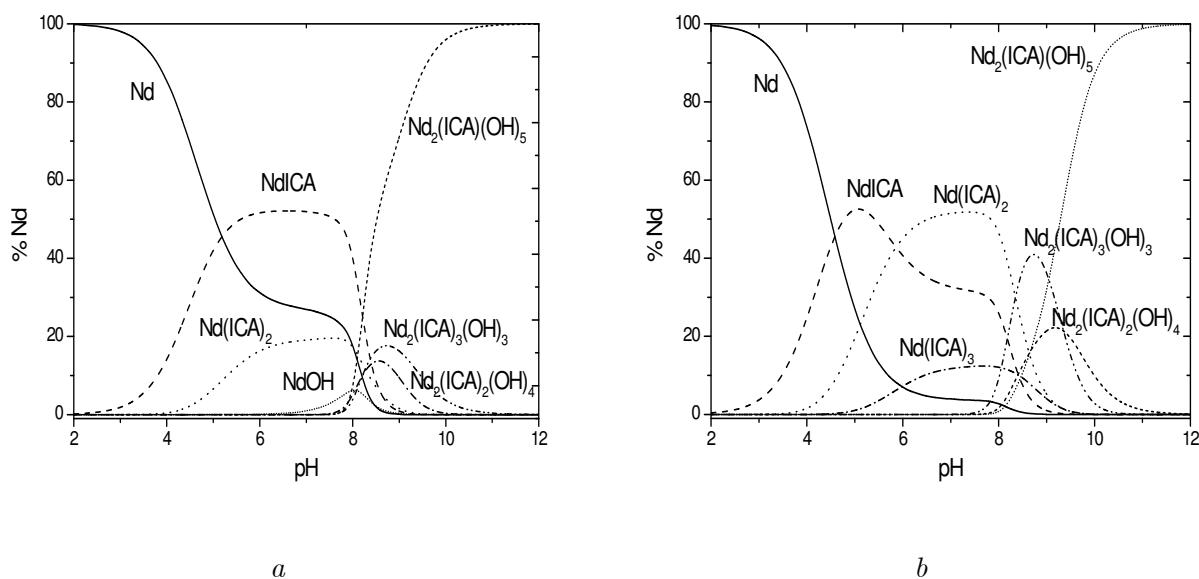


Figura 22. Distribución de especies en función de la concentración de Nd(III) a. Nd(III), 4-ICA 2mM cada uno y b. Nd(III) 2mM, 4-ICA 4mM.

Se observa claramente que la distribución de especies depende ampliamente de la relación de concentraciones. Así entonces, en la gráfica *a*, a pH's entre 5 y 8, la proporción de la especie con $mlh = 110$ predomina sobre las de $mlh = 120$ o $mlh = 130$, que ni si quiera es significativa, a diferencia de la gráfica *b*, en donde a estos pH's la proporción de ion metálico libre y del complejo con $mlh = 110$ disminuye a expensas de la formación de los otros dos. Igualmente observamos, como ya se había supuesto inicialmente (ver la sección 5.1.1) que la proporción de hidroxoespecies aumenta al aumentar el pH, sin embargo el pH en el que empiezan a ser significativos depende una vez más de la relación metal-ligante, vemos que en la gráfica *a*, a $pH = 9$ el porcentaje de la especie con $mlh = 215$ es de aproximadamente 70%, mientras que en la gráfica *b*, a este mismo pH apenas hay cerca de 30%, es decir la aparición de esta especie se ha retrasado al aumentar la proporción de ligante. Igualmente vemos que la tasa de cambio de los complejos dinucleares es mucho mayor, es decir rápidamente su concentración aumenta o disminuye, lo cual indica, reafirmando lo observado en los experimentos cinéticos, que la reactividad, atribuida a hidroxoespecies dinucleares, depende fuertemente del pH. Con estas gráficas se demuestra que al aumentar la proporción de un componente del sistema, no solo aumenta el porcentaje de las especies con mayor cantidad de este componente, sino que el rango de

pH en el que su proporción es apreciable aumenta.

5.1.2. Estudios espectrofotométricos

El espectro de absorción de los lantánidos se debe a transiciones $4f \rightarrow 4f^*$ que son prohibidas de acuerdo con las reglas de selección de Laporte, por eso las señales son finas y de baja intensidad, y sus coeficientes de absortividad molar pequeños (menores a $50 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [59] además, estas señales son prácticamente insensibles al medio que las rodea. Pese a esto, Nd(III) presenta bandas hipersensibles entre 570 y 590 nm, asociadas a la transición casi degenerada $^4I_{9/2} \rightarrow ^4G_{5/2}, ^2G_{7/2}$ [57], [71]. La hipersensitividad de la banda correlaciona con la polarizabilidad dipolar eléctrica del ligante, por lo tanto, la intensidad total (integrada) llamada fuerza oscilatoria, la distribución de intensidad y el baricentro de energía de estas bandas se modifican notablemente en la coordinación [57].

La fuerza oscilatoria fue definida aquí mediante la expresión de la ecuación 5.1, evaluando la integral en la región de interés. Las fuerzas oscilatorias diferenciales se definen mediante la expresión de la ecuación 5.2. [57] y fueron determinadas directamente del espectro diferencial $\Delta\varepsilon(\lambda)$ vs λ , tomando como límites siempre $\lambda_1 = 560 \text{ nm}$ y $\lambda_2 = 610 \text{ nm}$ donde ε el coeficiente de absortividad molar.

La sustitución de moléculas de agua coordinada por átomos donadores produce un incremento en f . El grupo carboxilato produce el efecto más pequeño y los grupos con nitrógeno producen los cambios más grandes, mientras que los hidroxilos producen efectos intermedios. Además aunque no se ha probado, se ha sugerido que f debe ser proporcional al número de átomos donadores [57], [71].

$$f = 4.32 \times 10^{-9} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varepsilon(\lambda) d\lambda \quad (5.1)$$

$$\Delta f = f(\text{complejo}) - f(\text{Nd}(\text{NO}_3)_3, (\text{ac})) = 4.32 \times 10^{-9} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Delta\varepsilon(\lambda) d\lambda \quad (5.2)$$

En la *figura 23a* se muestran los espectros de absorción de Nd(III) en ausencia (pH = 3) y presencia de 4-ICA en exceso y en la *figura 23b* se muestra el espectro diferencial de ε a las mismas condiciones.

El espectro de Nd(III) en ausencia de ligante se usó como “blanco” para calcular los espectros diferenciales. Notamos que al aumentar el pH, la intensidad de la señal aumenta progresivamente, indicando la mayor complejación a pHs altos y como se observa en la *figura 23b* también existe un desplazamiento del baricentro de la transición "hacia el rojo", es decir, que las señales disminuyen a las longitudes de onda más pequeñas de la banda y aumentan a las longitudes de onda más grandes. Estas dos características se han encontrado anteriormente en sistemas de Nd con ligantes orgánicos, [39], [8], [57], [71].

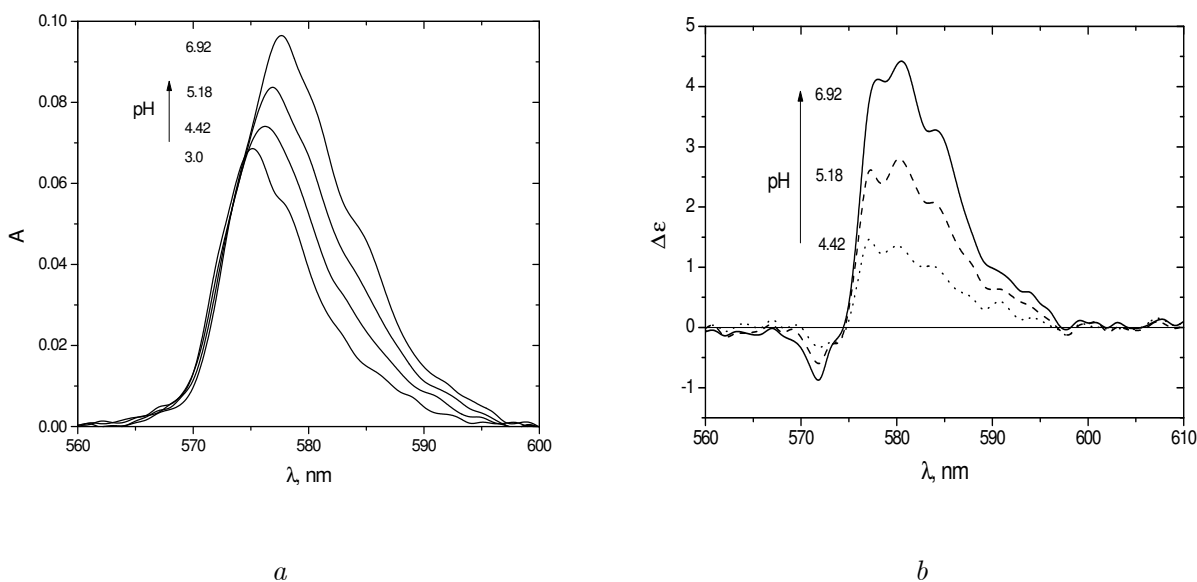


Figura 23.a. Espectros de absorción de Nd(III) 2mM en presencia de 4-ICA 4mM en la región hipersensitiva a pH's menores a 7. b. Variación de $\Delta\epsilon$ a diferentes pH's para el mismo sistema. El espectro de Nd(III) en ausencia de ligante se usó como “blanco” para calcular los espectros diferenciales.

Cuando el pH es todavía mayor, *figura 24a*, se advierten cambios notables en el espectro de Nd: la intensidad disminuye, ya que los ligantes empiezan a ser desplazados por hidroxilos, además también se advierte que inicialmente las curvas por arriba de pH 7 tienen un punto isobéptico a 581 nm, que se deja de observar a pH por arriba de 8.5. Esto está en acuerdo con la formación consecutiva de hidroxocomplejos de diferente composición.

Ahora, asumiendo que las principales contribuciones a los cambios observados en los espectros son las provocadas por la presencia del ligante heterocíclico con átomos de nitrógeno donadores y por la presencia del hidróxido, se correlacionó la fuerza oscilatoria diferencial con el número promedio de átomos de ligante (\bar{n}_L) y de hidróxido (\bar{n}_{OH}) unidos al Nd, por mol de Nd, es decir con las funciones de Bjerrum asociadas, y se observó (*figura 25*) que hay una buena correlación entre Δf y \bar{n}_L hasta aproximadamente $\text{pH} = 7.5$, como se muestra en la gráfica insertada de la *figura 25*, que es cuando, de acuerdo con los experimentos potenciométricos, empiezan a aparecer los hidroxocomplejos. De la pendiente de la regresión lineal se puede estimar que cada átomo de nitrógeno contribuye en un 37% a la fuerza oscilatoria del sistema. Si se lleva a cabo una regresión multiparamétrica, obtenemos, de los parámetros, que el efecto del hidróxido es menor a la mitad del ocasionado por el ligante.

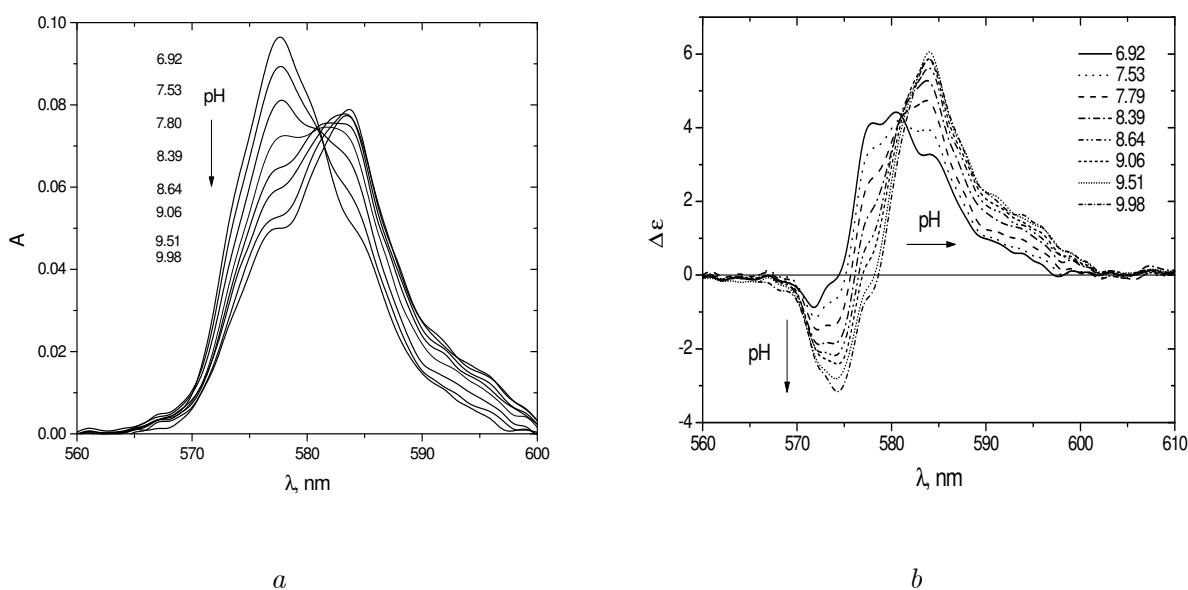


Figura 24.a. Espectros de absorción de Nd(III) 2mM en presencia de 4-ICA 4mM en la región hipersensitiva a pH's mayores a 7. b. Variación de $\Delta \epsilon$ a diferentes pH's para el mismo sistema. El espectro de Nd(III) en ausencia de ligante se usó como "blanco" para calcular los espectros diferenciales.

Además, si se toma la longitud de onda de mayor cambio y se grafica con respecto al pH, notamos igualmente (*figura 26*) que hay correlación con la distribución de especies de los complejos con *mlh*

= 110, 120 y 130, ya que son éstos los que al aumentar y disminuir su concentración, modifican el espectro de Nd(III)

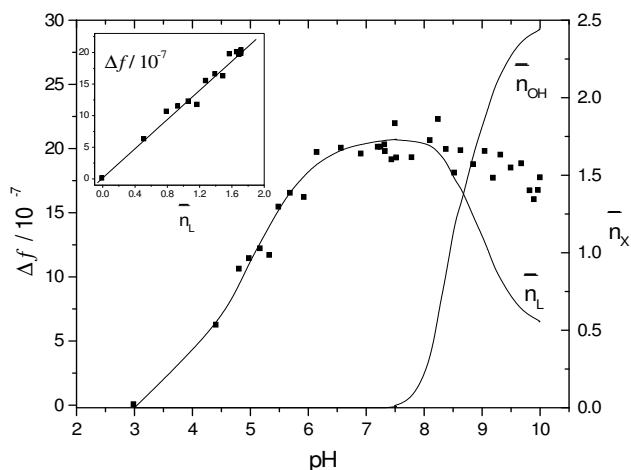


Figura 25. Variación de la fuerza oscilatoria diferencial con respecto al pH para el sistema descrito en las figuras 18 y 19. Las líneas sólidas son las funciones de Bjerrum \bar{n}_L y \bar{n}_{OH} del ligante 4-ICA y de los hidróxidos respectivamente, ver el texto. Δf se calculó para cada conjunto de datos de acuerdo con la ecuación 5.2 tomando como límites 560 a 610 nm.

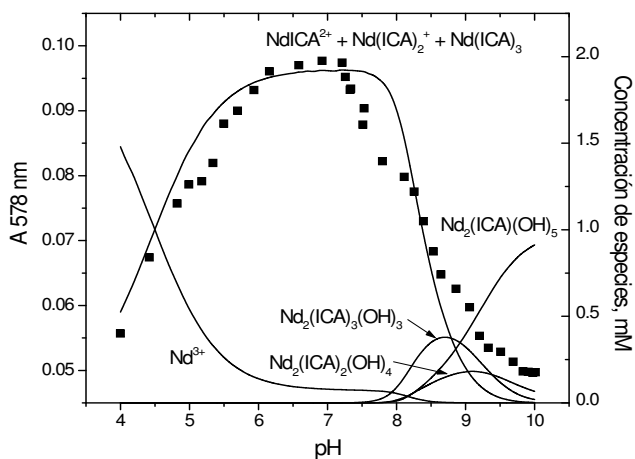


Figura 26. Absorbancia a 578 nm en función del pH. Las líneas sólidas son las distribuciones de especies calculadas a las condiciones de las figuras 19 y 20 con las constantes de la tabla 7.

Adicionalmente a esto, se realizó otra titulación espectrofotométrica con exceso de Nd(III), y como se observa en la *figura 27*, en este caso notamos claramente que a pesar de encontrarnos a valores de pH altos, todos los espectros pasan por un punto isobéptico a 579 nm, indicando que hay sólo un tipo de hidroxocomplejo. En la *figura 27* se muestra la variación de la absorbancia a 576 nm como función del pH y con las curvas de distribución de especies sobrepuestas. Una vez más la absorbancia correlaciona perfectamente con la variación de la concentración de los complejos con $mlh = 110$ y 120 . El complejo 130 se ignoró puesto que su concentración es menor al 5 % de las otras especies.

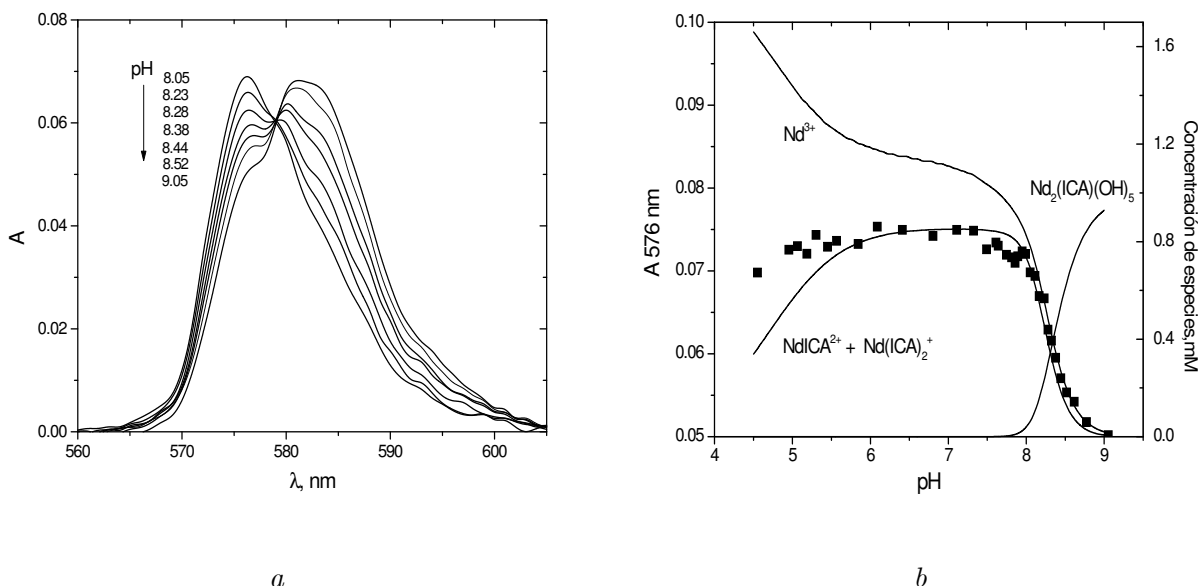


Figura 27a. Espectros de absorción de Nd(III) 2mM en presencia de 4-ICA 1mM en la región hipersensitiva a pH's mayores a 7. b. Absorbancia a 576 nm en función del pH. Las líneas sólidas son las distribuciones de especies a las condiciones de a., calculadas con las constantes de la tabla 5.2.

5.1.3. Estructura de los hidroxocomplejos

Las especies interesantes desde el punto de vista catalítico, como se verá más adelante, son las dinucleares [53], [60], [59], [39], [17], [16], [43] que de acuerdo con los modelos propuestos presentan un número constante de ligandos e igual a seis, ($l + h = cte. = 6$) otramante a lo reportado para el sistema Ln-BTP [17], [16] donde el número de BTPs es constante e igual a 2 ($l = cte. = 2$, $l + h \neq cte$). Sin

embargo esta diferencia es coherente puesto que BTP es un ligante neutro y 4-ICA es un ligante aniónico que presenta competencia con los hidroxilos por el centro metálico.

Se pueden proponer estructuras de los hidroxocomplejos tomando en cuenta las estructuras cristalinas reportadas de complejos hidroxido-Ln(III) y aminoácido-Ln(III). Las relaciones estequiométricas metal-hidroxido propuestas en este trabajo para las hidroxoespecies dinucleares son $m:h = 2:3$, $2:4$ y $2:5$. En disolución, la mayor parte de los complejos reportados tienen estequiometría $m:h = 1:1$, generalmente dímeros, **a** o tetrameros, **b** de éstos, *esquema 7*, cuyas estructuras contienen a los hidroxilos puenteando la estructura [65], [72]; sin embargo en estado sólido existe evidencia de complejos con estequiometría $m:h = 1:2$ [54], [66], en las que las estructuras poliméricas o laminares contienen a los lantánidos unidos por puentes de dos hidroxilos o incluso tres. También fue reportada una estequiometría inusual $m:h = 3:4$ en un complejo sin ligantes orgánicos [65].

Las relaciones estequiométricas de metal-ligante que se proponen en este trabajo para las especies dinucleares son $m:l = 2:3$, $2:2$ y $2:1$. Además, de acuerdo con estudios de RMN- ^1H , (no presentados en este trabajo) la coordinación con 4-ICA es bidentada, a través de los átomos de N y O. En la literatura, se ha encontrado que en los complejos α -aminoácido-Ln(III), los aminoácidos -en su forma zwitteriónica- generalmente se unen a los centros metálicos a través de la porción carboxílica, sin embargo también existen ejemplos de coordinación N, O a altos pH's [72] y con α -aminoácidos polidentados [20], [41]. Existe una gran variedad de estequiometrías $m:l$ reportadas para estos complejos, que van desde las más simples como $m:l = 1:1$ [8] y $1:2$ [20] para los complejos con bicina, a las más complicadas, como $m:l = 2:2.5$, $2:3$ y $2:1.5$ [65] ó $m:l = 3:2$ [72] para los macrocomplejos multinucleares de α -aminoácido-Ln(III). Además, en numerosos ejemplos, los ligantes, a través de sus fragmentos carboxílicos pueden ser puentes entre los lantánidos, **c** [20], [65], [72]. En todos estos reportes, el número de coordinación más frecuente de los lantánidos es el de 9. Finalmente, en nuestro grupo de trabajo se ha observado la formación de complejos del tipo $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$ $\text{M} = \text{La(III)}$, $\text{L} = \text{bicina}$, [8] y BTP [16] y $\text{M}_2\text{L}(\text{OH})_5^+$ con $\text{M} = \text{Y(III)}$ y $\text{L} = \text{BTP}$ [17].

Así entonces podemos proponer que 1) la estructura del complejo con $mlh = 224$ puede ser completamente simétrica (x) con dos hidroxilos puente formando el fragmento (a) y con la siguiente representación: $\text{Ln}_2(\mu_2\text{-OH})_2(\text{OH})_2(\eta^2\text{-4ICA})_2(\text{H}_2\text{O})_x$, probablemente con $x = 8$ tal que el número de

5.1.4. Análisis de resultados y otros estudios cinéticos

Los datos de reactividad presentados en la sección 5.1.2 se pueden sobreponer a la distribución de estas especies obteniendo gráficas como la mostrada en la *figura 28*. En este tipo de curvas se aprecia que la variación de la reactividad ($k_{obs,1}$) con el pH refleja el cambio de la concentración de las hidroxoespecies.

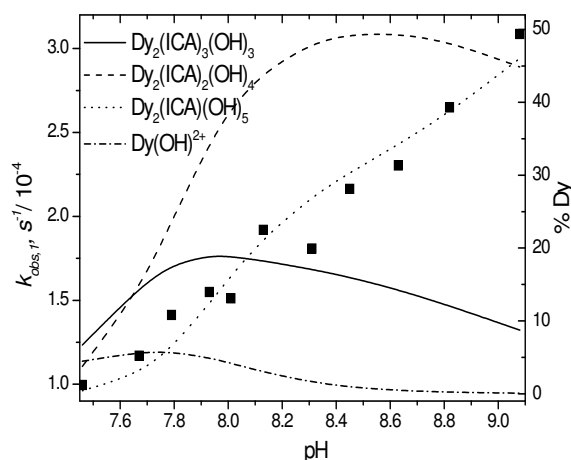


Figura 28. Distribución de hidroxoespecies de Dy, en el sistema La, 4-ICA 2mM cada uno, TRIS 10 mM. Los puntos rellenos (■) se refieren a la dependencia de la constante de velocidad, $k_{obs,1}$ del mismo sistema hacia la hidrólisis de BNPP en agua.

En este caso vemos cualitativamente que la reactividad correlaciona con la distribución de la especie dinuclear con $mlh = 215$, sin embargo, para determinar la dependencia cuantitativa de la reactividad con respecto a las especies presentes se llevaron a cabo, para los sistemas con cada ion metálico, regresiones multiparamétricas en las que se encuentra una ecuación del tipo:

$$k_{obs,1} = \sum k_{Nu.} [M_m L_l (OH)_h] \quad (5.3)$$

Donde $k_{Nu.}$, en $M^{-1}s^{-1}$ son las constantes de segundo orden de los respectivos nucleófilos $M_m L_l (OH)_h$.

Para obtener esta ecuación, se encuentra una curva que mejor describa los puntos experimentales y que sea una combinación lineal de la concentración de las especies multiplicados por sus coeficientes

(k_{Nu}). Para discriminar las distintas posibilidades de regresiones se toman en cuenta los parámetros estadísticos y la factibilidad física de la magnitud de las constantes. En la *figura 29* se muestran tres ajustes factibles de la gráfica de la variación de $k_{obs,1}$ con el pH y en la *tabla 9* se muestran los parámetros estadísticos para los tres ajustes.

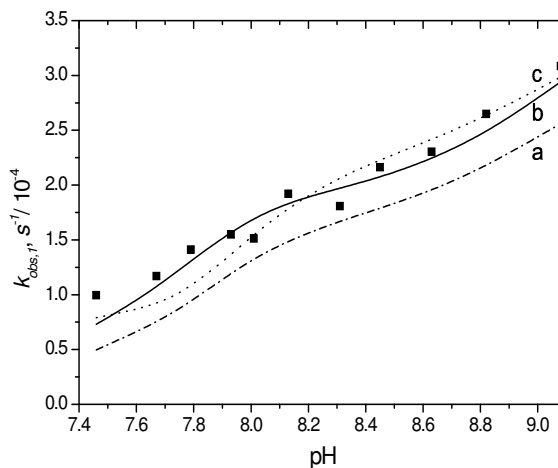


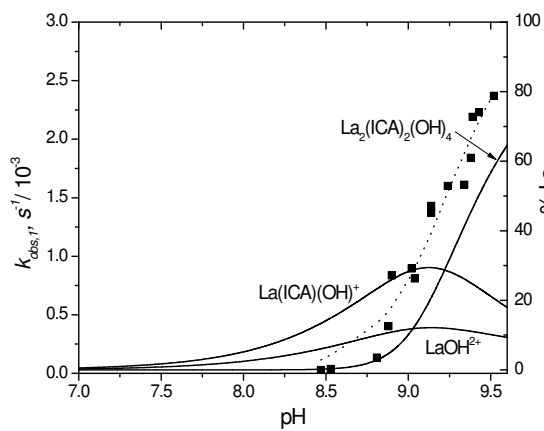
Figura 29. $k_{obs,1}$ experimentales (■) y calculadas (líneas) a partir de los ajustes multiparamétricos. En el modelo a. y b. se consideraron las especies con $mlh = 215$ y 101 sin embargo, en b. además se consideró el punto $0,0$ (en ausencia de especies reactivas la reactividad debe ser igual a cero). En el modelo c. Se consideró el punto $0,0$, sin embargo se supuso tan sólo la especie con $mlh = 215$.

Al observar la gráfica resulta evidente que el modelo **b** es el que mejor describe los puntos experimentales, esto se comprueba analizando la *tabla 9*, en donde vemos que tanto el error de los parámetros como su nivel de confianza (para tener un nivel de confianza de 99% o mayor $Prob(t) \leq 0.01$) y el valor de R^2 son mayores para **b**. De acuerdo con estos criterios se escogieron los modelos para los demás sistemas con los otros lantánidos.

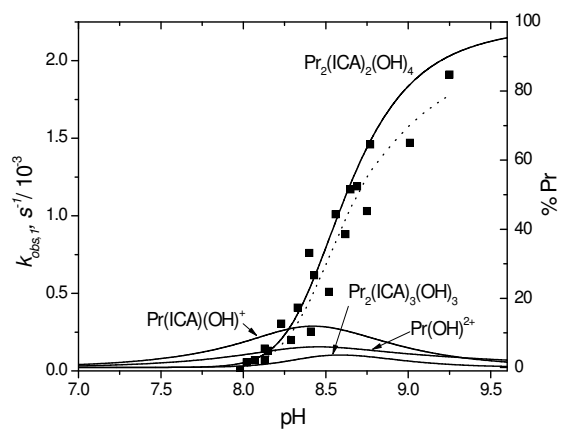
Tabla 9. Datos estadísticos para los diferentes modelos usados en las regresiones multiparamétricas

Regresiones multiparamétricas				
Modelo	Parámetro	Valor	Error	Prob(t)
a	Intersección con y	4.27486×10^{-5}	3.73526×10^{-5}	0.28552
	k_{215}	0.54503	0.0927	3.70206×10^{-4}
	k_{101}	0.48173	0.31152	0.1606
	r^2	0.96119		
b	Intersección con y	5.28951×10^{-6}	1.32466×10^{-5}	0.69897
	k_{215}	0.63634	0.03675	<0.0001
	k_{101}	0.78767	0.12548	1.44882×10^{-4}
	r^2	0.97519		
c	Intersección con y	7.698×10^{-5}	1.47636×10^{-5}	3.93159×10^{-4}
	k_{215}	0.48056	0.05963	<0.0001
	r^2	0.86658		

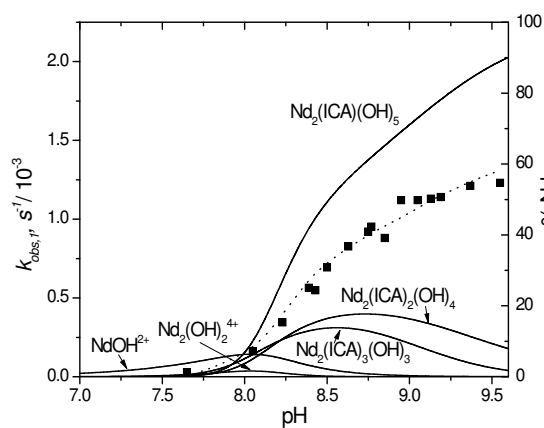
En las *figuras 30a-e* se muestran sobrepuestas la distribución de especies significativas, (con % apreciables con respecto a la concentración total del ion metálico) junto con la reactividad ($k_{obs,1}$) experimental y calculada con los resultados arrojados por las regresiones multiparamétricas, en la *tabla 10* se muestran las k_{Nu} . de acuerdo con las *figuras 25a-e*. Nótese que las k_{Nu} . pueden no reflejar el escalamiento que se observa en las gráficas, ya que éstas muestran la distribución de especies en porcentaje. Nótese igualmente que la escala de reactividades es diferente para cada sistema.



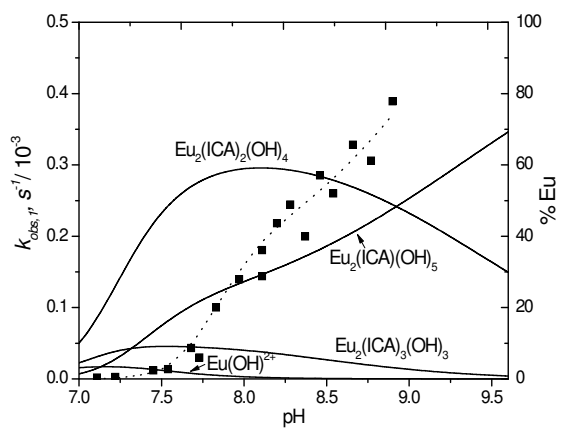
a



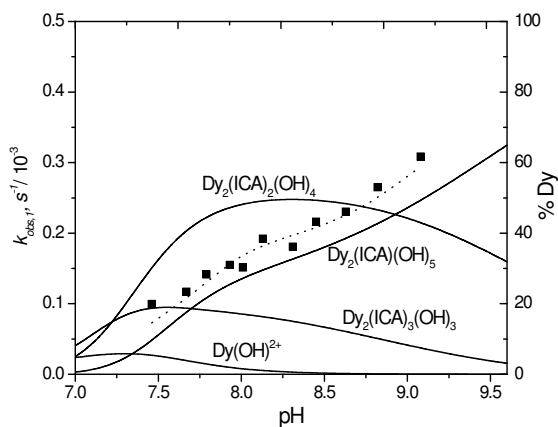
b



c



d



e

Figura 30a-e. Variación de las constantes de velocidad observadas, $k_{obs,1}$, con el pH y distribución de especies para las hidroxoespecies de los sistemas con Ln(III), 4-ICA 2mM cada uno. a→e La→Dy.

En este punto en el que ya se conocen las especies activas para cada sistema, podemos decir que dado que la constante de velocidad observada aumenta al aumentar el pH, la reactividad de las hidroxoespecies es mayor que las de los respectivos acuocaciones, y el hecho de que la actividad catalítica se presente a menores valores de pH para los cationes más ácidos y viceversa se debe a que entre más bajo es el pK_a de hidrólisis de los cationes, a menor pH empieza a aumentar la concentración de la especie activa. Finalmente podríamos decir que las máximas reactividades se alcanzan con los cationes más básicos porque al avanzar en la serie lantánida, las constantes de formación de los complejos son mayores, (ver *tabla 8*) lo cual los vuelve al mismo tiempo, menos reactivos.

Además al comparar los valores de k_{Nu} : en la *tabla 10* notamos que los complejos dinucleares con mayor número de hidroxilos coordinados son los que más usualmente contribuyen a la reactividad de los sistemas y además éstos son más frecuentes en los cationes con mayor número atómico. Así, para compensar la disminución de nucleofilia de los hidroxilos coordinados a los cationes más electrofílicos, se forman compuestos con mayor cantidad de hidróxidos de tal manera que la densidad electrónica se distribuye más homogéneamente. Dy sin embargo es la excepción ya que, si bien su complejo mayor ($mlh = 215$) tiene reactividad, también el complejo 101, tiene una contribución importante a la reactividad. También notamos una discontinuidad al pasar de los lantánidos menos pesados (La y Pr) a los más pesados: tanto en las magnitudes de las constantes del nucleófilo, que van disminuyendo, congruentemente con las reactividades encontradas, como en las especies responsables de la reactividad y la distribución de las hidroxoespecies (ver *figura 30a-e*) Estos rasgos concuerdan con lo que se ha reportado anteriormente sobre la química de los lantánidos, [19]. Finalmente, comparando estos valores con el valor de k_{Nu} : reportado para OH^- vemos que son 5 ordenes de magnitud más grandes (ver *tabla 1*, renglón 4).

Tabla 10. Constantes del nucleófilo, $k_{Nu.}$ para los sistemas Ln-4-ICA

$k_{Nu.}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}, \text{especies mlh}$				
Ln	101	111	224	215
La		1.0±0.3	3.7±0.2	
Pr			1.97±0.09	
Nd				1.47±0.05
Eu				0.86±0.04
Dy	0.8±0.1			0.64±0.04

Para encontrar las condiciones óptimas de la catálisis, se realizó otro tipo de experimento cinético, en el que se varió la proporción de metal:ligante. Se observó que entre mayor es la proporción de ligante la reactividad disminuye, *figura 31*, lo cual es lógico considerando, que al aumentar la proporción de ligante, se favorece el predominio de las especies con mayor cantidad de ligantes (ver el ejemplo de Nd en la *figura 22*) que de acuerdo con el modelo propuesto y condensado en la *tabla 10*, no son en ningún caso las responsables de la reactividad. Sin embargo, si bien la disminución de la reactividad tan pronunciada (relativamente de 100 a 3%) se debe principalmente a la disminución de la especie activa, se puede pensar además que el 4-ICA, en concentraciones grandes es un inhibidor de los complejos activos, puesto que las especie activa disminuye sólo en un 85%. En la *figura 31* se muestra también, la variación de la constante de segundo orden para la especie activa, ($mlh = 215$) calculada de acuerdo con la relación $k_{obs,1}/[Nd_2(ICA)(OH)_5]$, mostrando el efecto inhibitorio que tiende a la “saturación” a valores aproximadamente tres veces menores que la más alta reactividad, encontrada a concentraciones pequeñas de 4-ICA. Para los sistemas con los otros iones metálicos se encontró el mismo efecto a concentraciones elevadas de 4-ICA, así entonces las constantes de segundo orden, $k_{Nu.}$ encontradas deben ser también función de la concentración del ligante libre presente en disolución, sin embargo, esta relación es complicada, y difícilmente puede atribuírsele algún sentido físico.

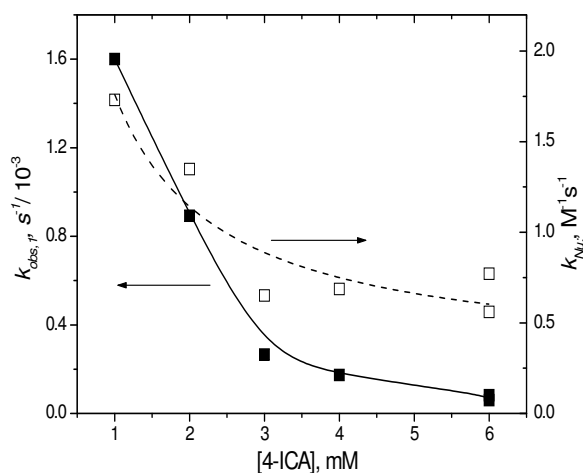
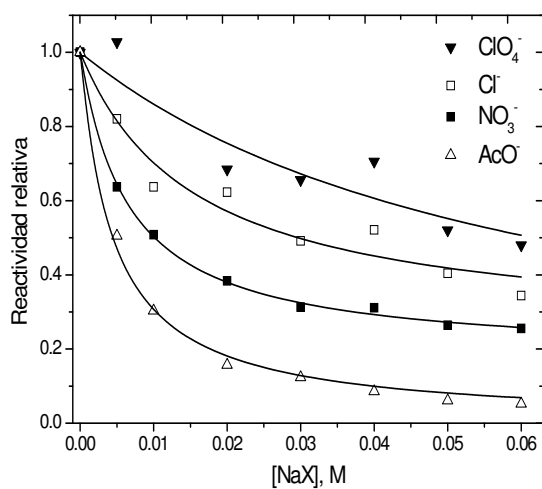


Figura 31. Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP catalizada por Nd(III) 2mM en presencia de concentraciones variables de 4-ICA (■). Los cuadros abiertos (□) muestran los valores de las constantes de segundo orden para la especie con $mlh = 215$. Las líneas no son ajustes, simplemente se dibujaron para visualizar las tendencias.

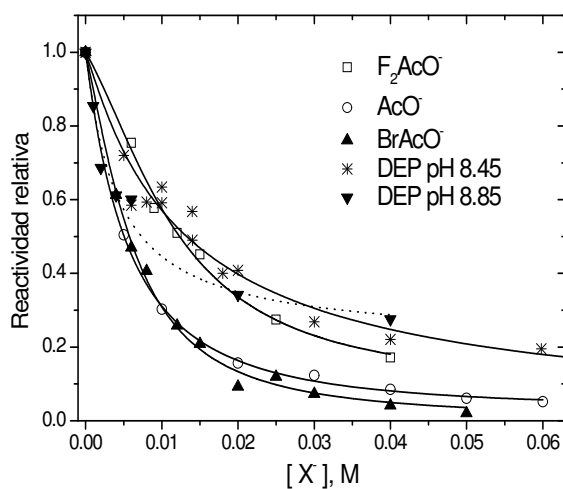
5.1.5. Efecto inhibitorio de aniones: cinética, potenciometría y espectrofotometría

Finalmente se realizaron experimentos en los que se varió la fuerza iónica. Como se explicó en la sección 4.5.2, es necesario agregar al sistema un exceso de sal para mantener la fuerza iónica constante con el objeto de poder hacer reproducibles las titulaciones potenciométricas, en este trabajo se usó NaCl. Sin embargo, en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo, [60], [59] se encontró que la reactividad de los sistemas decae al aumentar la fuerza iónica debido a la formación de pares iónicos entre los aniones de la sal agregada y los complejos activos cargados positivamente. Debido a que los complejos que se proponen en este trabajo como activos son neutros, en principio no se esperaría ningún efecto de este tipo, sin embargo, sorpresivamente la reactividad disminuye pronunciadamente aún con aniones poco coordinantes como cloruro y perclorato, ver *figura 32a*. Así entonces es obvio que estos aniones ejercen un efecto inhibitorio parecido al que propicia el exceso de ligante en el sistema con Nd, (ver *figura 31*) por lo que podemos aprovechar este tipo de estudio con aniones para modelar la unión de los sustratos a las especies activas, [21], [14]. Para modelar la unión de BNPP con los complejos

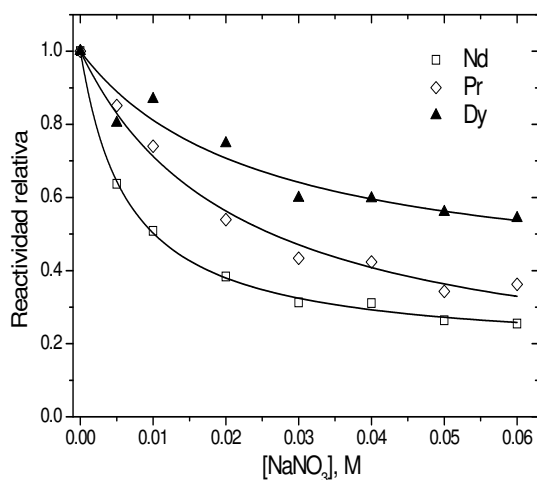
activos se hicieron estudios cinéticos en presencia de difenilfosfato (DPP) y fenilfosfato (PP), este último considerado como un análogo al estado de transición [14], sin embargo, éstos interaccionan tan fuertemente con los complejos activos, que se produce precipitación a concentraciones muy pequeñas -del orden de 5 mM- lo cual impide realizar el estudio. Considerando entonces que estos compuestos, al tener grupos fenilos son más propensos a precipitar debido a que se empaquetan mejor en la red cristalina, se sintetizó un análogo alifático, dietilfosfato (DEP) y se hicieron estudios con la sal de bario de este anión, también se realizaron pruebas con Glucosa-6-fosfato, ya que al tener hidroxilos en su estructura se esperaba que fuera más soluble, sin embargo fue imposible realizar su estudio por la precipitación que produce. Debido a que se notó que el acetato tiene un efecto muy pronunciado sobre la reactividad, *figura 32a y b*, se decidió ampliar este estudio, analizando el efecto de otros acetatos halo-sustituídos.



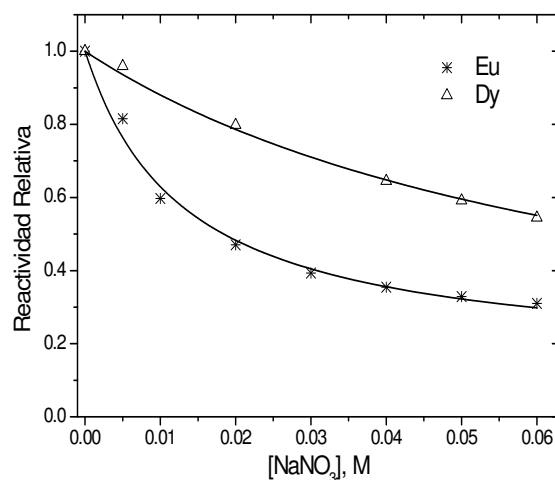
a



b



c



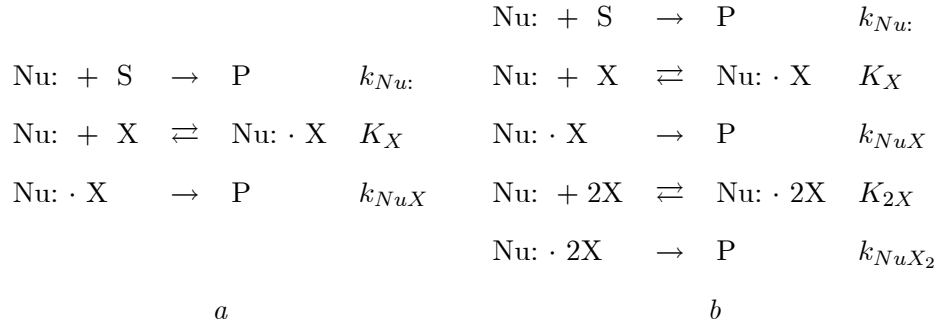
d

Figura 32. Reactividad relativa hacia la hidrólisis de BNPP variando la concentración de aniones inhibidores. a. Sistema Nd, 4-ICA 2mM cada uno, TRIS 10 mM, pH 8.45, variando la concentración de aniones poco coordinantes, comparación con AcO^- . b. Mismo sistema en presencia de diversos acetatos y dietilfosfato de bario (DEP). c. Efecto del NO_3^- en los sistemas Ln(III), 4-ICA 2mM Ln = Nd, Pr y Dy, pH 8.4. d. Efecto del NO_3^- en los sistemas Ln(III), 4-ICA 2mM Ln = Dy y Eu a pH 7.7. Las líneas se refieren a los ajustes teóricos, en a. se ajustó la inhibición de AcO^- al modelo del Esquema 5.2.i.a. y en b. al del 5.2.i.b., vide infra.

a) La reactividad relativa la definimos como el cociente de $k_{1,obs}$ en el ensayo entre $k_{1,obs}$ del sistema a ese pH sin la sal. Para hacer estas correcciones se tomaron en cuenta las pendientes de las gráficas a y b de la figura 10 en el rango de pH en el que varió el experimento.

Notamos cualitativamente en la figura 32b, que la influencia en la reactividad no correlaciona con la densidad electrónica de las fracciones COO^- de los acetatos, menores en bromoacetato y difluoroacetato, por otro lado, el efecto del DEP es mucho menor de lo que se esperaba.

Para explicar el efecto que producen estas sales en la reactividad, se propuso un modelo de inhibición competitiva, ilustrado en el esquema 9 del cual se derivan las ecuaciones 5.4 y 5.5.



Esquema 9

$$\frac{k_{obs,1}([X])}{k_{obs,1}^0} = \frac{1 + \left(\frac{k_{NuX}}{k_{Nu:}}\right) K_X [X]}{1 + K_X [X]} \quad (5.4)$$

(del *esquema 9a*)

$$\frac{k_{obs,1}([X])}{k_{obs,1}^0} = \frac{1 + \left(\frac{k_{NuX}}{k_{Nu:}}\right) K_X [X] + \left(\frac{k_{NuX_2}}{k_{Nu:}}\right) K_{2X} [X]^2}{1 + K_X [X] + K_{2X} [X]^2} \quad (5.5)$$

(del *esquema 9b*)

Donde el término $k_{obs,1}(X)/k_{obs,1}^0$ es precisamente lo que se había llamado “reactividad relativa”, Nu: es la especie activa, S es el sustrato (BNPP), P los productos de la catálisis y X el inhibidor, en este estudio siempre aniónico. Al ajustar los datos con estos modelos, se pueden estimar las constantes de formación de la especie activa con el anión inhibidor (K_X, K_{2X}) es necesario sin embargo, aclarar que estas constantes son aparentes ya que los modelos son aproximaciones: las hidroxoespecies que se encuentran en disolución también tienen equilibrios entre ellas, y así el balance de masas de las especies en realidad debería contener más términos, por lo que nuestras constantes son más pequeñas que las constantes de formación reales. Por otro lado el modelo tampoco contempla los casos en los que más de una especie es activa, como para La y Dy. Esto se comprueba al observar que se tienen

inhibiciones diferentes para sistemas iguales a diferente pH (ver ejemplo de Dy, en las *figuras 32c y 32d*) puesto que al variar el pH se varía la distribución de las especies activas.

Sólo en el caso de los acetatos se usó el modelo del *esquema 9b* en el que se unen dos moléculas de inhibidor por cada nucleófilo, (nótese en las *figuras 32a y 32b* como la curva de AcO^- se modela mejor con este esquema) los valores logarítmicos de las constantes de formación aparentes se muestran en la *tabla 11*. En esta tabla notamos que hay poca relación entre la basicidad y las constantes aparentes obtenidas al mismo pH, tanto para los complejos con una molécula de inhibidor, como para los complejos de acetatos con dos moléculas de inhibidor. Igualmente notamos que las constantes aparentes obtenidas son mucho más grandes que las constantes de formación reportadas por Martell, lo cual confirma que la afinidad de los complejos activos es muy grande por especies aniónicas, especialmente por los acetatos y nitrato, cuyo punto en común es la estructura trigonal planar que se asemeja al plano trigonal formado por el hidroxilo atacante del nucleófilo y el sustrato durante el estado de transición. Para DEP los datos se ajustan mejor al modelo simple en el que se une sólo una molécula de inhibidor, lo cual nos indica indirectamente que posiblemente una molécula de sustrato se una por cada molécula de nucleófilo.

Tabla 11. Logaritmo de las constantes de formación aparentes para los sistemas Nd-4ICA-X

X^-	$\log \mathbf{K}_{2151,ap}$	$\log \mathbf{K}_{2152,ap}$	$\text{pK}_a (\text{HX})$	$\log \mathbf{K}_{NdX}^a$
ClO_4^-	1.21 ± 0.06		-10^d	-0.22
Cl^-	1.8 ± 0.2		-6.1^e	-0.1
NO_3^-	2.18 ± 0.03		-1.38^e	0.3
DEP	1.88 ± 0.02^b		1.39^f	2.0^i
	2.38 ± 0.09^c			
F_2AcO^-	1.6 ± 0.1	3.70 ± 0.08	1.34^g	-
BrAcO^-	2.05 ± 0.07	4.18 ± 0.05	2.90^h	1.3^j
AcO^-	2.25 ± 0.02	3.83 ± 0.06	4.75^g	2.11^j

^{a)}Tomadas de [37] a 25°C, I = 1.0, ^{b)}A pH = 8.45, ^{c)}A pH = 8.85, ^{d)}Valor estimado, tomado de [56], ^{e)}Tomadas de [33], ^{f)}Tomado de [31], ^{g)}Tomado de [47], ^{h)}Tomado de [22], ⁱ⁾Tomada de [55] a I = 0, ^{j)}A I = 0.1.

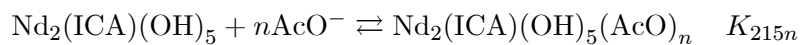
Finalmente, en las *figuras 32c y d* se muestra el efecto del anión NO_3^- en los sistemas con diferentes iones metálicos, en la *tabla 12* se muestran las constantes de formación aparentes para estos sistemas obtenidos de los ajustes al *esquema 9a*. No advertimos una tendencia definida, de acuerdo con la llamada “tendencia electrostática lantánida” [49] de aumento en las constantes de formación al aumentar el número atómico, sin embargo, notamos que esto sucede de igual manera en las constantes de formación reportadas por Martell.

Tabla 12. Logaritmo de las constantes de formación aparentes de los sistemas Ln-4ICA-NO₃⁻

Ln(III)	$\log \mathbf{K}_{X,ap}$ (pH = 8.4)	$\log \mathbf{K}_{X,ap}$ (pH = 7.75)	$\log \mathbf{K}_{LnX}^a$
Pr	1.66±0.09		0.2
Nd	2.18±0.03		0.3
Eu		1.88±0.06	0.31
Dy	1.6±0.3	1.13±0.01	-0.3

^{a)}Tomadas de [37] a 25°C, I = 1.0

La formación de los complejos de acetato en el sistema con Nd(III) también fue estudiado mediante titulaciones potenciométricas. Al cambiar la concentración de acetato en el sistema, se detectaron pequeños, sin embargo perceptibles cambios en las curvas de titulación, en la *figura 33a* se muestran dos curvas de titulación, una en presencia y otra en ausencia de acetato en donde se nota un pequeño cambio arriba de pH = 8.5, es decir en el intervalo en el que el hidroxocomplejo con $mlh = 215$ ya es al menos 50 % del Nd(III) total. Al ajustar las curvas en presencia de acetato al esquema de equilibrios propuestos (*esquema 7*) se obtuvieron que las constantes de formación para los hidroxocomplejos con $mlh = 233$ y 224 coinciden dentro del margen de error, con las obtenidas sin acetato, pero la constante de formación de la especie 215 se modificó, indicando la posible existencia de una especie con $mlhn = 215n$, donde n es el número de acetatos y $n = 1, 2$, de tal manera que β_{215} será modificada de acuerdo con la ecuación 5.6 proveniente del equilibrio del *esquema 10*. Si se grafica $\beta_{215, obs}/\beta_{215}$ contra la concentración de acetato se pueden encontrar las dos K_{215n} , esta gráfica se muestra en la *figura 29b*. Es necesario hacer notar, sin embargo, que este ajuste tiene mucho error, puesto que se están ajustando dos parámetros con sólo tres puntos independientes.



Esquema 10

$$\beta_{215, \text{obs}} = \beta_{215} \left(1 + \sum_{n=1}^2 K_{215n} [\text{AcO}^-]^n \right) \quad (5.6)$$

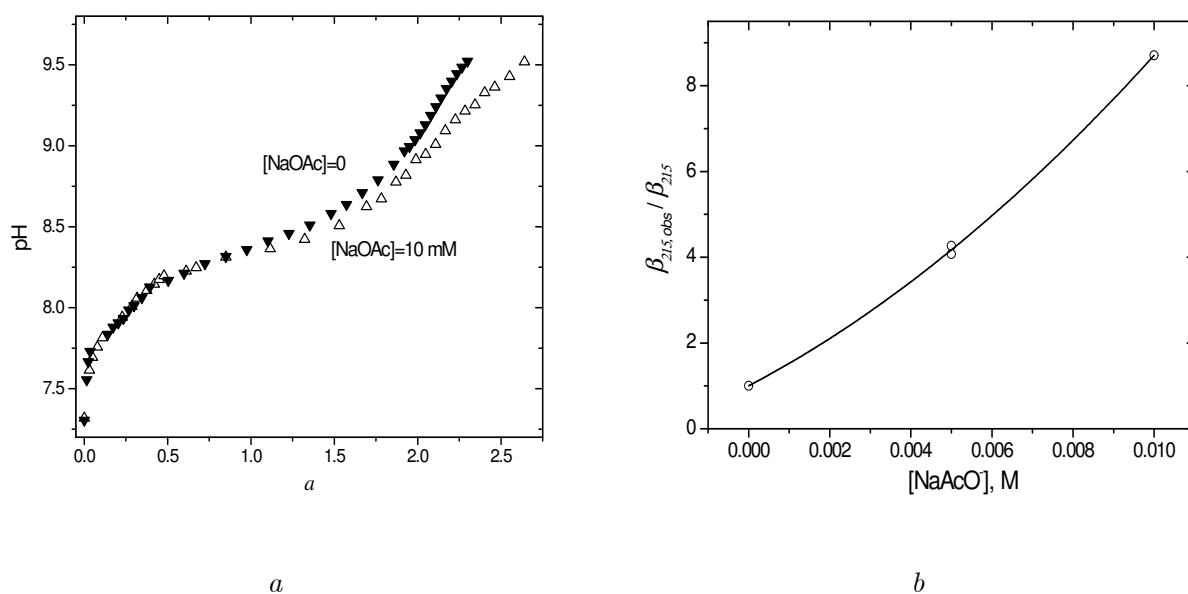


Figura 33. a. Curvas de titulación de la mezcla de Nd, 4-ICA 2mM cada uno sin acetato (▼) y en presencia de AcO^- 10 mM (△). b. $\beta_{215, \text{obs}}/\beta_{215}$ en función de la concentración de acetato.

Del ajuste de la figura 33b se obtuvieron las constantes $\log K_{2151} = 2.70 \pm 0.03$ y $\log K_{2152} = 4.44 \pm 0.06$. Estos valores son significativamente mayores que los obtenidos mediante el efecto inhibitor cinético (tabla 11) sin embargo es necesario tomar en cuenta que las constantes determinadas cinéticamente son aparentes y fueron obtenidas en condiciones en las que sólo el 40% del Nd total (ver figura 30c) se encuentra como el complejo con $mlh = 215$, de tal manera que $K_{X,ap}$ o $K_{2151,ap}$ debería ser menos de la mitad de su valor real, y sus logaritmos tomarían los valores $\log K_{2151,ap} = 2.30 \pm 0.03$ y $\log K_{2152} = 4.04 \pm 0.06$, mucho más cercanos a los reportados anteriormente.

Finalmente la complejación con acetato también fue estudiada mediante titulaciones espectrofo-

tométricas, igualmente cambiando la concentración de acetato a pH fijo y básico. Tal como en el caso del estudio de la complejación de Nd(III) con 4-ICA, también en este caso se observó hipersesibilidad de la banda de Nd(III) alrededor de 580 nm. En las *figuras 34a* y *b* se muestran algunos espectros al variar la concentración de acetato y el delta epsilon, respectivamente.

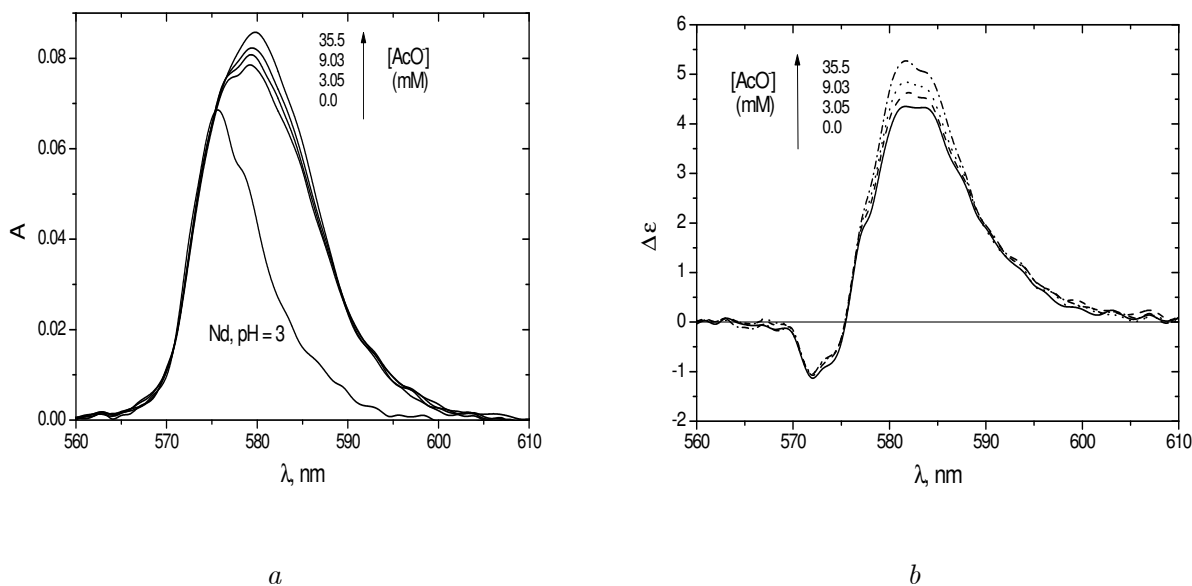


Figura 34. a. Espectros de absorción de Nd(III) 2mM en la región hipersensitiva, en presencia de 4-ICA 2mM a pH = 8.5 variando la [AcO⁻]. b. Variación de Δε a para las mismas concentraciones de acetato. El espectro de Nd(III) en ausencia de ligante se usó como “blanco” para calcular los espectros diferenciales.

Mediante el ajuste de la gráfica ϵ en función de la concentración de acetato se pueden estimar también las constantes de asociación aparentes, sin embargo los datos tenían mucha dispersión y las constantes obtenidas fueron notablemente más pequeñas que las halladas por los experimentos cinéticos y las titulaciones potenciométricas ($\log K_{2151,ap} = 1.97 \pm 0.09$ y $\log K_{2152,ap} = 3.5 \pm 0.1$) sin embargo es claro que los datos correlacionan con un “estimado burdo” de estas constantes (la función de Bjerrum para acetato) como se muestra en la *figura 35*, donde se encuentran sobrepuestos la fuerza oscilatoria y el número promedio de acetatos unidos al ion metálico por mol de metal (\bar{n}_{AcO^-}) que fue calculado obteniendo la concentración de acetato libre para cada punto de la titulación usando las constantes de los complejos $mlhn = 2151$ y 2152 promedio de los experimentos cinéticos y potenciométricos. Así,

ésta es una relación indirecta entre los datos arrojados por las tres técnicas.

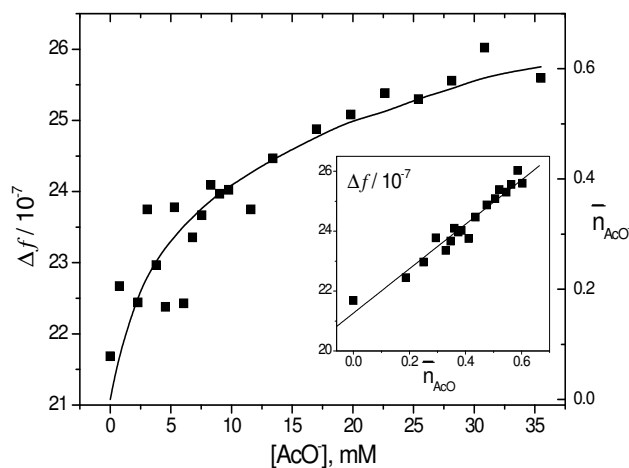
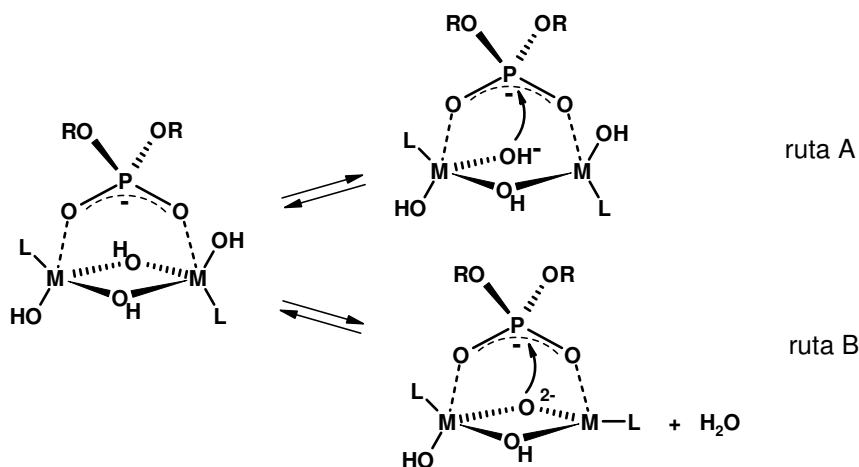


Figura 35. Variación de la fuerza oscilatoria diferencial con respecto a la concentración de acetato para el sistema descrito en las figuras 26a y 26b. Δf se calculó para cada conjunto de datos de acuerdo con la ecuación viii. tomando como límites 560 a 610 nm. La línea sólida es la función de Bjerrum \bar{n}_{AcO^-} , ver el texto.

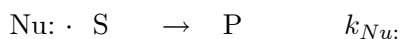
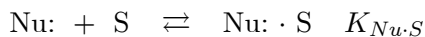
La gráfica indica efectivamente que el cambio de los espectros se debe a la unión de los acetatos al Nd, el ajuste lineal se muestra en la gráfica insertada. Igualmente corroboramos que el efecto de los carboxilatos en la hipersensibilidad es mayor, puesto que a pesar de aumentar la concentración 35 veces Δf cambió únicamente en 5 unidades.

Resumiendo los resultados presentados, podemos decir que los hidroxocomplejos neutros catalíticamente activos no solamente se unen al análogo del sustrato DEP con la misma o incluso mayor fuerza que acuo catión Nd^{3+} sino que sorprendentemente muestran afinidad a otros aniones simples como acetato, cloruro o nitrato que prácticamente no interaccionan con Nd^{3+} . El mayor efecto se observó para los aniones planos que se unen mejor al sitio de unión del catalizador. Además suponemos que estos aniones se unen a las especies binucleares activas de la misma manera que se ha reportado se unen los aminoácidos zwitteriónicos en hidroxocomplejos tetranucleares (*esquema 5.1.4, c*) y creemos que la binuclearidad de estas especies son las responsables de la afinidad incrementada a los aniones.

De acuerdo con estas consideraciones, el mecanismo de acción de los complejos activos más probable es el que se muestra para el complejo con $mlh = 224$ en el *esquema 11*. El sustrato se activa a través de la interacción de sus oxígenos fosforílicos con los iones metálicos mediante una coordinación puenteada. Posteriormente uno de los puentes hidroxilo puede abrirse, convirtiéndose en el nucleófilo que atacará al fósforo electropositivo (ruta a). Otra opción es que uno de los hidroxilos terminales desprotone a un hidroxilo puente, formándose así un puente oxo y liberando agua. Los puentes oxo poseen una gran reactividad fosfodiesterolítica [39] y se forman fácilmente en disoluciones ligeramente básicas de peróxido de hidrógeno; sin embargo es suficiente la formación de una pequeña fracción de aniones oxo para observar la reactividad aquí reportada. En una forma muy simplificada, un esquema cinético correspondiente a este mecanismo es el que se muestra en el *esquema 12*, cuya expresión para la constante de primer orden es la que se muestra en la ecuación 5.7.



Esquema 11



Esquema 12

$$k_{\text{obs},1} = k_{\text{Nu}} K_{\text{Nu}\cdot\text{S}} [\text{S}] [\text{Nu}] \quad (5.7)$$

5.2. Sistema Ln (III)- 2-ICA

Al igual que el ligante 4-ICA, se encontró que este ligante estabiliza adecuadamente los hidroxocomplejos de los Ln(III) estudiados, formando sistemas catalíticos eficientes hacia la hidrólisis de BNPP, sin embargo el intervalo de pH en el que la estabilización es eficiente es pequeño: apenas de 7.5 a 9.0. En la *figura 36* se muestra el perfil cinético de pH análogo al mostrado en la *figura 15* para 4-ICA en donde encontramos que la tendencia de reactividad a valores de pH mayores a 8.5 es: Nd(III) > Pr(III) > La(III) > Dy(III). Por su parte, el sistema con Eu(III) pierde reactividad a $\text{pH} > 8$, sin embargo sus constantes observadas son muy grandes. También destaca la alta actividad del sistema con Nd(III). Por otro lado, el ligante no llegó a estabilizar suficientemente bien los hidroxocomplejos activos de La(III), puesto que a pH mayor de 9 las disoluciones precipitaron.

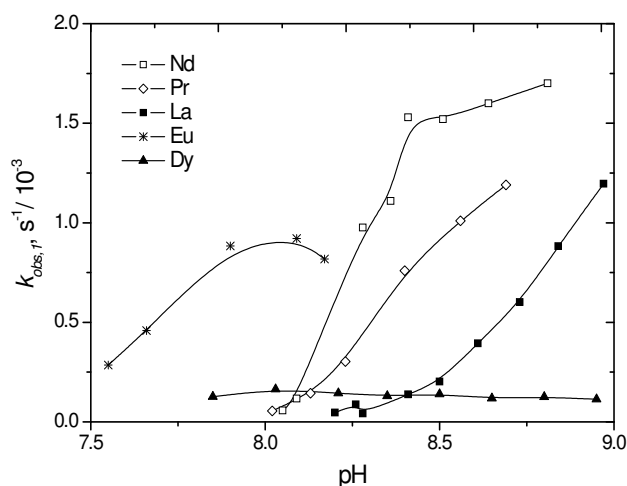
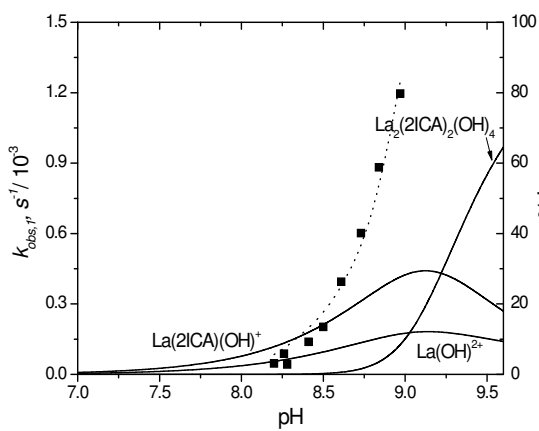


Figura 36. Dependencia del pH de la constante de velocidad, $k_{obs,1}$, de los sistemas con Ln (III), 2-ICA 2mM cada uno, para la hidrólisis de BNPP en agua, Tris 10 mM. Las líneas no son ajustes, se dibujaron para visualizar las tendencias.

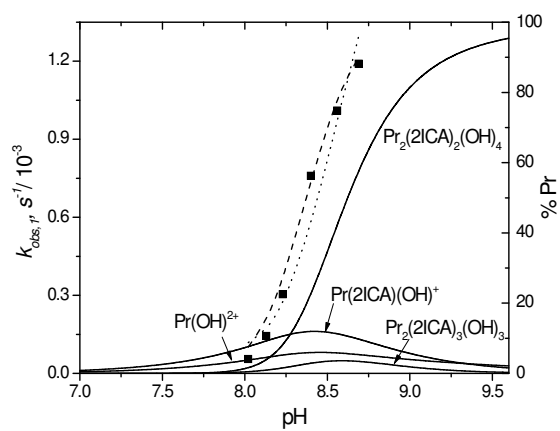
El comportamiento de los sistemas con 2-ICA presenta una diferencia notable con respecto a los sistemas con 4-ICA (ver *figura 15*): la reactividad para todos los cationes se presenta a valores de pH más bajos, y con intervalos más pequeños; además, con excepción de Dy(III), a valores fijos de constantes observadas, (y mayores que $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) la aparición de reactividad al aumentar el pH

sigue el orden de pK_a de los cationes, es decir entre más básico son los cationes, éstos toman el mismo valor de reactividad a valores más altos de pH. Esta tendencia no es tan marcada para los sistemas con 4-ICA.

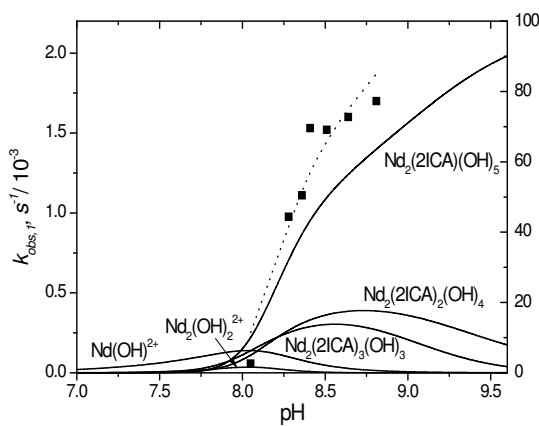
Al realizar las titulaciones potenciométricas se obtuvo que las constantes de formación son muy similares -dentro de los límites de error- a las encontradas para 4-ICA, por lo que la distribución de especies es similar. No obstante, al sobreponer estas distribuciones de especies con los perfiles cinéticos de pH, encontramos diferencias notables con respecto a los sistemas con 4-ICA en las especies responsables de la reactividad. En las *figuras 37a-e* se ilustra lo anterior junto con las curvas resultantes de los ajustes multiparamétricos de las contribuciones de las especies. Las constantes de segundo orden se muestran en la *tabla 13*.



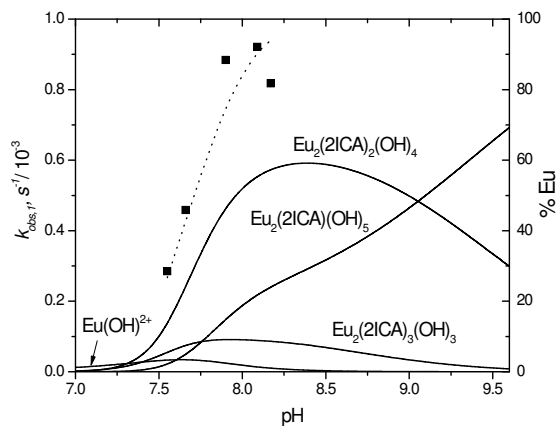
a



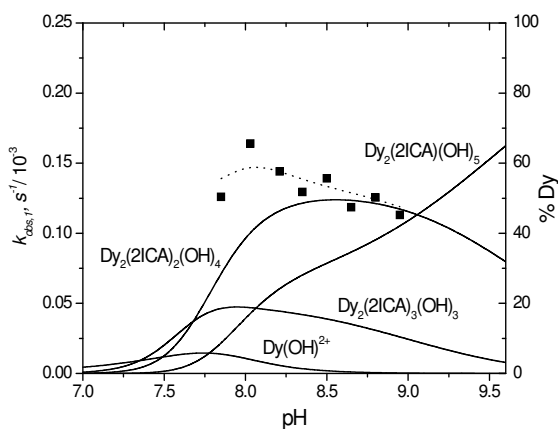
b



c



d



e

Figura 37a-e. Variación de las constantes de velocidad observadas, $k_{obs,1}$, con el pH y distribución de especies para las hidroxoespecies de los sistemas con Ln(III), 2-ICA 2mM cada uno. a→e La→Dy.

Notamos que para el sistema con Pr(III) (*figura 38b*) hay dos ajustes cercanos a los puntos experimentales, la línea con las líneas largas (–) muestra el ajuste con los mejores parámetros estadísticos y que más se asemeja a los puntos experimentales, no obstante, requiere que la especie con $mlh = 233$ sea activa con una constante de segundo orden muy grande ($17 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) lo cual es absurdo considerando que en ningún sistema esta especie ha figurado como activa y que ninguna especie activa ha tenido una constante tan grande. Así entonces se prefirió el ajuste de la línea punteada, que a pesar de tener parámetros estadísticos inferiores, describe un modelo con más sentido físico. En varios sistemas se tuvieron situaciones parecidas a la de Pr(III), lo cual en parte se debió a que la cantidad de puntos experimentales es muy baja.

Al comparar los valores de k_{Nu} en la *tabla 13* notamos que normalmente y al igual que en el sistema con 4-ICA, los complejos dinucleares con mayor número de hidroxilos coordinados son los que contribuyen a la reactividad de los sistemas, no obstante para el sistema con Eu(III) se hubiera esperado que la especie 215 fuera la que contribuyera a la reactividad, sin embargo el hidroxocomplejo activo es el 224. Ésto explica por qué la reactividad es inesperadamente grande en este sistema. En general, los valores de las constantes son grandes (mayores que para el sistema con 4-ICA) sin embargo, también tienen errores grandes, por lo tanto para obtener datos más confiables es necesario seguir los estudios con este sistema, considerando que las reactividades obtenidas son grandes a valores de pH más cercanos a la neutralidad o “pH fisiológico”. A pesar de esta ventaja la reactividad de este sistema es inferior a lo que se esperaba, puesto que en términos de coordinación con el ion metálico, tiene los mismos atributos que el ligante 4-ICA, pero en dos posiciones posibles ya que los nitrógenos se encuentran adyacentes a ambos oxígenos, (ver *figura 9*) por lo que al menos estadísticamente, se suponía más posible la formación de complejos.

Tabla 13. Constantes del nucleófilo, k_{Nu} , para los sistemas Ln-2-ICA

	k_{Nu} , $M^{-1}s^{-1}$, especies mlh			
Ln	101	111	224	215
La		1.3±0.3	8±2	
Pr			2.1±0.2	
Nd				3.0±0.3
Eu			1.5±0.2	
Dy	0.61±0.09			0.25±0.02

5.3. Sistema Ln (III)-4-IA, Ln = La, Nd

Este sistema no presentó una estabilización tan efectiva como la de los sistemas con 4-ICA y 2-ICA, ya que las disoluciones precipitaron a valores de pH en los que los sistemas con los otros ligantes son estables. Además, las reactividades encontradas tampoco fueron altas, (al menos un orden de magnitud menores que con los otros ligantes) se probaron experimentos con relaciones 1:2 metal-ligante para evaluar si la reactividad aumentaba por formarse complejos con esta estequiometría, sin embargo esto tampoco sucedió, al contrario, notamos un punto a pH = 9.01 cuya reactividad disminuyó debido a que el sistema ya estaba parcialmente precipitado, *figura 38*. No obstante, el comportamiento del sistema es un tanto lógico, ya que al ser la cadena carboxílica del ligante más grande (un metileno más) los complejos forman ciclos de seis miembros, cuya estabilidad termodinámica, desde hace tiempo se conoce es menor con respecto a los anillos de cinco miembros, probablemente debido a efectos estéricos [2], [7].

Por otro lado, los sistemas con este ligante presenta la misma ventaja que los sistemas con 2-ICA: a valores de pH menores, ya presentan reactividad, lo cual podría tener ventajas en las aplicaciones biológicas, puesto que normalmente para éstas es necesario que los sistemas funcionen a pH fisiológico, para evitar la desnaturalización de las proteínas que pudieran estar presentes.

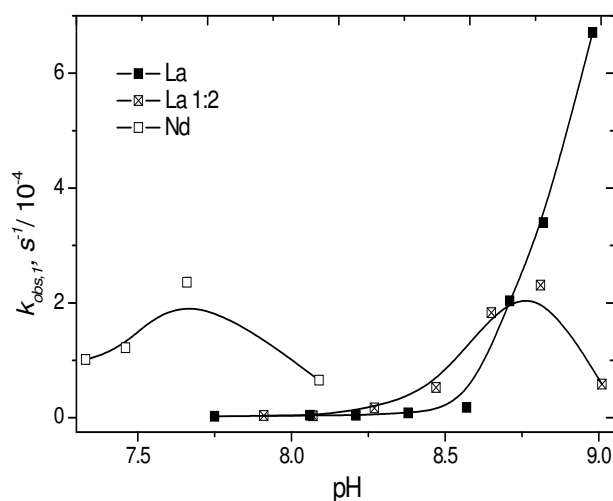
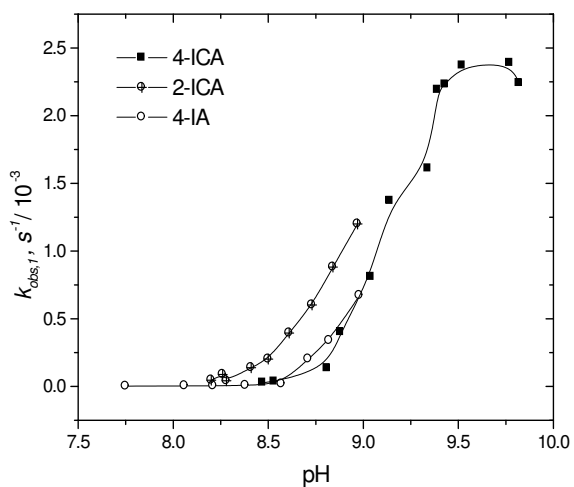


Figura 38. Gráfica de la dependencia de la constante de velocidad, $k_{obs,1}$, de los sistemas con La (III) y Nd (III) en función del pH para la hidrólisis de BNPP en agua, Tris 10 mM, 2-ICA 2 mM. Hay dos series de La(III): la de los cuadros rellenos (■) tienen una relación de concentración 1: 1 La-4ICA, 2mM; la de los cuadros con cruz (⊠) tienen una relación de concentración 1: 2 La-4ICA, 2mM y 4mM respectivamente.

Finalmente, si comparamos las reactividades más sobresalientes, (normalmente las de La(III)), para los tres sistemas estudiados, podemos ver claramente que el sistema cuya constante de velocidad observada, $k_{obs,1}$, alcanzada es más grande es la del sistema con el ligante 4-ICA, figura 39, además su intervalo de reactividad es mayor. También se puede apreciar que los sistemas con 4-ICA catalizan mejor la reacción a valores de pH más altos, con 4-IA a valores intermedios y finalmente con 2-ICA empieza a tener reactividad a valores de pH menores. Probablemente este comportamiento se debe a que los valores de pK_a de las moléculas de agua coordinadas siguen esta tendencia.



$k_{obs,1}, s^{-1}$			
pH	La-4ICA	La-2ICA	La-4IA
8.0^a	-	-	4.27×10^{-6}
8.5^b	3.61×10^{-5}	2.02×10^{-4}	1.81×10^{-5}
9.0^c	8.09×10^{-4}	1.20×10^{-3}	6.71×10^{-4}
9.5^d	2.37×10^{-3}	-	-

Figura 39. Perfiles de pH para La con los tres ligantes, en la hidrólisis de BNPP en agua.

Condiciones La, ligante 2mM cada uno, TRIS 10 mM, a. pH = 8.06; b. 4-ICA, 8.53; 2-ICA, 8.50; 4-IA, 8.57; c. 4-ICA, 9.04; 2-ICA, 8.97; 4-IA, 8.98; d. pH = 9.52. Con 4-ICA se omitieron algunos puntos por claridad. Las líneas no son ajustes.

Capítulo 6

Conclusiones

1. Se evaluó la actividad catalítica de los sistemas Ln(III)-ligante hacia la hidrólisis del diéster BNPP y se obtuvo que el sistema que presenta la reactividad más sobresaliente es el del ligante 4-ICA, sin embargo los sistemas con 2-ICA y 4-IA llamaron la atención por presentar actividades grandes a valores de pH menores.
2. Se caracterizó mediante titulaciones potenciométricas la composición de los sistemas Ln(III)-4ICA y Ln(III)-2ICA, y para ambos sistemas se encontró que existen hidroxocomplejos del tipo $\text{Ln}_m\text{L}_l(\text{OH})_h$ (Ln = La, $mlh = 111, 224$; Ln = Pr, $mlh = 111, 233, 224$; Ln = Nd, Eu, Dy, $mlh = 233, 224, 215$) cuya existencia, para el sistema con 4-ICA también se apoya en los resultados de las titulaciones espectrofotométricas.
3. Para los sistemas Ln(III)-L, L = 2-ICA, 4-ICA, las especies activas son aquellas con h mayores, es decir las especies con $mlh = 215$ para Nd, Eu y Dy y con $mlh = 224$ para La y Pr. Adicionalmente, en el caso de La(III) también hay una contribución catalítica de la especie $mlh = 111$ y en el de Dy(III) del hidróxido simple $mlh = 101$.

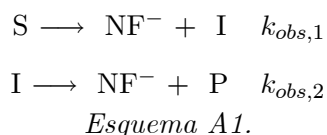
La excepción fue el sistema Eu(III)-2ICA, que presentó una reactividad excepcionalmente alta que correlaciona con la aparición de la especie con $mlh = 224$. En todos los casos, la reactividad varía al variar las condiciones de reacción como pH y concentración total de ion metálico y ligante, aumentando siempre que las condiciones favorezcan la formación de alguna de las especies activas.

4. Dado que se encontró que las especies activas son neutras, la carga total de los complejos es un factor de menor importancia, mientras que la polinuclearidad y la forma de unión con el ligante son factores decisivos para la actividad catalítica.
5. La reactividad intrínseca los sistemas Ln-4ICA depende del ión metálico y sigue el orden de la tabla periódica: $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} > \text{Dy}$. Se propone que esta tendencia se debe a que los complejos aumentan su estabilidad (y por lo tanto disminuyen su reactividad) en el orden contrario, es decir $\text{La} < \text{Pr} < \text{Nd} < \text{Eu} < \text{Dy}$. Para el sistema con 2-ICA la reactividad observada de neodimio fue superior a la de lantano y praseodimio, probablemente debido a dificultades en la estabilidad de las disoluciones con cationes más básicos.
6. El ligante 4-ICA ejerce un efecto inhibitorio en los complejos activos que fue modelado mediante el estudio del efecto de diferentes aniones en la cinética de hidrólisis. El mayor efecto se observó para los aniones planos como acetato y nitrato lo cual se debe posiblemente a que se unen mejor al hueco que se forma en el sitio activo del catalizador.
7. La cinética de hidrólisis de BNPP sigue un modelo de hidrólisis consecutivas con respecto al nitrofenolato monitoreado y la dependencia de la constante de velocidad observada ($k_{obs,1}$) con respecto al nucleófilo es de primer orden. La magnitud de las constantes catalíticas o del nucleófilo (k_{Nu}) para los sistemas con 4-ICA y 2-ICA son del orden de $1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo cual representa una aceleración 5 órdenes de magnitud con respecto a la hidrólisis alcalina, colocándose entre los mejores sistemas de nucleasas artificiales reportados hasta la fecha.
8. Para los sistemas con 4-ICA se modeló la interacción del sustrato con los complejos activos estudiando el efecto del anión DEP en la cinética de hidrólisis y se encontró que se une un sustrato por cada catalizador, probablemente interaccionando a través de sus oxígenos fosforílicos con los dos cationes metálicos de los complejos activos.
9. Debido a que el sistema Ln(III)-4ICA presenta actividad suficientemente alta valdría la pena hacer estudios más detallados con nucleótidos, que constituyen modelos de ADN mucho más realistas.

Apéndice A

Modelo cinético de hidrólisis consecutivas

Las reacciones mostradas en el *esquema 5* se simplifican con el *esquema A1* mostrado a continuación, en donde S es el sustrato (BNPP), NF^- es el nitrofenolato liberado y cuantificado, I es el monoéster intermediario (MNPP) y P es el fosfato inorgánico formado al final de la reacción. De este esquema deriva la ecuación A.1, cuya solución se da en las serie de ecuaciones posteriores A.2-A.8



$$\frac{d[NF^-]}{dt} = k_{obs,1}[S] + k_{obs,2}[I] \tag{A.1}$$

Así se tienen que resolver las ecuaciones para [S], A.2 e [I], A.4 y posteriormente sustituirlas en A.1. La solución de A.2 es directa (ecuación A.3) y nos permite resolver la ecuación A.4, obteniendo una ecuación diferencial no homogénea A.5 que se puede resolver con el método del factor integrante, obteniendo A.6.

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_{obs,1}[S] \quad (\text{A.2})$$

$$[S] = [S]_0 \exp(-k_{obs,1}t) \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{d[I]}{dt} = k_{obs,1}[S] - k_{obs,2}[I] \quad (\text{A.4})$$

$$\begin{aligned} \frac{d[I]}{dt} &= k_{obs,1}[S]_0 \exp(-k_{obs,1}t) - k_{obs,2}[I] \\ \frac{d[I]}{dt} + k_{2,obs}[I] &= k_{obs,1}[S]_0 \exp(-k_{obs,1}t) \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

$$[I] = \frac{k_{obs,1}}{(k_{obs,2} - k_{obs,1})} [S]_0 [\exp(-k_{obs,1}t) - \exp(-k_{obs,2}t)] \quad (\text{A.6})$$

Sustituyendo A.3 y A.6 en A.1 tenemos A.7, que puede integrarse, tomando $[NF^-] = 0$ si $t = t_0 = 0$ obteniéndose A.8.

$$\frac{d[NF^-]}{dt} = k_{obs,1}[S]_0 \exp(-k_{1,obs}t) + \frac{k_{obs,2}k_{obs,1}}{(k_{obs,2} - k_{obs,1})} [S]_0 [\exp(-k_{obs,1}t) - \exp(-k_{obs,2}t)] \quad (\text{A.7})$$

$$[NF^-] = [S]_0 \left[2 + \frac{k_{obs,1} \exp(-k_{obs,2}t) + (k_{obs,1} - 2k_{obs,2}) \exp(-k_{1,obs}t)}{k_{obs,2} - k_{obs,1}} \right] \quad (\text{A.8})$$

Como el nitrofenolato liberado se cuantificó espectrofotométricamente podemos sustituir la Ley de Beer y Lambert en la ecuación A.8 para obtener finalmente la ecuación A.9, que se usó para hacer los ajustes, y fue mostrada en la sección 4.6.1. Nótese la dependencia explícita del coeficiente de absortividad molar con respecto al pH, *vide infra*.

$$A(t) = A_0 + \varepsilon_{NF}(pH)l[BNPP]_0 \left[2 + \frac{k_{obs,1}e^{-k_{obs,2}t} + (k_{obs,1} - 2k_{obs,2})e^{-k_{obs,1}t}}{k_{obs,2} - k_{obs,1}} \right] \quad (A.9)$$

En este punto tenemos dos posibilidades de simplificación de la ecuación A.9. La primera es que $k_{obs,2} \rightarrow 0$. Si esto sucede, llegamos a la ecuación A.10, que en realidad es equivalente a la ecuación A.3 expresada para nitrofenolato, es decir implica que la reacción termina en la primera hidrólisis y sigue entonces una cinética simple de primer orden con la liberación de un equivalente de nitrofenolato ($n = 1$). Esta posibilidad sin embargo es remota, puesto que se sabe que los monoésteres fosfato son generalmente más reactivos que los diésteres (ver *tabla 1*). A pesar de ésto, hubo algunos casos en los que se observó esta situación.

$$A(t) = n\varepsilon_{NF}(pH)[BNPP]_0(1 - e^{-k_{obs,1}t}) \quad (A.10)$$

El segundo caso viene dado por la condición $k_{obs,2} \gg k_{obs,1}$. Si este sucede, tenemos un caso similar al anterior, sin embargo sí se llevan a cabo las dos reacciones, pero la segunda es tan rápida que no se puede monitorear, y es como si tuviéramos que el sustrato directamente produce dos equivalentes de nitrofenolato, correspondiendo también a una cinética de primer orden pero con $n = 2$ en la ecuación A.10. A pesar de que esta opción parece más lógica, en la práctica nunca observamos este tipo de perfil.

Los perfiles de absorbancia contra tiempo que se observan, *figura A1*, tienen dos comportamientos distinguibles: si las reacciones son lentas, la gráfica es lineal y para reacciones más rápidas no se observa un valor de saturación en la curva, a tiempo “infinito” sino que se observa un gradual aumento. Estos comportamientos estan dados por la relación entre las constantes $k_{obs,1}$ y $k_{obs,2}$. Si consideramos

que éstas oscilan entre 10^{-5} y 10^{-3} (el caso más común en este trabajo) entre menor es la relación $k_{obs,2}/k_{obs,1}$ se observa mayor desviación de la linealidad.

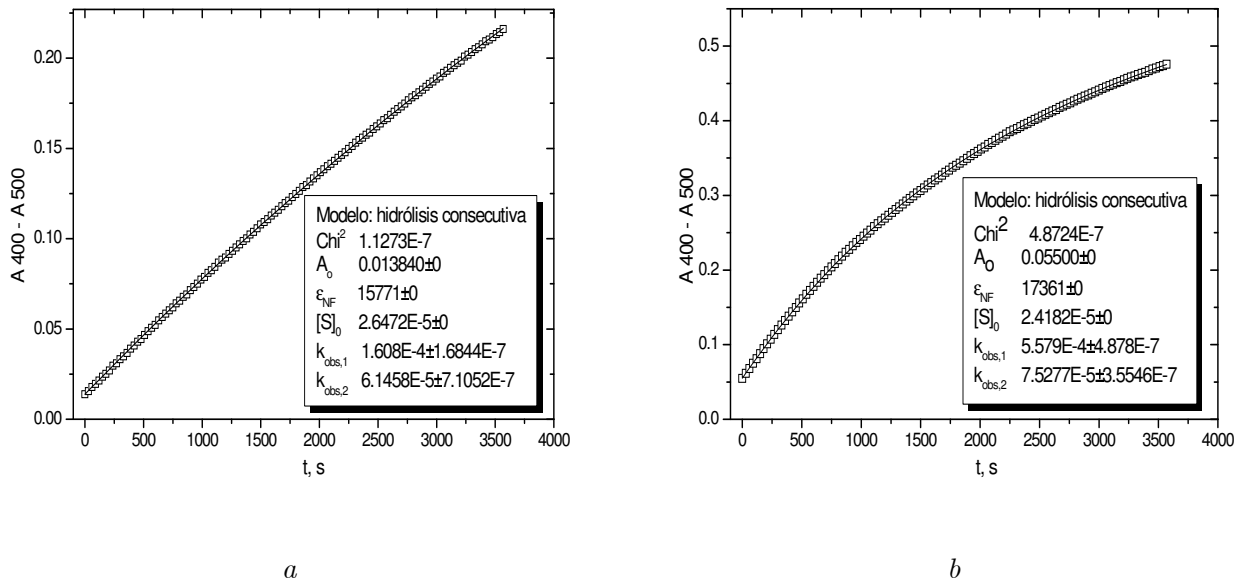


Figura A1. Ejemplos de curvas cinéticas ajustadas de acuerdo con la ecuación A1.9. Los sistemas consisten en Nd, 4-ICA 2mM cada uno, BNPP 0.0274 mM, TRIS 100 mM y cantidades variables de HCl y MeNH₂ para llegar a los pH's deseados, a 25°C. a. pH = 8.05, $k_{obs,2}/k_{obs,1} = 0,382$. b. pH = 8.65, $k_{obs,2}/k_{obs,1} = 0,135$.

Apéndice B

Dependencia de la absorbancia de nitrofenolato con el pH

El equilibrio de protonación del nitrofenolato mostrado en el *esquema 6* está definido por la constante de acidez mostrada en la ecuación B.1.

$$K_a = \frac{[NF^-][H^+]}{[NFH]} \quad (\text{B.1})$$

A 400 nm que fue la absorbancia en la que se realizaron todos los estudios cinéticos, la absorbancia del nitrofenol es 0, por lo que tenemos que la ley de Beer y Lambert es:

$$A = \varepsilon_{NF}l[NF^-] \quad (\text{B.2})$$

Donde ε_{NF} es el coeficiente de absortividad molar cuando la totalidad del nitrofenolato se encuentra desprotonado ($18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Sin embargo, la concentración de nitrofenolato depende del pH. Así, el balance de masas pertinente se muestra en la ecuación B.3:

$$\begin{aligned}
C_{NF} &= [NF^-] + [NFH] \\
&= [NF^-] \left[1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right] = [NF^-](1 + 10^{-pH+pK_a}) \\
&= [NF^-]\alpha_{NF}^H
\end{aligned} \tag{B.3}$$

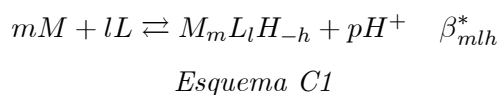
Rearreglando las ecuaciones B.2 y B.3 y despejando para $\varepsilon_{NF}^*(pH)$ obtenemos la ecuación B.4 que es la que se usó para generar la gráfica mostrada en el *esquema 6* de la sección 4.6.1.

$$\varepsilon_{NF}^*(pH) = \frac{\varepsilon_{NF}}{\alpha_{NF}^H} \tag{B.4}$$

Apéndice C

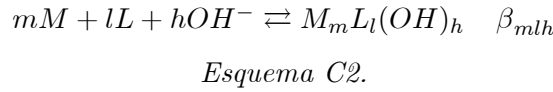
Constantes de formación de hidroxocomplejos en Hyperquad

Las constantes calculadas con el programa Hyperquad son globales, es decir el producto se forma a partir de sus especies libres, sin embargo cuando el complejo final presenta alguna desprotonación con respecto a las especies de los reactivos, el programa no incluye un OH^- en los reactivos, puesto que considera que adicionalmente a la posible desprotonación de agua coordinada, la desprotonación puede provenir de algún ligante. Por eso, la desprotonación de complejos se expresa con un signo negativo en el coeficiente estequiométrico de la especie H^+ . El equilibrio que define las constantes del programa es el que se muestra en el *esquema C1*, y las constantes de formación conforme a este esquema están definidas por la ecuación C.1.



$$\beta_{mlh}^* = \frac{[M_m L_l H_{-h}][\text{H}^+]^h}{[M]^m [L]^l} \quad (\text{C.1})$$

Si en efecto, los protones provienen de la desprotonación de agua coordinada, (como es nuestro caso particular) es decir $M_m L_l H_{-h} = M_m L_l (OH)_h$, las constantes de formación a partir de hidróxido, β_{mlh} -normalmente reportadas en las tablas- se pueden calcular con una relación sencilla. El equilibrio correspondiente a estas constantes es el mostrado en el *esquema C2* y definido a partir de la ecuación C.2.



$$\beta_{mlh} = \frac{[M_m L_l (OH)_h]}{[M]^m [L]^l [OH^-]^h} \quad (C.2)$$

Se puede ver fácilmente que la relación entre β_{mlh} y β_{mlh}^* está dada por la ecuación C.3 o en su forma logarítmica, ecuación C.4.

$$\beta_{mlh} = \frac{\beta_{mlh}^*}{(K_w)^h} \quad (C.3)$$

$$\log \beta_{mlh} = \log \beta_{mlh}^* + hpK_w \quad (C.4)$$

En la *tabla C1* se muestran, para titulaciones con diferentes condiciones, las constantes de formación arrojadas por Hyperquad (β_{mlh}^*) de acuerdo con los modelos propuestos, con sus respectivos parámetros estadísticos.

Tabla C1

[M]	[L]	$\log \beta_{mlh}^*, M_m L_l H_{-h}$								
mM		110	120	130	111	233	224	215	χ^2	σ
La	---	-----	---	-----	-----	-----	-----			
2	3	3.87	6.75		-5.31		-26.1			1.80
2	4	4.05	7.24		-4.86		-25.59			1.79
2	4	3.61	7.07		-5.78		-25.67		16.88	1.79
2	6	3.74	7.39		-4.52		-25.25		2.7	1.42
		3.84 ± 0.09	7.10 ± 0.2		-5.1 ± 0.3		-25.7 ± 0.1			
Pr										
2	2	4.13	7.54		-5.04		-22.11		36.51	1.25
2	3	4.30	7.58		-4.14	-10.85	-22.65		4.72	1.71
2	4	4.05	7.46		-5.57	-11.06	-25.04		5.85	1.61
2	6	4.38	7.81	10.66		-9.79	-22.49		2.65	0.35
2	6	4.14	7.73		-3.70	-11.07			29.04	4.36
		4.20 ± 0.06	7.62 ± 0.06	10.7	-4.6 ± 0.4	-11.0 ± 0.1	-22.4 ± 0.2			
Nd										
1.44	3	4.28	7.79			-9.49		-33.08	16.86	0.54
0.72	4	4.32	7.89	10.36						0.29
2	2					-11.09	-21.93	-35.79		1.43
2	6	3.74	7.93	10.41		-9.21	-22.09	-33.45	15.12	1.17
2	6	4.17	7.88			-9.02	-21.16	-31.92	9.75	1.21
2	4	4.04	7.44			-10.07	-22.58	-34.32	6.58	1.55

[M]	[L]	$\log \beta_{mlh}^*, M_m L_l H_{-h}$								
mM		110	120	130	111	233	224	215	χ^2	σ
2.46	2	4.48					-21.35	-33.45	21.35	2.23
2	1	4.01						-33.92		0.23
2	3	4.13	7.68			-9.65		-34.98	21.00	1.11
4	6	4.22	6.64				-21.29	-32.25	5.98	5.51
		4.22 ± 0.05	7.72 ± 0.08	10.4 ± 0.02		-9.8 ± 0.3	-21.8 ± 0.2	-33.4 ± 0.3		
Eu										
2	2	4.48	7.72			-7.72	-19.41	-31.42		0.38
2	4	4.36	8.16	9.89		-7.68	-19.27	-31.38	18.43	0.48
2	6	4.42	8.14	11.18		-7.41	-18.50	-31.04	11.03	0.42
2.4	2	4.21						-31.82	37.05	2.27
2	3	4.60	7.98			-8.72	-19.23	-31.77	7.69	1.30
3	2	4.38						-31.58	43.69	7.26
		4.4 ± 0.1	8.0 ± 0.2	10.5 ± 0.6		-7.6 ± 0.2	-19.1 ± 0.4	-31.5 ± 0.3		
Dy	---			-----	-----					---
2	3	4.45	8.08			-7.29	-19.16	-31.68	20.06	0.98
2	4	4.44	8.07			-7.67	-19.58	-32.04		1.10
2	6	4.49	8.10	10.80		-7.61	-19.07	-31.83		0.41
		4.46 ± 0.02	8.08 ± 0.01	10.8		-7.5 ± 0.1	-19.3 ± 0.2	-31.8 ± 0.1		

Bibliografía

- [1] Alderlghi L., Gans P. et.al., Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species, *Coord. Chem. Rev.*, **184** (1999) 311-318.
- [2] Basolo F., Parson R., *Mechanisms of Inorganic reactions. A study of metal complexes in solution*, 1a ed., J. Wiley & Sons, E.U. (1958)
- [3] Behrman E. J., Biallas M. J. et.al. Reactions of phosphonic acids esters with nucleophiles *J. Org. Chem.* **25** (1970) 3069-3075.
- [4] Blasko A., Bruice T., Recent studies of nucleophilic, general-acid and metal-ion catalysis of phosphate diester hydrolysis, *Acc. Chem. Res.* **32** (1999) 475-483.
- [5] Bruice, T. C., Benkovic S. J., *Bioorganic Mechanisms* Vol. 2 Benjamin, Nueva York (1966).
- [6] Bunton C. A., Farber S. J., Fendler E. J., The hydrolysis of p-nitrophenyl diphenyl phosphate, *J. Org. Chem.* **33** (1968) 29-33.
- [7] Bünzli J. C., Benefiting from the unique properties of lanthanide ions, *Acc. Chem. Res.* **39** (2006) 53-61.
- [8] Calderón A., Yatsimirsky A., Formation and phosphodiesterolytic activity of lanthanide (III) N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine hydroxo complexes, *Inorg. Chim. Acta.* **357** (2004) 3483-3492.

- [9] Chang C.A., Chen Y.-H., Chen H.-Y., et.al. Capillary electrophoresis, potentiometric and laser excited luminescence studies of lanthanide(III) complexes of 1,7-dicarboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO2A), *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1998) 3243-3248.
- [10] Chang C.A., Wu B.H., Kuan B.Y., Macrocyclic lanthanide complexes as artificial nucleases and ribonucleases: effects of pH, metal ionic radii, number of coordinated water molecules, charge and concentrations of the metal complexes, *Inorg. Chem.*, **44** (2005) 6646-6654.
- [11] Chapon D., Delangle P., Lebrun C., Lanthanides complexes of 1,3,5-trideoxy-cis-inositol: evidence of heterotrimeric species in aqueous solution *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (2002) 68-74.
- [12] Chappell L., L., Voss D. A. et.al. Effect of mixed pendant on the solution and catalytic properties of Europium (III) macrocyclic complexes: bifunctional and monofunctional amide and alcohol pendants in septadentate and octadentate ligands, *Inorg. Chem.*, **37** (1998) 3989-3998.
- [13] Cox J. R., Ramsay O. B., Mechanisms of nucleophilic substitution in phosphate esters, *Chem. Rev.*, **64** (1964) 317-352.
- [14] Feng, G., Mareque-Rivas J. C., Torres Martín de Rosales R., Williams N., A highly reactive mononuclear Zn(II) complex of phosphodiester cleavage, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 13470-13471.
- [15] Gerlt J. A., *Mechanistic Principles of Enzyme-catalyzed cleavage of phosphodiester bonds* en *Nucleases*, Linn S., Lloyd S., Roberts R., Serie Cold Spring Harbor, Nueva York, Ed. Harbor Laboratory Press (1993).
- [16] Gómez-Tagle, P., Yatsimirsky A., Phosphodiester hydrolysis by Lanthanide complexes of Bis-Tris Propane, *Inorg. Chem.*, **40** (2001) 3786-3796.
- [17] Gómez-Tagle, P., Yatsimirsky A., Phosphate ester hydrolysis by yttrium(III) complexes with Bis-Tris propane and Tris ligands, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (2001) 2663-2670.
- [18] Hendry P., Sagerson A., *Metal ion promoted reactions of phosphate derivatives*, en "Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic Chemistry", **38** (1990) 201-259.

- [19] Huskens J., Peters J. et.al. Lanthanide(III)-Catalyzed Synthesis of 2-(carboxymethyl)-2,4-(R)-tricarboxy-1,3-dioxolane and its coordination to lanthanide (III) and calcium (II), *Inorg. Chem.*, **34** (1995) 1756-1763.
- [20] Inomata Y., Takei T., Howell F. S., Synthesis and crystal structure of lanthanide metal complexes with *N, N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine, **318** (2001) 201-206.
- [21] Iranzo, O.; Kovalevsky, A.Y., Morrow J. et.al., Physical and kinetic analysis of the cooperative role of metal ions in catalysis of Phosphodiester cleavage by a dinuclear Zn(II) Complex, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 1988-1993.
- [22] Ives D.J.G., Pryor J.H., The conductimetric evaluation of the ionisation functions of the mono-halogenoacetic acids, *J. Chem. Soc.* (1955) 2104-2114.
- [23] Jeltsch A., Alves J. et.al., Substrate assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (1988) 28-33.
- [24] Jeltsch A., Günter M., Pingoud A., On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*. A detailed proposal based on biochemical results, structural and molecular modeling, *FEBS LETTERS*, **304**(1) (1992) 4-8.
- [25] Jencks W. P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology* Dover Publ., Nueva York (1975).
- [26] Johansson A. y Johansson S., Automatic titration by stepwise addition of equal volumes of titrant, *The Analyst*, Vol. 103 No. 1225 (1978) 305-316.
- [27] Ketelaar J. A., Gersmann H. R., Chemical studies on insecticides VI. The rate of hydrolysis of phosphate esters. *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1967) 2723-2740.
- [28] Kim Y., Franklin S.F., pH dependent phosphate hydrolysis by a lanthanide EF-hand peptide, *Inorg. Chim. Acta* **341** (2002) 107-112.
- [29] Kirby A. J., Jencks, W. P., The reactivity of nucleophilic reagents toward the p-nitrophenyl phosphate dianion, *J. Am. Chem. Soc.* **87** (1965) 3209-3216.

- [30] Komiyama M., Matasamura K., et.al., Unprecedentedly fast DNA hydrolysis by the synergism of cerium (IV) - praseodymium (III) combinations, *Chem. Lett.* (1996) 599-600.
- [31] Kumler W.D., Eiler J.J., The acid strength of mono and diesters of phosphoric acid. The n-alkyl esters from methyl to butyl, the esters of biological importance, and the natural guanidine phosphoric acids, *J. Am. Chem. Soc.* **65**, (1943) 2355-2361.
- [32] Kyogoku Y., Iitaka Y., The Crystal structure of barium triethyl phosphate, *Acta Cryst.*, **21** (1966) 49-57.
- [33] Lange N. A., Dean J.A., *Lange's Handbook of Chemistry*, 11a ed., McGraw-Hill Book Co., E.U. (1973)
- [34] Le Zhang, Buchet R., Azzar G., Phosphate binding in the active site of alkaline phosphatase and the interactions of 2-Nitrosoacetophenone with alkaline phosphatase-induced small structural changes, *Biophys. J.* **86**(6) (2004) 3873-3881.
- [35] Lönnberg H., Strömberg R. y Williams A., Compelling evidence for a stepwise mechanism of the alkaline cyclisation of uridine 3'-phosphate esters, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, (2004) 2165-2167.
- [36] Maldonado A.L., Yatsimirsky A.K., Kinetics of phosphodiester cleavage by differently generated cerium(IV) hydroxo species in neutral solutions, *Org. Biomol. Chem.*, **3** (2005) 2859-2867.
- [37] Martell A. E., *Critical Stability Constants*, Vol. 2, 4, Plenum Press, Nueva York (1975).
- [38] Medrano F., Calderón A., Yatsimirski A., Unusually high phosphodiesterolytic activity of La(III) hydroxide complexes stabilized by glycine derivatives, *Chem. Commun.*, (2003) 1968-1970.
- [39] Mejía-Radillo Y., Yatsimirsky A., Complex formation and kinetics of phosphodiester cleavage in the hydrogen peroxide - lanthanide (III) system *Inorg. Chim. Acta.* **351** (2002) 97-106.
- [40] *The Merck Index*, 9a ed. EE.UU. 1996. CD-ROM
- [41] Messimeri A., Raptopoulou C. P., Nastopoulos V. et.al., Synthesis and physical studies of lanthanide(III) complexes of *N, N*-bis(2-hydroxyethyl)glycinate (bicinate, bicH_2^-): molecu-

- lar and crystal structure of $[\text{Gd}(\text{O}_2\text{CMe})(\text{bicH}_2)(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)\cdot\text{phen}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (phen = 1,10-phenanthroline), *Inorg. Chim. Acta* **336** (2002) 8-18.
- [42] Metzler D., *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living cells*, 2a ed., Vol. 1 Harcourt Academic Press, E.U. (2001)
- [43] Morrow J. R., Amin S. et.al., Synthesis, structure and dynamic properties of the Lanthanum (III) complex of 1,4,7,10-tetrakis(2-carbamoylethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane, *Inorg. Chem.*, **32** (1993) 4566-4572.
- [44] Moss R. A., Zhang J., Bracken K., Extraordinary acceleration of phosphodiester hydrolysis by thorium cations *J. Chem. Soc. Chem Commun.* (1997) 1639-1640.
- [45] Nelson D., Cox M., *Lehninger. Principles of Biochemistry*, 4a. ed. W. H. Freeman and Company, E.U. (2005)
- [46] Oh S. J., Choi Y. S. et.al., Structure and phosphodiesterase activity of Bis-Tris coordinated with lanthanide (III) complexes, *Chem Commun.* (1998) 2189-2190.
- [47] Palm, V. A., Table of rate and equilibrium constants of heterolytic organic reactions, Vol. I, Viniti, Moscow, 1975.
- [48] Peluffo F., Torres J., Kremer C. et.al., Phosphodiesterolytic activity of samarium(III) mixed ligand complexes containing crown ethers and α -amino acids, *Inorg. Chim. Acta* **359** (2006) 2107-2114.
- [49] Piguet C., Bünzli J. C., Mono and polymetallic lanthanide-containing functional assemblies: a field between tradition and novelty, *Chem. Soc. Rev.*, **28** (1999) 347-358.
- [50] Roigk A., Schneider H.-J., Noncovalently cofactors for chemical nucleases, *Eur. J. Org. Chem.*, (2001), 205-209.
- [51] Roigk A., Yescheulova O., Schneider H.-J., et.al., Carboxylic groups as cofactors in the lanthanide-catalyzed hydrolysis of phosphates esters. Stabilities of Europium(III) complexes with Aza-benzo-15-crown-5 ether derivatives and their catalytic activity *vs* Bis-(p-nitrophenyl)phosphate and DNA, *Org. Lett.* Vol. 1, No. 6 (1999) 833-835.

- [52] Schneider H. J., Rammo J., Hettich R., Catalysis of the hydrolysis of Phosphoric acid diesters by lanthanide ions and the influence of ligands, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32** (1999) 457-484.
- [53] Shneider H. J., Yatsimirsky A., A review: In the lanthanides and the interaltions with biosystems Vol. 40 of Metallons in Biological Systems, ed. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, Inc. Nueva York y Basel (2003)
- [54] Serre C., Millange F., Marrot J., et.al., Hydrothermal synthesis, structure determination, and thermal behavior of new three-dimensional Europium Terephthalates: MIL-51_{LT,HT} and MIL-52 or $\text{Eu}_2^n(\text{OH})_x(\text{H}_2\text{O})_y(\text{O}_2\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2)_z$ ($n = \text{III, III, II}$; $x = 4, 0, 0$; $y = 2, 0, 0$; $z = 1, 1, 2$), *Chem. Mater.*, **14** (2002) 2409-2415.
- [55] Siniavskaia, E. I.; Sheka, Z. A., Complejos de tierras raras y torio con dialquilfosfatos, *Radiokhimiya*, **8**, (1966) 410-417.
- [56] Smith M. B., March J., *March's advanced Organic Chemistry*, 5a ed., J. Willey & Sons, E.U. (2001)
- [57] Stephens, E. M., Schoene K., Richardson F. S., Hypersensitivity in the $4f \rightarrow 4f$ absorption spectra of Neodymium(III) complexes in aqueous solution, *Inorg. Chem.*, **23** (1984) 1641-1648.
- [58] Stryer L., *Bioquímica*, 3a. ed. Tomo I, Ed. Reverté, España (1990).
- [59] Tesis doctoral: Estudio cinético de la hidrólisis de ésteres fosfato con participación de complejos de lantánidos con aminoácidos, Antonio Calderón Colín, Facultad de Química, UNAM (2005)
- [60] Tesis doctoral: Substitución nucleofílica en ésteres de ácidos carboxílicos y fosfatos con participación de iones metálicos, Paola Gómez-Tagle Chávez, Facultad de Química, UNAM (2001)
- [61] Tesis de maestría: Catálisis con metales alcalinotérreos en hidrólisis de ésteres fosfato, Olga Tarán Iourova, Facultad de Química, UNAM (2006)
- [62] Torres J., Brusoni M., Kremer C. et.al., Phosphodiesterolytic activity of lanthanide(III) complexes with α -amino acids, *Inorg. Chim. Acta* **358** (2005) 3320-3328.

- [63] Vipond I. B., Baldwin G. S., Halford S. E., Divalent metal ions at the active sites of the *EcoRV* and *EcoRI* restriction endonucleases, *Biochemistry*, **34** (1995) 697-704.
- [64] Wang C., Choudhary S., et.al., Harnessing thorium(IV) as a catalyst: RNA and phosphate diester cleavage by a thorium(IV) macrocyclic complex, *Chem Commun.* (2000) 2509-2510.
- [65] Wang R., Liu H. et.al., Lanthanide coordination with α -Amino Acids under near physiological pH conditions: Polymetallic complexes containing the cubane-like $[\text{Ln}_4(\mu_3\text{-OH})_4]^{8+}$ cluster core, *Inorg. Chem.*, **40** (2001) 2743-2750.
- [66] Wickleder M., Inorganic Lanthanide compounds with complex anions, *Chem. Rev.*, **102** (2002) 2011-2087.
- [67] Williams N., Chin J., A structural and functional model of dinuclear metallophosphatases, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 3341-3348.
- [68] Williams N., Takasaki B., et.al., Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions, *Acc. Chem. Res.* **32** (1999) 485-493.
- [69] Wolfenden R., Ridway C., Young G., Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphatases and phosphodiesterases as catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 833-844.
- [70] Wu S.L., Horrocks W. D.W. Jr., Direct determination of stability constants of lanthanide ion chelates by laser-excited europium(III) luminescence spectroscopy: application to cyclic and acyclic aminocarboxylate complexes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997) 1497-1502.
- [71] Yang, W., Gao J., Kang J., et.al., Complexation and electronic spectra of Neodymium(III)-Amino acid-1,10-Phenanthroline systems in aqueous solutions, *J. Solut. Chem.*, **26** (1997) 105-113.
- [72] Zheng, Z., Ligand-controlled self-assembly of polynuclear lanthanide-oxo/hydroxo complexes: from synthetic serendipity to rational supramolecular design, *Chem Commun.* (2001) 2521-2529.