



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**ESTABILIZACIÓN Y REACTIVIDAD FOSFOESTEREOLÍTICA DE HIDROXOCOMPLEJOS
METÁLICOS EN PRESENCIA DE DISOLVENTES DIPOLARES APRÓTICOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. IRMA SÁNCHEZ LOMBARDO



TUTOR: Dr. Anatoly Yatsimirsky AÑO: 2010



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.

Dedicado a todas las personas que me han ayudado a crear mi esencia.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 213 de la Facultad de Química de la UNAM.

Este trabajo se presentó en los congresos:

XXXVIIIth International Conference on Coordination Chemistry. Jerusalem, Israel. Julio de 2008.

Presentacion Oral en el Simposium: 9th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry. Nápoles, Italia. Diciembre de 2006.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y al Posgrado en Ciencias Químicas.

Al Dr. Anatoly K. Yatsimirsky por su dedicación, paciencia y entrega.

A los miembros del Jurado por sus valiosos comentarios y ayuda para mejorar este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios y la beca mixta.

A DGAPA- UNAM por los proyectos IN204805 y IN203408.

A Janet Morrow por permitirme utilizar su equipo de láser.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Enzimas que promueven la hidrólisis de los ésteres de fosfato: las fosfohidrolasas y nucleasas.....	3
2.2. Origen de la catálisis por enzimas.....	4
2.3. Generalidades ADN y ARN	7
2.3.1. <i>Mecanismos de reacción en las enzimas: ADN polimerasa I (3' - 5' Exonucleasa)</i> ..	8
2.4. Nucleasas Artificiales.....	9
2.4.1. <i>Generalidades</i>	9
2.4.2. <i>Mecanismos de hidrólisis promovida por iones metálicos</i>	10
2.4.3. <i>Nucleasas artificiales que hidrolizan ADN y a su molécula modelo BNPP</i>	13
2.4.4. <i>Agentes mononucleares en agua</i>	14
2.4.5. <i>Sistemas binucleares en agua</i>	22
2.4.6. <i>Estudios de la reactividad fosfoestereolítica en disolventes orgánicos</i>	32
2.5. Hidrólisis de ARN y su molécula modelo HPNPP.....	40
2.6. Destoxificación de Triésteres de fosfato.....	45
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. Objetivo General.....	48
3.2. Objetivos Particulares.....	48
4. Materiales y Métodos.....	49
4.1. Reactivos.....	49
4.2. Determinación de la concentración de lantánidos trivalentes.....	51
4.3. Estudios cinéticos.....	51
4.3.1. <i>Hidrólisis de BNPP</i>	51
4.3.2. <i>Estudios cinéticos con HPNPP</i>	53
4.3.3. <i>Hidrólisis de Difenilfosfato</i>	54
4.3.4. <i>Estudios con Paraoxón</i>	54
4.3.5. <i>Cinéticas de p-nitrofenilfosfato</i>	55
4.4. Estudios Potenciométricos.....	55
4.4.1. <i>Determinación del pK_w en DMSO al 80% v/v a 25 °C</i>	55

4.4.2. <i>Determinación de constantes de hidrólisis de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v a 25 °C</i>	56
4.5. Estudios Espectrofotométricos.....	56
4.6. Titulaciones por RMN ³¹ P.....	56
4.7. Titulaciones por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser.....	57
4.8. Programas de Cómputo.....	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
5.1. Hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de metales de transición en DMSO al 90% v/v.....	60
5.2. Hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de percloratos de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v.....	63
5.3. Hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de triflatos de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v.....	68
5.4. Transesterificación de HPNPP por hidroxocomplejos de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v.....	70
5.5. Transesterificación de HPNPP por el catión Zn(II) en mezclas de disolventes dipolares apróticos.....	71
5.5.1. <i>Transesterificación de HPNPP por Zn(II) y diversos cationes en acetonitrilo</i>	73
5.6. Estimación de las constantes de asociación de La(ClO ₄) ₃ y difenilfosfato.....	75
5.7. Caracterización de las especies presentes en disolución.....	76
5.7.1. <i>Titulaciones potenciométricas de Ln(ClO₄)₃ en DMSO al 80% v/v</i>	76
5.7.2. <i>Titulaciones de Nd(ClO₄)₃ por espectroscopia Uv- visible en DMSO al 80% v/v</i>	80
5.8. Correlación de las constantes de velocidad observadas y las especies responsables de la actividad catalítica encontradas por potenciometría y Uv- vis para los Ln(ClO ₄) ₃	81
5.8.1. <i>Sustrato modelo de ADN el BNPP</i>	81
5.8.2. <i>Sustrato modelo de ARN el HPNPP</i>	85
5.9. Cinética de hidrólisis del triester de fosfato paraoxón por La(ClO ₄) ₃ en DMSO al 80% v/v.....	89
5.10. Eficiencia catalítica y mecanismos propuestos para la hidrólisis de BNPP y HPNPP por hidróxidos de La(ClO ₄) ₃ en DMSO al 80% v/v.....	90

5.11. Caracterización de especies presentes en la mezcla de DMSO al 80% v/v por luminiscencia de Eu(III) inducida por láser.....	98
<i>5.11.1. Titulación de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ y $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ con Me_4NOH por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en DMSO al 80% v/v a 25 °C.....</i>	<i>99</i>
<i>5.11.2. Titulación de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ por potenciometría en DMSO al 80% a 25 °C.....</i>	<i>101</i>
<i>5.11.3. Desconvolución de los espectros obtenidos por fluorescencia de Eu(III) inducida por láser.....</i>	<i>104</i>
<i>5.11.4. Titulación de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ con Me_4NOH en DMSO al 80% por luminiscencia con resolución temporal.....</i>	<i>107</i>
<i>5.11.5. Transferencia de energía resonante entre lantánidos trivalentes.....</i>	<i>110</i>
5.12. Cinéticas de hidrólisis de BNPP y HPNPP por $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C.....	112
6. CONCLUSIONES.....	116
7. REFERENCIAS.....	118
8. Anexos.....	123
8.1. Anexo 1.....	123
8.2. Anexo 2.....	126
8.3. Anexo 3.....	131
9. Artículos.....	132

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ϵ	Absortividad molar
A	Absorbancia
MeCN	Acetonitrilo
a.a.	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
RFI	ADN superenrollado
RFII	ADN en forma circular relajada
ARN	Ácido ribonucleico
Bpy	2,2'-bipiridina
BNPP	bis <i>para</i> -nitrofenilfosfato
[ML] _T	Concentración metal:ligante total
4-ICA	Ácido 4- Imidazolcarboxílico
K21DA	N, N'-Ácido diacético- 1,7- diaza- 4, 10, 13-
DO2A	trioxaciclopentadecano- N, N'- ácido 1,7- dicarboximetil- 1, 4, 7, 10- tetraazaciclododecano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HPNPP	2-hidroxi-4-nitrofenilfosfato o 2-hidroxi- <i>p</i> -nitrofenilfosfato
<i>I</i>	Fuerza iónica
<i>k</i>	Constante de velocidad
<i>k</i> _{non}	Constante de velocidad para la reacción no catalizada
<i>K</i> _m	Constante de Michaelis-Menten
<i>k</i> _{cat}	Constante de velocidad de la reacción catalizada
<i>k</i> _{OH}	Constante de velocidad para la hidrólisis alcalina
<i>k</i> _{obs}	Constante de velocidad observada
T [‡]	Sustrato en el estado de transición
TRIS	2-amino-hidroximetil-propano-1,3-diol

RESUMEN

La actividad fosfoestereolítica de los iones metálicos ha atraído mucho interés y está dirigida al desarrollo de sistemas catalíticos artificiales para la hidrólisis de moléculas como ADN y ARN. En la búsqueda de modos alternativos para incrementar la actividad catalítica, la atención se ha tornado hacia el uso de disolventes no acuosos como medio de reacción. Recientemente se informó que se observa una gran aceleración en la catálisis de la ruptura de ésteres de fosfato por complejos de lantánidos(III) y zinc(II) en metanol anhidro. En el trabajo que se presenta en esta tesis se logró encontrar una aceleración semejante pero empleando medios con contenido relativamente alto de agua (hasta 50% mol), un medio que resulta más favorable para aplicaciones prácticas. Aquí mostramos los resultados de la catálisis por lantánidos en DMSO acuoso. Las cinéticas de la hidrólisis del bis 4-nitrofenilfosfato (BNPP) y 2-hidroxipropil 4-nitrofenilfosfato (HPNPP), sustratos modelos de ADN y ARN respectivamente, en presencia de La(III), Nd(III) y Eu(III) se estudiaron como función de la concentración de base agregada y de la concentración de metal en DMSO 80%-acuoso v/v a 25 °C. La especiación de hidroxocomplejos de La(III), Nd(III) y Eu(III) en DMSO al 80% v/v se estableció por titulaciones potenciométricas, en las cuales se demostró que las moléculas de DMSO sirven como ligantes estabilizadores, protegiendo al ión metálico de su precipitación en forma de hidróxidos neutros e induciendo la formación de hidroxocomplejos predominantemente mononucleares. La comparación de los diagramas de distribución de especies versus los perfiles de pH de las constantes de velocidad para las reacciones hidrolíticas muestran que para el caso de BNPP las especies catalíticas son del tipo $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Ln}(\text{OH})_3$, mientras que con HPNPP la especie activa es del tipo $\text{Ln}(\text{OH})_3$. La reacción procede vía reacciones de segundo o tercer orden cinético, indicando que las especies activas reales deben ser hidroxocomplejos binucleares o trinucleares.

En este trabajo discutimos también los resultados del estudio de especiación del triflato de Eu(III) en DMSO al 80% v/v por la técnica de espectroscopia de luminiscencia por excitación directa y estudios con resolución temporal, los cuales en combinación con los datos potenciométricos proveen una mejor aproximación de cuáles son las especies activas ante la hidrólisis de diferentes diésteres de fosfato.

Las constantes de primer orden observadas para la ruptura de BNPP y HPNPP en presencia de La(III) en concentración de 1mM a pH alrededor de 10 (pH de neutralidad en

DMSO al 80% es 9.75) son 10^3 veces mayores que en agua, y el efecto catalítico 10^{11} observado respecto de la reacción no catalizada en las mismas condiciones es muy parecido a aquél que proveen las enzimas naturales.

ABSTRACT

The phosphodiesterolytic activity of metal ions attracted significant attention in connection with development of artificial DNA and RNA cleavage catalysts. A greatly improved performance of lanthanides and Zn(II) complexes was recently reported in non-aqueous media, mainly anhydrous methanol. Here we report the results of a study of lanthanide catalysis in a more practical medium aqueous DMSO. Kinetics of the hydrolysis of bis (4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) and 2-hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate (HPNPP), in the presence of La(III), Nd(III) and Eu(III) were studied as a function of concentrations of added base and metal in aqueous 80% v/v DMSO at 25 °C. The composition and stability of hydroxocomplexes in solution were determined by potentiometric titrations. Comparison of the species distribution diagrams with pH profiles for the rate constants of hydrolytic reactions showed that in the case of BNPP the active species are $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ and $\text{Ln}(\text{OH})_3$, while with HPNPP the active species are $\text{Ln}(\text{OH})_3$. The reactions proceed via a second- or even third-order kinetics indicating that real active species must be bi- or trinuclear hydroxo complexes.

In this work we also report the results of direct excitation luminescence studies of speciation of Eu(III) triflate in 80% DMSO, which in combination with potentiometric data provide a more reliable picture of lanthanide hydrolysis under these conditions.

Observed first-order rate constants for the cleavage of BNPP and HPNPP in the presence of 1 mM La(III) at pH about 10 (the neutrality pH in 80 % DMSO is 9.75) are 10^3 time higher than in water and the observed catalytic effect 10^{11} is close to that observed in anhydrous solvents and with the natural enzymes.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de moléculas de bajo peso molecular, que funcionen como nucleasas químicas está relacionado con la hidrólisis catalítica de ésteres de fosfato y ha llamado la atención durante los últimos años por su importancia en los sistemas biológicos y ambientales. [1,2] Entre los triésteres de fosfato y compuestos análogos hay un gran número de sustancias tóxicas que se utilizan como herbicidas, insecticidas o armas químicas y la hidrólisis es el único método efectivo de destoxificación [3,4], ya que, el empleo de otros medios de destrucción (p. ej. pirólisis) pueden producir sustancias de toxicidad semejante o mayor. Por otro lado, los enlaces fosfodiéster se encuentran en las cadenas que conforman los ácidos ribonucleico (ARN) y desoxirribonucleico (ADN) y son altamente estables a la hidrólisis: a pH 7.0 y 25 °C sus tiempos de vida media están estimados en 200 millones de años para ADN y en 100 años para ARN (la diferencia principal de reactividad entre ambos ácidos nucleicos es la presencia del sustituyente 2'-OH de la ribosa en el ARN que actúa como un nucleófilo intramolecular y promueve su hidrólisis). [5] De hecho, se ha sugerido que la enorme estabilidad de los fosfodiésteres es una de las razones para que los ácidos nucleicos sean los responsables de almacenar la información genética. [6] Por ello, una de las etapas principales para la manipulación del material genético es la hidrólisis de estos poliácidos. Igualmente en la actualidad hay un gran interés en el desarrollo de nucleasas químicas [7-9] capaces de romper los enlaces fosfoéster de los ácidos nucleicos en condiciones cercanas a las fisiológicas. Existen en la naturaleza, muchas enzimas que promueven la hidrólisis de ésteres fosfato las cuales poseen sitios activos que contienen uno, dos ó más iones metálicos tales como Mg(II), Ca(II), Fe(III), ó Zn(II). Éstos pueden actuar como ácidos de Lewis en procesos catalíticos. El desarrollo de catalizadores sintéticos para estos procesos está inspirado en gran medida por analogía con estructuras y mecanismos de acción de las metaloenzimas; entre los aspectos más importantes a modelar tenemos [10-12]: 1) la coordinación del nucleófilo (agua) con un ion metálico que induce su desprotonación, 2) la estabilización electrostática del estado de transición por parte del ión metálico y de los grupos catiónicos de aminoácidos (arginina, lisina) de la apoenzima, 3) la donación del protón al grupo saliente.

Las nucleasas naturales se usan ampliamente para el manejo de ácidos nucleicos. Sin embargo, hay ciertas restricciones importantes en el uso de enzimas naturales. Las nucleasas

“reconocen” secuencias de 2-3 nucleótidos y por esto rompen el ADN en fragmentos demasiado cortos. El uso de “nucleasas artificiales” en combinación con polinucleótidos sintéticos complementarios a secuencias largas de 10-15 nucleobases podrá permitir su ruptura en fragmentos más largos, lo cual es muy importante para descodificar la información genética. Por otro lado, la técnica de “foot-printing” para la determinación de los sitios de interacción de ADN con proteínas requiere una ruptura de ADN no específica pero completa; que es más fácil de realizar usando “nucleasas artificiales”. Además, se espera que los agentes químicos capaces de fraccionar ADN en condiciones fisiológicas puedan tener aplicaciones en medicina como fármacos contra cáncer.

Entre las nucleasas químicas más activas se encuentran los iones y complejos de lantánidos que logran la aceleración de la hidrólisis de fosfodiésteres por un factor de hasta 10^8 . [13] Sin embargo, para usos prácticos es indispensable alcanzar todavía una mayor eficiencia y lograr factores de aceleración de 10^{12} - 10^{16} .

En estudios recientes se ha demostrado que el empleo de medios de reacción de polaridad reducida incrementa notablemente la eficiencia catalítica de los iones y complejos metálicos en la ruptura de ésteres fosfato. El uso de metanol anhidro como disolvente permite lograr una aceleración hasta 10^{12} en presencia de complejos de Zn(II) [14] y Cu(II) [15]. Sin embargo, este medio de reacción es muy impráctico, en particular, debido a la drástica disminución de la reactividad en presencia de trazas de agua; además, el proceso químico en metanol no es de hidrólisis sino de metanólisis, es decir, de transesterificación, por lo que se transforma un éster fosfato en otro sin solucionar el problema de destoxificación en el caso de triésteres y sus análogos. Los estudios que se están realizando en nuestro grupo están enfocados al uso de mezclas acuosas de disolventes apróticos (DMSO, DMF, MeCN) como medios de reacción, lo cual permite que se lleve a cabo el proceso hidrolítico sin necesidad de secar profundamente el disolvente orgánico. En particular se demostró que es posible lograr efectos similares a los observados en metanol anhidro empleando mezclas DMSO-agua que contienen hasta un 20% de agua por volumen con metales alcalinos y alcalinotérreos como catalizadores de la hidrólisis de fosfodiésteres. [16] El propósito principal de la tesis es extender estos estudios a metales de transición y lantánidos. Desde un aspecto básico, es de gran interés establecer los factores que fortalecen la catálisis en estos medios ya que los medios con bajo contenido de agua reproducen el microambiente de los sitios activos de las enzimas naturales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enzimas que promueven la hidrólisis de los ésteres de fosfato: las fosfohidrolasas y nucleasas

En la naturaleza las enzimas encargadas de la hidrólisis de los enlaces de ésteres de fosfato en moléculas como aminoácidos ó sacáridos fosforilados, nucleótidos, ADN y ARN son: las fosfatasas y nucleasas. Las funciones biológicas de estas enzimas van desde la degradación de los biopolímeros, hasta la modificación de ácidos nucleicos, reparación de ADN y defensa ante los virus (enzimas de restricción). [17] Estas enzimas poseen una variedad de estructuras, grupos funcionales, y mecanismos para llevar a cabo la hidrólisis, pero utilizan los grupos funcionales de aminoácidos y/o la acidez de los metales para catalizar la hidrólisis selectiva de estos enlaces bajo condiciones fisiológicas. [12]

La naturaleza, al utilizar uno o la combinación de dos o más metales en los sitios activos de las enzimas que catalizan la hidrólisis de los diferentes ésteres de fosfato, creó metaloenzimas altamente eficientes; ejemplos de éstas son la inositol monofosfatasa y la fructuosa bifosfatasa que poseen heterodímeros de Zn^{2+} y Mg^{2+} en sus sitios activos. Podemos nombrar una gran cantidad de ejemplos en los que la cooperatividad entre los centros metálicos y/o los diferentes residuos de aminoácidos hace de la catálisis por estas enzimas procesos que se llevan a cabo en fracciones de segundo y que sin ellas, tendrían lugar en varios años.

En la actualidad existe un notable interés en el estudio de este tipo de enzimas, en particular sobre el rol que desempeñan los iones metálicos en la aceleración de la reacción, pues dicho papel no está bien elucidado ya que los iones biológicamente activos generalmente son lábiles y espectroscópicamente silenciosos, lo que hace difícil la identificación de la esfera de coordinación del ión metálico. En la naturaleza, los iones metálicos que encontramos en las enzimas que hidrolizan el enlace P-O son Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} . Este último de los enlistados es el único ión metálico con propiedades redox. [18] El Mg^{2+} es el ión metálico estrella, catalíticamente activo, por su alta densidad de carga (Tabla 1), y por ser el ácido más duro de los iones metálicos comúnmente presente en los sistemas biológicos, haciéndolo perfecto para poder enlazar a los dos oxígenos duros de los diésteres de fosfato que conforman el esqueleto del ADN. Otro metal importante es el Zn^{2+} , el cual también es un ácido duro e intercambia ligantes muy rápidamente en agua (Tabla 1), y al tener la capa d completa (d^{10}) no requiere gasto de energía

para la estabilización del campo de los ligantes, ni para el cambio de geometría, lo cual es favorable para disminuir la energía de activación, debido a la estabilización del estado de transición y da lugar a una catálisis eficiente. [19]

Tabla 1. Propiedades físicas y cinéticas de algunos metales biológicamente relevantes. ^a Constantes de velocidad para la sustitución de agua de los aquaiones. [19]

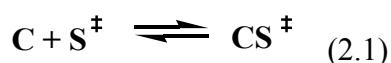
Ión	Densidad de carga (Z/r)(Å) ⁻¹	k _{sub} (s ⁻¹) ^a
Mg ²⁺	3.0	10 ^{5.1}
Ca ²⁺	2.0	10 ^{8.4}
Mn ²⁺	2.5	10 ^{6.6}
Fe ²⁺	2.7	10 ^{6.1}
Co ²⁺	2.8	10 ^{5.3}
Ni ²⁺	2.9	10 ^{4.2}
Cu ²⁺	2.8	10 ^{9.3}
Zn ²⁺	2.7	10 ^{7.4}
La ³⁺	2.8	10 ^{7.9}
Ce ³⁺	2.9	10 ^{7.9}
Eu ³⁺	3.2	10 ⁷ - 10 ⁸

Las reacciones de transferencia de grupos fosforilo son extremadamente lentas, pero las fosfatasa pueden proveer un aumento en la velocidad (k_{cat}/K_m) mayor a 10^{20} sobre la reacción no catalizada (k_{non}). La catálisis por estas enzimas sucede vía un estado de transición; en dicho estado las interacciones que el sustrato presenta con el sitio activo de la enzima son diferentes que en el estado basal. [20]

2.2. Origen de la catálisis por enzimas

En la mayoría de las reacciones de adición y/o de desplazamiento catalizadas por enzimas algunas preguntas esenciales son: ¿cuáles son los grupos donadores y cuáles los aceptores en la transferencia de protón?, ¿cuál es la estructura del estado de transición entre los reactivos y productos? [21] Una posible respuesta a la última pregunta es que mientras mayor sea la aceleración de la reacción que catalizan, mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato "alterado" en el estado de transición, en comparación con la modesta afinidad de ésta por el sustrato en el estado basal. [22] De este modo podemos asociar a la catálisis como una especie de reconocimiento molecular, que el sitio activo de la enzima hace al estado de transición, dicho

reconocimiento es dinámico, responde al cambio en la distribución de carga del sustrato "alterado", lo que se logra mediante la formación y ruptura de enlaces, algunas veces covalentes. [23] Esta teoría del estado de transición es útil tanto para ver a las enzimas como hospederos moleculares, como para hacer cálculos de constantes de estabilidad del estado de transición unido al metal (catalizador). Mediante la ecuación 1, donde C es el sitio activo de la enzima y S^\ddagger el sustrato en el estado de transición, podemos analizar a la catálisis por metales (sitio activo de la enzima) como un equilibrio químico, en donde el sustrato en el estado de transición puede ser visto como un ligante para el metal.



Así visto la ecuación (2.1) es una aproximación teórica que sirve para calcular ciclos termodinámicos como el de la Fig.1, y valores de constantes de estabilidad de compuestos de coordinación, los cuales podemos asociar a reactividad y a la actividad catalítica. Esta aproximación se limita a los casos en que la catálisis por iones metálicos ocurre a través de una activación por ácido de Lewis, o mediante la estabilización del grupo saliente, entre otros, pero no se puede utilizar en el caso de la formación de nuevos intermediarios con enlaces covalentes, como en los sistemas catalíticos de tipo organometálico. El ciclo termodinámico que se muestra en la Fig.1 presenta dos pseudo-equilibrios reales, provenientes de la formación del estado de transición vía la reacción no catalizada (ΔG_0^\ddagger) o de la reacción catalizada (ΔG_C^\ddagger). Con ello podemos asociar un cambio de energía libre y una constante de equilibrio a la reacción putativa que describe la ecuación 2.1. [24]

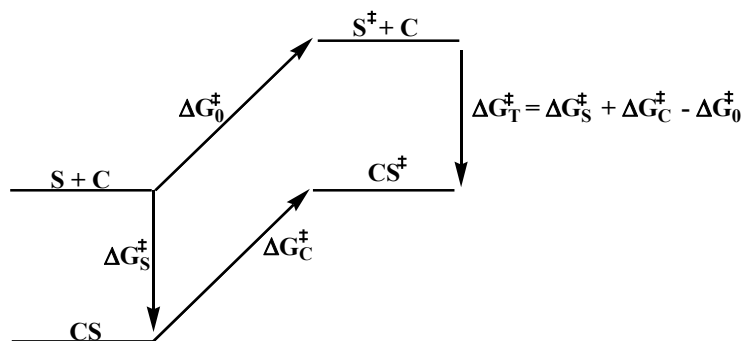


Fig.1 Diagrama de energía libre para la reacción catalítica de un sustrato. [24]

Numerosos factores contribuyen a la diferencia en energía libre entre el sustrato (S) y la enzima (C), cuando se encuentran separados (S+C) y al encontrarse unidos (CS). Entre ellos podemos nombrar las interacciones específicas entre enzima y sustrato y a los efectos polares en el centro activo, balanceados por los componentes entrópico y entálpico, dados por la solvatación de ambos componentes. [25] La habilidad de las enzimas para reducir la entalpía de activación de las reacciones que catalizan, se puede entender en términos de interacciones más fuertes del estado de transición con el sitio activo de la enzima. Dichas interacciones son del tipo electrostáticas, o de enlace de hidrógeno, y también contribuye la liberación de moléculas de agua del centro activo de la enzima al medio. [20] Para un estado de transición polar y/o cargado no es obvio cómo es que la enzima provee un efecto de estabilización electrostático mayor que el del agua. En disolventes polares alrededor de la mitad de la energía ganada en la interacción ión-dipolo ($\Delta G_{Q\mu}$) se pierde en la forma de interacción dipolo-dipolo ($\Delta G_{\mu\mu}$) representada por la energía de reorganización del disolvente, tratando de orientar los dipolos para una interacción más eficiente con el estado de transición. Es por ello que las enzimas poseen estructuras en las que los dipolos se encuentran pre organizados en sus centros activos (Fig.2), lo que las hace energéticamente más eficientes, reduciendo el ΔG^\ddagger . [26]

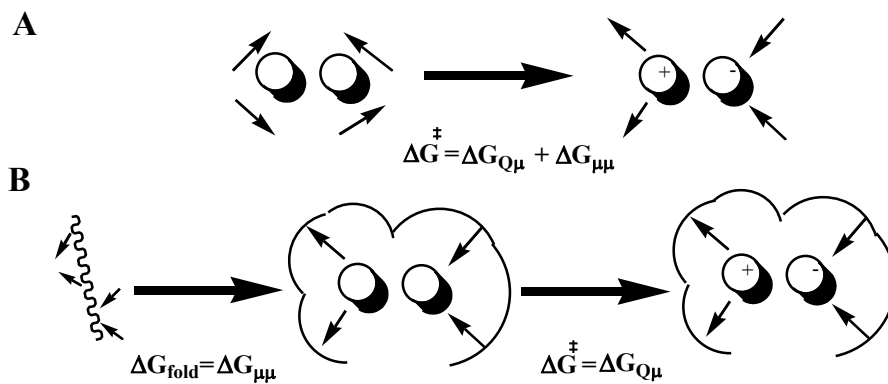


Fig.2 Origen de la catálisis por enzimas a) En agua como se orienta el disolvente, b) En el centro activo de las enzimas los dipolos se encuentran pre organizados. [26]

La velocidad de muchas reacciones polares está marcadamente influenciada por la constante dieléctrica del medio y por la organización del disolvente en el que se lleva a cabo. Por ello el cambio de solvatación del sustrato al entrar al sitio activo de la enzima, tiene una gran repercusión en la constante de velocidad. [27] Esto se explica con la hipótesis de que la

desolvatación desestabiliza a las moléculas en el estado de transición (ET) si éste es polar; es decir, el ET será menos estable en sitios no polares que en agua. [26]

2.3. Generalidades de ADN y ARN

Las moléculas encargadas de guardar la información genética de los seres vivos, los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) (Fig.3), son especialmente resistentes a la hidrólisis de sus enlaces fosfodiéster en medio fisiológico a 25 °C y pH = 7. El tiempo de vida media estimado para el ADN es de 4 billones de años y 110 años en el caso de ARN. [28] El ARN es mucho más reactivo que el ADN ya que posee un nucleófilo intramolecular en su estructura.

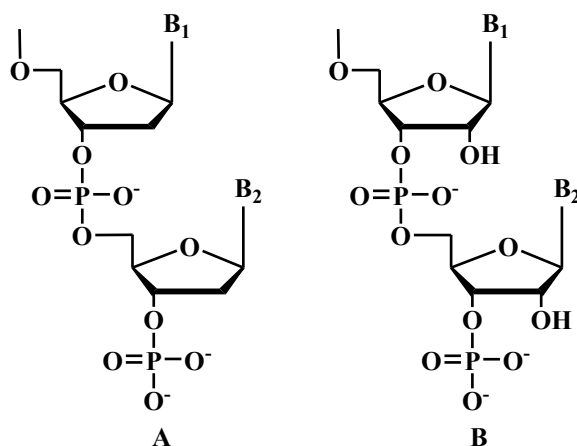


Fig. 3 Estructura de los diésteres de fosfato A) ADN y B) ARN

La hidrólisis de los diésteres de fosfato, entre ellos el ADN y ARN, involucra el ataque nucleofílico al átomo de fósforo, por el átomo de oxígeno del agua o del ión hidróxido (Fig.4), para dar un intermediario pentacoordinado (estado de transición), y la subsecuente expulsión de un grupo alcohol (o alcóxido). Dependiendo de la estructura del sustrato, el paso determinante en la velocidad será el ataque nucleofílico o la ruptura del intermediario. [18]

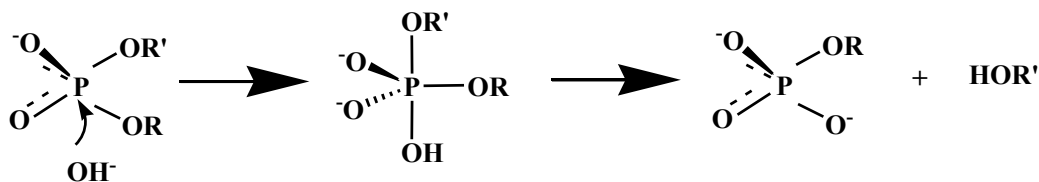


Fig. 4 Mecanismo de hidrólisis de fosfodiéster por hidróxido como nucleófilo

Se sabe que las nucleasas pueden hidrolizar al enlace P-O en fracciones de segundo. [19] De este hecho surge el interés en el estudio de estas enzimas, tanto para entender sus mecanismos de reacción como en el de crear moléculas catalíticamente eficientes que funcionen como nucleasas artificiales; es decir, moléculas de bajo peso molecular que mimeticen los sitios activos de las enzimas para aplicaciones biomédicas y ambientales. Dentro de las nucleasas que se han estudiado ampliamente, podemos nombrar a la ADN polimerasa I, EcoRV endonucleasa, Transcriptasa reversa y las Ribozimas.

2.3.1. Mecanismos de reacción de las enzimas: ADN polimerasa I (3' - 5' Exonucleasa)

Las polimerasas son enzimas cuya función es la de catalizar la replicación y la síntesis de la cadena de ADN y ARN; se han caracterizado un gran número de polimerasas, por ello se han dividido en 3 grandes grupos: ADN polimerasa, ARN polimerasa y transcriptasa reversa. El Mg^{2+} es un cofactor esencial para estos tres grupos de enzimas y juega distintas clases de papeles en la catálisis. [11] La enzima DNA polimerasa I que cataliza la transferencia de nucleótidos de 3' - 5', corrigiendo con ello los errores en la replicación del ADN, pertenece a las metaloenzimas que hidrolizan a los diésteres de fosfato vía un mecanismo que involucra a dos iones metálicos. Para que esta fosfodiesterasa realice su función requiere de iones metálicos dipositivos como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Los productos de la hidrólisis de esta enzima son: desoxinucleósido 5'-monofosfato, y el hidróxilo 3' libre del fragmento de esqueleto de ADN, con inversión en la estereoquímica del fósforo. El mecanismo para la actividad de la DNA polimerasa (3' - 5') se ha propuesto con base en las estructuras cristalinas de los complejos: enzima-sustrato (E·S) y enzima-producto (E·P). Es de resaltar la dependencia que presenta la actividad de la fosfatasa con respecto al pH, ya que, aunque se necesitan dos iones metálicos para llevar a cabo la hidrólisis (Fig.5), se sabe que sólo uno está fuertemente unido al sitio activo de la enzima (M_A); este ión metálico presenta en su esfera de coordinación moléculas de disolvente que junto con los residuos de Glu 357 y Tyr 497 ayuda a reducir el pK_a del agua unida al metal ($pK_a \cong 9.8$) produciendo el nucleófilo capaz de atacar al fósforo vía un mecanismo de hidróxido unido al metal. [12] Este supuesto es tema de debate ya que algunos autores proponen un mecanismo de hidróxido externo, en el cual el hidróxido que actúa como nucleófilo está estabilizado electrostáticamente por el ión metálico. [11]

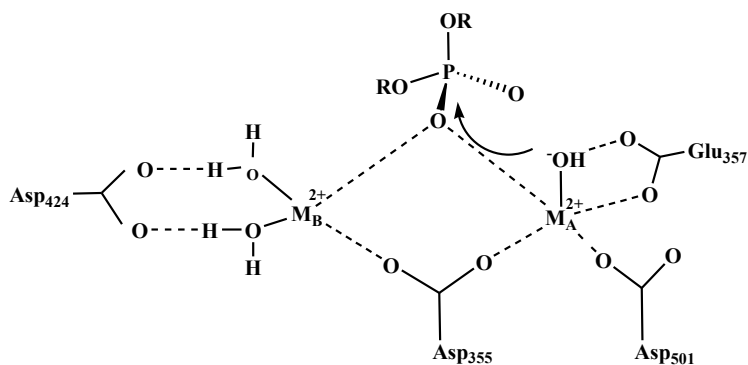


Fig. 5 Representación esquemática de los sitios de unión de la DNA polimerasa 1, el M_A es el ión metálico que lleva a cabo tanto la unión como la catálisis. [11]

En lo que sí existe acuerdo, es en afirmar que otro tipo de nucleasas como VIH-transcriptasa reversa, EcoRV endonucleasa, utilizan al ión Mg^{2+} como cofactor y que sólo un ión metálico es esencial para la unión y la catálisis del sustrato, aunque exhiban otro tipo de mecanismos. Aunado a estas enzimas capaces de hidrolizar a los ácidos nucleicos, existen ciertas secuencias de ARN que con la ayuda de los iones metálicos o sin ellos pueden llevar a cabo reacciones de transferencia de grupos fosforilo, entre ellas la hidrólisis del enlace fosfodiéster, estas enzimas se conocen como ribozimas.

2.4. Nucleasas Artificiales

2.4.1. Generalidades

La naturaleza ha creado enzimas capaces de llevar a cabo reacciones de hidrólisis de ADN y ARN en menos de un segundo, y por ello es de esperar la atracción de los científicos por estudiar los mecanismos de reacción de estas enzimas en solución. La información que se presentó con anterioridad proviene generalmente de estructuras de rayos X, de estudios con iones que presentan propiedades espectroscópicas como Co^{2+} y Cu^{2+} ó de iones cinéticamente inertes ante el intercambio de ligantes como Ir^{3+} y Co^{3+} . [29,30] Por lo cual existe polémica ante la evidencia que apoya un mecanismo u otro, dado que, por lo general se basan en mediciones indirectas y no en estudios del centro activo de la enzima. Por ello, el interés de crear moléculas de bajo peso molecular pero con actividad catalítica ante la hidrólisis de los diferentes ésteres de fosfato. Con ello el estudio de los mecanismos que utilizan las nucleasas artificiales facilitará el entendimiento de los mecanismos que rigen los procesos enzimáticos dentro de las células. Una

de las aplicaciones más dramáticas de estas nucleasas artificiales es su uso como enzimas de restricción. [19] Para lo cual dichos sistemas requerirán de una alta actividad catalítica $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}} \cong 10^{12}$ [31] y deberán presentar selectividad ante las bases nitrogenadas. Aunado a esto, se busca hacer más versátiles las aplicaciones de las nucleasas artificiales y otra utilidad importante es su uso como destoxificadores tanto de pesticidas como de armas biológicas cuyas estructuras son triésteres de fosfato.

2.4.2. Mecanismos de hidrólisis promovida por iones metálicos

El desarrollo de agentes artificiales basados en complejos metálicos para activar el enlace fósforo-oxígeno e hidrolizar ésteres de fosfato de diferentes clases ha atraído la atención de diversos grupos de investigación en los últimos 20 años. Para que un ión metálico funcione como catalizador debe ser un ácido duro, llevar a cabo procesos de sustitución de ligantes muy rápidamente (Tabla 1), deberá tener preferentemente números de coordinación grandes y sitios de coordinación vacantes en posición *cis* (para poder enlazar al sustrato y al nucleófilo) garantizando su proximidad. Los metales preferidos para el diseño de estos agentes artificiales son Zn^{2+} y Cu^{2+} , los cuales presentan geometrías definidas, alta densidad de carga, son ácidos de Lewis y son biológicamente relevantes (Tabla 1). Se sabe que la catálisis en las reacciones de hidrólisis ya sea por iones metálicos y/ o por grupos orgánicos funcionales es promovida mediante alguno de estos modos:

- Activación electrostática del sustrato en el estado basal o en el estado de transición por un ión metálico coordinado, enlace de hidrógeno o transferencia de protón.
- Estabilización del grupo saliente por la coordinación con el ión metálico, enlace de hidrógeno o transferencia de protón.
- Ataque nucleofílico del sustrato por grupos funcionales o por un hidróxido coordinado al metal, el cuál es generado a pH neutro por activación de ácido de Lewis de una molécula de agua coordinada al metal.
- Generación del nucleófilo por abstracción del protón con un grupo básico. [17]

Una gran cantidad de complejos metálicos: mononucleares, binucleares y trinucleares, se han empleado como modelos estructurales o funcionales de las nucleasas; sin embargo, quedan pasos dentro de la ruta mecanística que no están bien determinados, ya que los iones metálicos

pueden realizar una amplia variedad de papeles. Existen tres modos de activación directa (mecanismos de esfera interna) que un ión metálico puede proveer para acelerar la hidrólisis de los ésteres de fosfato (Fig.6):

1. Activación por ácido de Lewis, en la cual el oxígeno u oxígenos del éster de fosfato se coordinan al metal.
2. Activación Nucleofílica, se caracteriza por la coordinación del nucleófilo al metal.
3. Activación del grupo saliente, en este caso, el oxígeno del grupo saliente se coordina al metal.

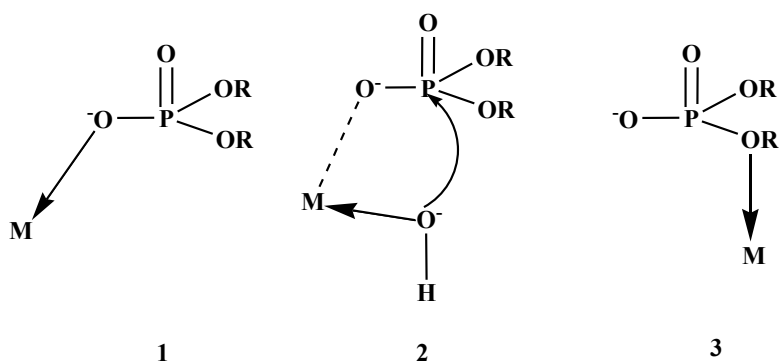


Fig. 6 Mecanismos de esfera interna para la hidrólisis de ésteres fosfato promovida por iones metálicos.

También existen tres mecanismos en los que la activación por el ión metálico se hace de modo indirecto [5], conocidos como mecanismos de esfera externa (Fig. 7):

1. Catálisis básica general, en ésta participan los hidróxidos coordinados al metal.
2. Catálisis ácida general promovida por un agua coordinada al metal.
3. Interacciones electrostáticas entre el metal y el éster de fosfato no coordinado.

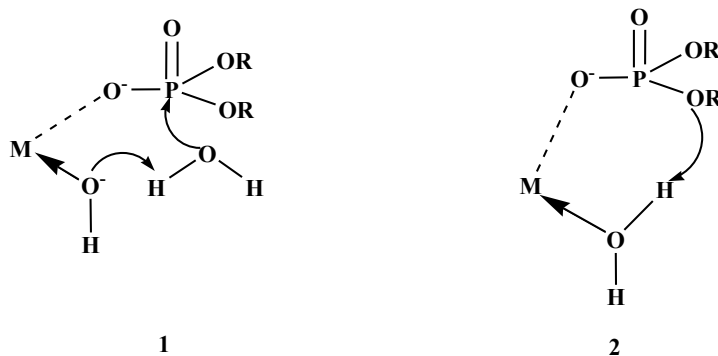


Fig. 7 Mecanismos de esfera externa para la hidrólisis de ésteres fosfato promovida por iones metálicos.

En la hidrólisis catalizada por complejos binucleares o trinucleares, puede haber mezcla en el modo de activación por cada ión metálico, por lo cual es importante distinguir y además cuantificar de dónde proviene la aceleración que dichos iones metálicos proveen; es decir, qué papel desempeña el ión M_1 y si será diferente del rol del ión M_2 . Por ello ahondaremos en el modo de activación por doble ácido de Lewis, en el cuál se pueden presentar tres casos con dos centros metálicos (Fig. 8). Se sabe que los fosfatos pueden formar un puente entre los metales, de ahí surge la activación por doble ácido de Lewis, al unirse los dos oxígenos del fosfato a diferentes centros metálicos, sin embargo, es complicado cuantificar la doble activación por ácido de Lewis, ya que, puede envolver la suma de activación sencilla por ácido de Lewis más: a) activación por hidróxido unido al metal, b) activación del grupo saliente. Estos tres mecanismos son cinéticamente indistinguibles en presencia de metales lábiles ante la sustitución, ya que las tres especies pueden estar en equilibrio antes de realizar la hidrólisis.

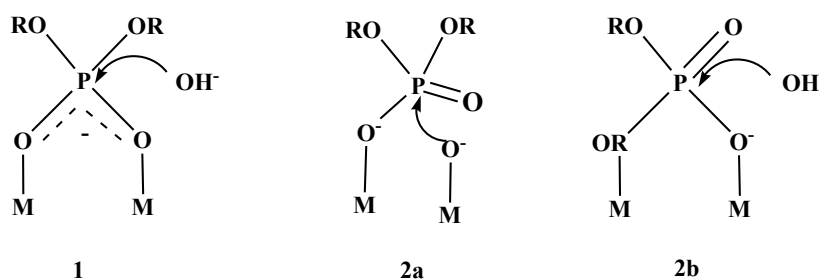


Fig. 8 Mecanismos por doble activación de ácido de Lewis: 1) Doble activación por ácido de Lewis, 2a) Activación sencilla por ácido de Lewis mas activación por un hidróxido unido al metal, 2b) Activación sencilla por ácido de Lewis mas activación del grupo saliente

En general, podemos cuantificar los modos de activación con el efecto de la aceleración que proveen en la reacción de hidrólisis, es decir, podemos sostener que si la aceleración se debe a la activación por ácido de Lewis dará un incremento en la velocidad de $\cong 10^2$; en el caso de activación del nucleófilo el aumento en la velocidad será de $\cong 10^8$ y si es por activación del grupo saliente el incremento en la velocidad es de $\cong 10^6$. Si combinamos los tres modos, ya que, pueden ser aditivos, el aumento en la velocidad será de 16 órdenes de magnitud para la reacción de hidrólisis de los diésteres de fosfato, lo que significa disminuir el tiempo de vida media del ADN de diez billones de años a 10 minutos a pH 7 y 25°C. [5]

La ruptura de ésteres fosfato se puede realizar mediante procesos hidrolíticos ó por procesos oxidativos que por lo general son más rápidos. La vía hidrolítica tiene muchas ventajas

para su aplicación, ya que elimina los radicales producidos al inducir la ruptura mediante iones metálicos y oxidantes muy fuertes como el peróxido de hidrógeno, dichos radicales pueden difundirse y causar daño a las bases nitrogenadas o a la ribosa. [32] En cambio, los agentes que realizan la hidrólisis del ARN liberan los fragmentos 3' o 5' del fosfato terminal, la base nitrogenada y el anillo de ribosa sin dañarlos, los cuales pueden volver a ser enlazados al esqueleto del ARN por las ligasas. Por ello, la mayoría de los modelos que promueven la hidrólisis de ésteres de fosfato están inspirados en las enzimas naturales. Uno de los aspectos que tienen en común las metalohidrolasas naturales y las sintéticas es la diversidad estructural de los sitios activos, ambas utilizan uno o más centros metálicos para llevar a cabo su función, pero la gran diferencia radica en que la mayoría de las nucleasas sintéticas carecen del ambiente proteico, que en las enzimas, es el que asiste a la catálisis por metales. [33] Se han desarrollado sistemas con iones metálicos que generalmente contienen cationes como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , iones lantánidos Eu^{3+} y Ce^{4+} . Aunque estos dos últimos no se encuentran en las enzimas naturales, son mejores ácidos de Lewis que los cationes biológicamente relevantes (Tabla 1), lo que en principio podría atribuirles mejor reactividad. [18] El diseño de ligantes que al coordinarse al metal mimeticen los sitios activos de las enzimas no es algo trivial, y a la fecha, es un área que está en desarrollo. A continuación describiremos algunos sistemas catalíticamente relevantes para la hidrólisis de distintos ésteres de fosfato.

2.4.3. Nucleasas artificiales que hidrolizan ADN y a su molécula modelo BNPP

El sustrato más interesante para el desarrollo de agentes hidrolíticos es sin lugar a dudas el ADN (Fig. 3A). Este diéster de fosfato es de naturaleza polianiónica, y extremadamente resistente a la hidrólisis, la constante de velocidad calculada para la reacción de hidrólisis espontánea es de $1 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ a pH 7 y 25° C. [34] Debido a la baja reactividad del ADN resulta poco práctico utilizarlo en los estudios mecanísticos, por esta razón a menudo se emplea el ADN superenrollado que es más reactivo, y sustratos modelo como diésteres de fosfato con buenos grupos salientes. Estos sustratos activados facilitan el estudio de los mecanismos implicados y a la vez acortan el tiempo de reacción. El modelo de ADN más popular es el bis *para* – nitrofenilfosfato, el BNPP (Fig. 9), el cual a pesar de poseer dos buenos grupos salientes, es resistente ante la hidrólisis, la constante de velocidad espontánea en agua a pH 7 y 25 °C se ha estimado en $1.6 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, lo que corresponde a un tiempo de vida media de 1300 años. [18]

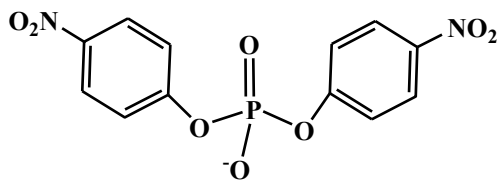


Fig. 9 Estructura del sustrato modelo de ADN el BNPP

Para complejos metálicos que promueven la hidrólisis de los diésteres de fosfato con buenos grupos salientes, como el 4-nitrofenol, los mecanismos posibles son asociativos o concertados: en el mecanismo asociativo la formación del intermediario pentacoordinado es el paso limitante (Fig. 4), seguido de la pérdida del grupo saliente. En el mecanismo del tipo concertado el enlace entre el fosfato y el 4- nitrofenol se rompe al mismo tiempo que se forma un enlace entre el nucleófilo. [35] En cambio, en el caso del ADN el paso limitante es la ruptura del intermediario pentacoordinado, ya que, no posee un buen grupo saliente. [18]

2.4.4. Agentes mononucleares en agua

En 1990 Trogler y De Rosch estudiaron la hidrólisis de BNPP por Ni(II), Cu(II), Zn(II), en solución acuosa a 75°C, con diferentes ligantes (Fig.10), en este trabajo por primera vez se logró estabilizar a los hidroxocomplejos en concentración $[ML]_T = 1 \times 10^{-4}$ M a pH de 10.

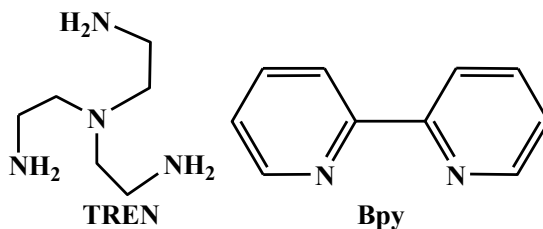


Fig. 10 Estructuras de los ligantes: tris(2-amino-etil)amino (TREN) y 2,2'-bipiridina (Bpy)

Sólo el ligante TREN inhibió la precipitación de los hidróxocomplejos, en concentración $[ML]_T = 1 \times 10^{-3}$ M a pH 8.6 y 75°C para los tres cationes, encontrando la mejor aceleración ante la hidrólisis de BNPP por el complejo $[Ni(tren)(OH)(OH_2)]^+$, con una constante de velocidad de $k_{obs} = 7.8 \times 10^{-6} s^{-1}$ (Fig. 11). El ligante tetradentado TREN, adopta una estructura tipo *cis* alrededor de una geometría octaédrica del centro metálico, para formar un complejo paramagnético. Esta disposición espacial que adopta el ligante TREN deja abiertas las posiciones *cis* en el octaedro, las cuales pueden ser ocupadas por el diéster de fosfato y por el hidróxido.

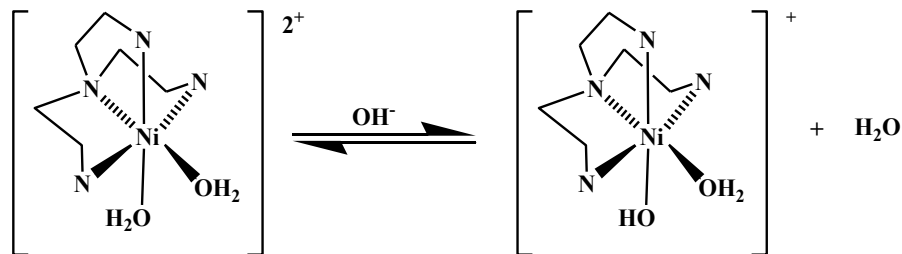


Fig. 11 Equilibrio de desprotonación del complejo de Ni(II) y el ligante TREN.

Los autores proponen como mecanismo de reacción la activación por ácido de Lewis seguido por ataque de un hidróxido unido al metal. [36] En el caso de Cu(II) y Zn(II), el ligante TREN les confirió estabilidad pero no reactividad. En el mismo trabajo la mayor reactividad se encontró con el ligante Bpy, atribuyéndola a la geometría del centro metálico, ya que TREN es tetradentado, por lo que con Cu(II) y Zn(II) no permite la unión del diéster de fosfato y del nucleófilo al mismo tiempo, en cambio, el ligante Bpy sí lo hace. Para los números de coordinación de 4 ó 5 que presenta el Zn(II), un estudio con macrociclos de poliaminas alifáticas para la hidrólisis de BNPP en medio alcalino a pH 8.6, $I = 0.2$ (NaClO_4) y 35°C , reveló que es mejor un ligante tridentado: 1,5,9 triazaciclododecano ($[[12]\text{aneN}_3]$) que uno tetradentado como el 1,4,7,10 tetrazaciclododecano ($[[12]\text{aneN}_4]$). En dicho estudio, se encontraron como especie catalítica al complejo $[[12]\text{aneN}_3]\text{Zn}(\text{OH})^+$ con geometría tetraédrica, y determinaron potenciométricamente el $\text{p}K_a$ del agua coordinada cuyo valor fue de 7.3, [37] lo que hace al sistema activo a pH fisiológico, porque a este valor de pH existe una fracción significativa de hidroxocomplejos. [18] Sumado a esto, para determinar la influencia de la carga del catión sobre la velocidad de hidrólisis, hicieron un estudio del efecto salino. Utilizaron en vez del NaClO_4 para fijar la fuerza iónica al catión monovalente $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ y cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} , encontraron que cuando el Na^+ se reemplaza por los cationes divalentes la velocidad se incrementa; los autores lo atribuyen a la neutralización parcial de la carga del diéster de fosfato, puesto que el ataque al diéster de fosfato que es monoaniónico, se dificulta por un nucleófilo con carga negativa como el OH^- . En cambio, en presencia del catión $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$, que es voluminoso, la velocidad no se incrementa, ya que éste no se asocia al diéster de fosfato como lo hacen los cationes divalentes que son más pequeños. Los autores proponen un mecanismo por activación de ácido de Lewis seguida por el ataque al diéster de fosfato por un hidróxido unido al Zn(II).

[37] Debido a la alta estabilidad que presentan los complejos de Zn(II) con macrociclos de poliaminas alifáticas y a la elevada acidez que éstas confieren al Zn(II) al estar coordinado, el pK_a del solvato de Zn(II) libre en agua es de 9, en comparación al que presenta con el ligante [12]aneN₄ que es de $pK_a = 7.9$. Así esta molécula se puede utilizar para modelar a las fosfatasa alcalinas, se logró una mejor aproximación para mimetizar el sitio activo en donde el nucleófilo es un residuo de serina (Ser₁₀₂), se logró al unir al macrociclo una molécula de alcohol bencílico como nucleófilo, sintetizando el ligante (S)-1-(2-hidroxi-2-feniletíl)- 1,4,7,10-tetrazaciclododecano. El complejo que se obtiene con Zn(II) tiene una relación estequiométrica 1:1 con el ligante y presenta un número de coordinación de cinco, el pK_a para la desprotonación del alcohol fue determinado por potenciometría y su valor es de 7.51 (Fig. 12).

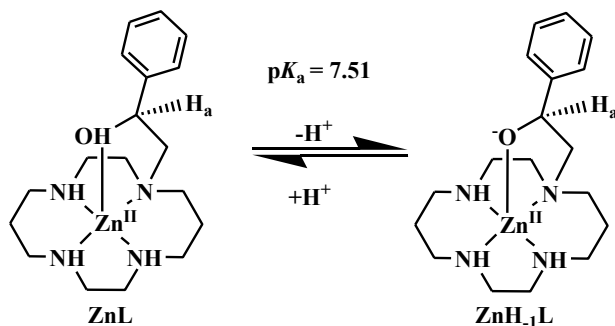


Fig. 12 Estructura del complejo de Zn(II) con el ligante 1, 4, 7, 10- tetrazaciclododecanona y alcohol bencílico.

La especie desprotonada [ZnH₁L] se propone como la responsable de la actividad catalítica, y los autores encuentran que el alcóxido de Zn(II) es mucho más reactivo que el hidróxido de Zn(II) ante la hidrólisis de BNPP en agua. La constante de segundo orden que encontraron para la hidrólisis de BNPP por el complejo de Zn(II) en medio acuoso a $I = 0.1$ M NaNO₃ y 35 °C fue de $k_{BNP} = 6.5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y se propone un mecanismo de reacción que involucra la formación de un intermediario fosforilado. Dicho intermediario se forma por el ataque del alcóxido al diéster de fosfato. Esta especie reactiva proviene de activar al hidróxido que está unido al macrociclo a $\text{pH} = 7.4$, que es el pK_a cinético. Como siguiente paso, el intermediario fosforilado se hidroliza, pero esta vez, por un hidróxido unido al Zn(II) $pK_a = 9$, como en el mecanismo enzimático de las fosfatasa alcalinas (Fig. 13). [38]

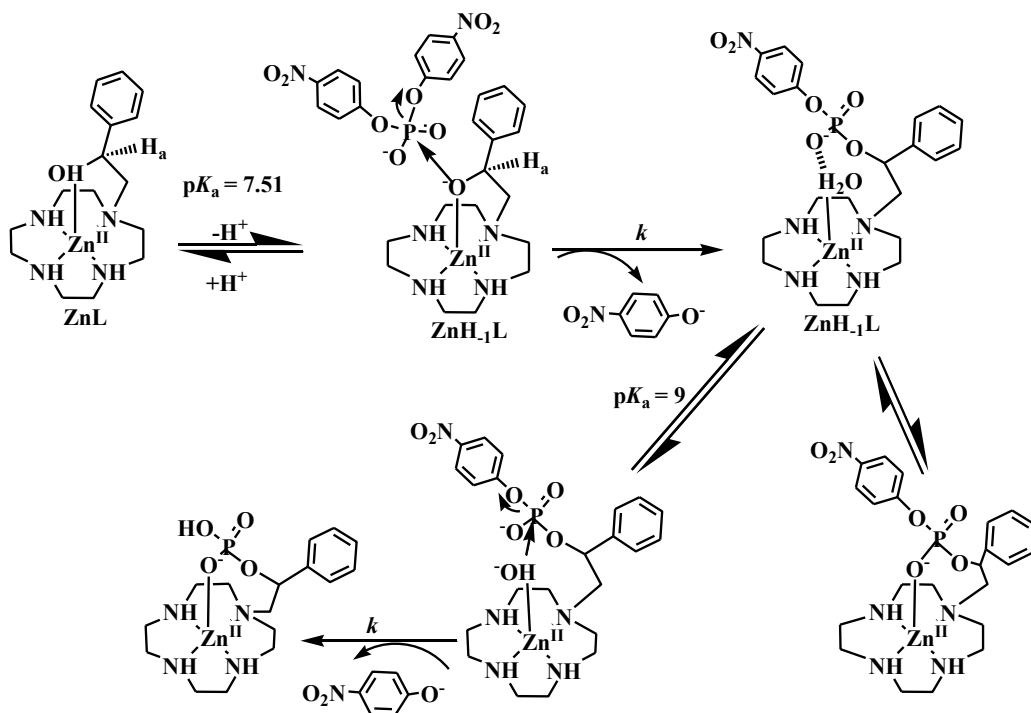


Fig. 13 Mecanismo propuesto para la hidrólisis de BNPP por el complejo de Zn(II) con el ligante 1, 4, 7, 10- tetrazaciclododecanona y alcohol bencílico.

Kimura y colaboradores empleando el complejo anterior lograron mimetizar la activación del grupo alcohol por la coordinación al metal, como en el caso de la enzima fosfatasa alcalina, en la cual el Zn(II) activa al residuo de serina, proporcionando un nucleófilo a pH fisiológico. En la enzima se tiene un sitio activo binuclear, en donde el segundo Zn(II) provee un nucleófilo intramolecular como en el mecanismo que propone Kimura con el complejo de Zn(II) y el ligante ([12]aneN₄) funcionalizado con alcohol bencílico. [38]

El trabajo anterior fue inspiración para el diseño de ligantes con macrociclos de poliaminas alifáticas funcionalizadas. Uno de los principales intereses en la creación de nuevos catalizadores fue la búsqueda de que dichos complejos fueran selectivos a nucleobases, y con capacidad para hidrolizar al ADN, pero, en general, éstos presentan constantes modestas ante la hidrólisis de BNPP en agua. Por ello, otra alternativa para la creación de complejos catalíticamente eficientes fue el uso de iones de lantánidos los cuales por lo general presentan constantes de velocidad mayores.

Los iones de lantánidos trivalentes presentan una alta densidad de carga (Tabla 1), como los cationes biológicamente relevantes, esta es una ventaja para su aplicación en el diseño de nucleasas artificiales, pues los hace buenos ácidos de Lewis capaces de atraer al sustrato y por la alta densidad de carga que poseen, también tienen la habilidad de formar hidroxos especies en solución acuosa al desprotonar a las moléculas de agua. Presentan también números de coordinación altos, lo cual es ideal porque pueden coordinar al sustrato y a una o más moléculas que funjan como nucleófilo al mismo tiempo. Una de las desventajas que surge al estudiar a los iones de Ln^{3+} libres o a sus complejos es que éstos forman dímeros, trímeros o agregados en solución, lo que dificulta el definir la especie o especies responsables de la actividad catalítica. [39] Aunado a esto, se ha visto que los iones de Ln^{3+} libres tienen una tendencia a precipitar en forma de hidroxocomplejos a $\text{pH} \cong 9$. Por ello requieren formar complejos con alta estabilidad cinética y termodinámica que retengan sitios de coordinación abiertos para poder enlazar al sustrato y al disolvente. Al igual que Mg^{2+} y Ca^{2+} , los iones de lantánidos prefieren ligantes duros donadores por oxígeno y números de coordinación de 8 y 9. El tipo de geometría y número de coordinación que adoptan se debe principalmente a efectos de repulsión entre ligantes y estéricos. En años anteriores, se han desarrollado complejos de lantánidos con moléculas pequeñas, las cuales presentan elevada actividad catalítica ante la hidrólisis de diferentes ésteres de fosfato y ADN. Entre los compuestos más exitosos podemos nombrar a los que incluyen como ligantes: macrocilos con bases de Schiff, ligantes polihidroxilados, éteres corona y azacorona, a los derivados de moléculas poliaminocarboxiladas, a los derivados del ligante DOTA (1, 4, 7, 10- tetraazaciclododecano- N, N, N', N'- ácido tetraacético, al ácido hidroxinámico, a las azúcares poliméricas, a las micelas y a varios sistemas Ln-M (dónde M= metales de transición u otro lantánido). [40] Los iones lantánidos poseen propiedades espectroscópicas y magnéticas que se pueden utilizar en varias aplicaciones bioquímicas, por ejemplo, los compuestos de Ln(III) con péptidos se han utilizado para medir constantes de acoplamiento por resonancia magnética nuclear (RMN). Y se han usado también como agentes luminiscentes en expresión de proteínas. Dichos complejos de lantánidos ofrecen nuevas alternativas para el estudio de las afinidades con los diferentes residuos de aminoácido; asimismo, son apropiados para modelar la cinética de intercambio de ligantes en agua y para estudiar el motivo por el cual algunos iones en los centros activos de las enzimas pueden formar dímeros. [41]

En 1993, Schneider y colaboradores realizaron un estudio con el catión Eu(III) y diferentes ligantes entre los que se encuentran: aminas, aminoéteres y carboxilatos, a pH= 7 y 50 °C en agua. La concentración del sustrato BNPP fue menor que la concentración de catalizador, con el fin de remover ambos grupos nitrofenolato, esto nos indica que la hidrólisis del monoéster es más rápida que la del diéster de fosfato ya que al utilizar una concentración de BNPP > [Eu³⁺], el rendimiento de la especie activa de Eu(III) disminuye por enlazarse al fosfato y se observa una curva cinética de saturación. Esta curva se ajustó a un modelo no lineal del tipo 1:1 y arrojó una constante de Michaelis- Menten, $K_M = 2.9 \times 10^{-3}$ M. En la mayoría de los casos se encontró una reducción en la velocidad de hidrólisis de BNPP por el uso de ligantes estabilizadores, en comparación con la actividad que presenta el ión libre. El [2, 2, 2] criptando fue el único ligante que retuvo la eficiencia catalítica $k_{obs}/k_o = 0.56 \times 10^6$ a 50 °C. [42] En 1998, estos mismos autores hicieron un estudio sistemático con la serie de lantánidos ante la hidrólisis de BNPP y ADN usando una concentración de $[Ln^{3+}]_T = 0.01M$, EPPS para fijar la fuerza iónica en concentración 0.01M, a pH= 7 y 50 °C, encontrando que en el caso de BNPP los valores de k_{cat} incrementan alrededor de 66 veces al ir de La³⁺ a Er³⁺ (Tabla 2), dichos valores determinados de k_{cat} se pueden relacionar con el radio iónico, que disminuye conforme aumenta k_{cat} , independientemente del número de coordinación que presenten (9 u 8) y correlaciona con el mecanismo propuesto que es la activación por ácido de Lewis, excepto para los lantánidos más pesados Yb³⁺ y Lu³⁺; para éstos la velocidad de hidrólisis disminuye. Dada la correlación anterior se esperaría una mayor actividad por Yb³⁺ y Lu³⁺, ya que su radio iónico es el menor de la serie. Dicho comportamiento anómalo, se atribuye a la creación de cúmulos, agregados en disolución que no son activos.

Tabla 2. Datos cinéticos para la hidrólisis de BNPP por diferentes cationes de lantánidos trivalentes derivado del ajuste a una curva no lineal del tipo Michaelis- Menten. [43]

Lantánido	Radio Iónico (Å)	$k_{cat} (s^{-1}) \times 10^4$
La ³⁺	1.061	0.13
Pr ³⁺	1.013	0.63
Eu ³⁺	0.95	2.5
Gd ³⁺	0.938	5.4
Dy ³⁺	0.908	5.5
Er ³⁺	0.881	8.6
Tm ³⁺	0.869	-
Yb ³⁺	0.858	7.8
Lu ³⁺	0.848	5

En ese mismo trabajo, [43] se realizó un estudio del efecto salino en la velocidad de hidrólisis de BNPP por el ión Eu³⁺, adicionando NaCl y MgCl₂ a las disoluciones. Hallándose una relación lineal en función de los parámetros para la fuerza iónica de Debye- Hückel. La pendiente al adicionar Na⁺ o Mg²⁺ no es muy diferente, y está en acuerdo con una correlación simple de competencia en la formación de pares iónicos con el sustrato aniónico BNPP. Esta competencia, a su vez, es la responsable de la disminución en la velocidad de hidrólisis al utilizar algunas poliaminas como ligantes estabilizadores ya que pueden coordinar al centro metálico. Estas observaciones son importantes para el diseño de ligantes, si al utilizarlos se espera incrementar la eficiencia de los iones de lantánidos como catalizadores. Dichos ligantes deberán ser neutros, enlazarse fuertemente al catión, y/o tener grupos adicionales que puedan actuar como cofactores. Los mismos autores encontraron una disminución en la velocidad de hidrólisis al adicionar sales, lo cual limita el uso de amortiguadores, particularmente aquellos con muchas cargas. El sustrato ADN pBR322 superenrollado (RFI), se degrada pasando a la forma circular relajada (RFII). Utilizando como catalizador a los iones de lantánidos, encontraron una pequeña diferencia en los valores de k_{cat} , en la serie de La³⁺ a Er³⁺ tal que al disminuir el radio iónico aumenta la actividad, pero ésta depende fuertemente de la concentración de catalizador. [43]

El comportamiento de los iones de lantánidos libres como nucleasas artificiales, no es necesariamente el mismo que al encontrarse complejados. Mientras que en el primer caso la barrera catalítica es la acidez del catión para polarizar al electrófilo, en algunos sistemas con ligantes el problema radica en activar a la molécula de agua, [28] por ello, se ha propuesto que los hidróxidos metálicos pueden servir como nucleófilos o bases generales durante la hidrólisis

de ADN. La formación del hidróxido metálico reduce la carga total del complejo por una unidad, lo cual puede ser desfavorable en un ambiente con carga negativa como el que está presente en los ácidos nucleicos; además la formación de la especie $\text{Ln}(\text{OH})_3(\text{s})$ es un proceso competitivo importante, que tiene repercusiones negativas sobre la actividad fosfoesterolítica. De ahí, que una solución sea el emplear ligantes de preferencia neutros que proporcionen un núcleo estable, y algunas moléculas de agua adicionales en la esfera de coordinación del catión sustituirlas por aminoácidos. Bajo esta perspectiva en el 2006 se realizó un estudio con el ión $\text{Sm}(\text{III})$ y como ligantes estabilizadores diferentes éteres corona (cw): el 12- corona- 4, 15- corona- 5 , 18- corona- 6 que son neutros y distintos aminoácidos. En el trabajo señalado se observó que el sistema ternario en general es más eficiente que los sistemas: $\text{Sm}(\text{III})$ - sin ligantes, $\text{Sm}(\text{III})$ - a.a. y $\text{Sm}(\text{III})$ - éteres corona. Las condiciones en que la actividad es máxima ante la hidrólisis de BNPP son: 3 mM de $\text{Sm}(\text{III})$, 3 mM del 18- éter corona- 6 , 15 mM de arginina o glicina a pH de 7.7, $I = 0.5 \text{ M}$ (NMe_4Cl) a 37°C en agua, con una constante de velocidad observada de $k_{\text{obs}} = 6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En estas condiciones se logró estabilizar al sistema y se caracterizaron por medio de titulaciones potenciométricas en el intervalo de pH 7.2 a 7.8 los complejos ternarios, con composición de cinco equivalentes de aminoácido por un equivalente de $\text{Sm}(\text{III})$ y uno del éter corona [1:1:5] (Fig. 14).

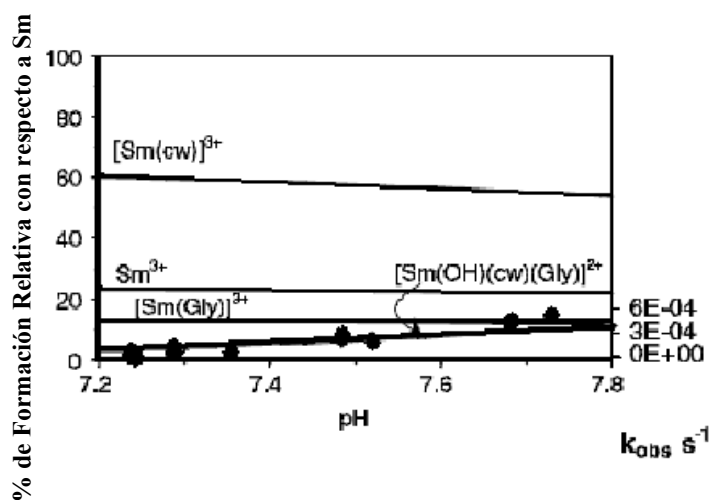


Fig. 14 Diagrama de distribución de especies del sistema Sm-18 éter corona-6-Gly, $[\text{Sm}] = 3 \text{ mM}$, $[\text{cw}] = 3 \text{ mM}$, $[\text{Gly}] = 15 \text{ mM}$ $I = 0.5 \text{ M}$ NMe_4Cl a 37°C en agua. Los valores de k_{obs} fueron determinados en las mismas condiciones.

Como lo muestra el diagrama de distribución de especies de la (Fig. 14), la especie que correlaciona con el perfil cinético k_{obs} vs pH obtenido para la hidrólisis de BNPP por el sistema ternario es $[Sm(OH)(cw)(Gly)]^{2+}$, dicha especie es monomérica e hidroxilada y se forma en condiciones de neutralidad, bajo las cuales presenta actividad catalítica relevante. El hidroxocomplejo es capaz de atraer al fosfodiéster ya que retiene la carga positiva y proporciona un hidróxido para fungir como nucleófilo; de este modo el mecanismo propuesto es de activación por ácido de Lewis, seguido del ataque por un hidróxido coordinado al metal (Fig. 15). [44]

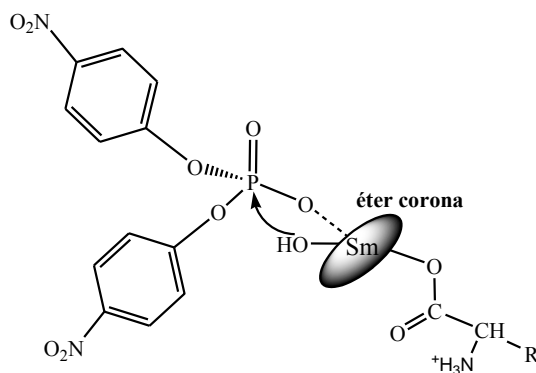


Fig. 15 Mecanismo propuesto para la hidrólisis de BNPP por el complejo $[Sm(OH)(cw)(Gly)]^{2+}$

2.4.5. *Sistemas binucleares en agua*

Se ha visto al estudiar la hidrólisis de ADN por complejos multinucleares que:

- 1) El efecto concertado entre dos iones metálicos y entre los ligantes ayuda a acelerar la velocidad de hidrólisis.
- 2) Las nucleasas más eficientes contienen sitios de coordinación vacantes y/o uno ó más ligantes lábiles, y ligantes puentes hidroxilo.
- 3) La actividad en complejos que contienen azaciclos y poliaminas aromáticas como ligantes se puede controlar mediante el pH como en las enzimas naturales. [33]

Numerosos grupos de investigación han sintetizado complejos que contienen varios iones metálicos, capaces de mimetizar los sitios activos binucleares de las enzimas, las estrategias para formar complejos multinucleares estables, son la utilización de macrociclos como ligantes y moléculas que funcionen como espaciadores. Los iones metálicos más efectivos para la hidrólisis de ésteres de fosfato bajo esta técnica son los iones: La(III), Eu(III), Er(III), Ce(IV), Fe(III), Zn(II), Cu(II) y Co(II). Este éxito deriva de sus variadas geometrías de coordinación, de la alta

densidad de carga que presentan y de que son ácidos de Lewis (Tabla 1). Los ligandos utilizados incluyen piridina, bencimidazol, azacoronas, bases de Schiff, poliaminas y aminocarboxilatos. Como espaciadores se utilizan moléculas simples, generalmente rígidas, capaces de coordinar un ion metálico a cada una. El inconveniente en este caso es que los iones metálicos no necesariamente interactúan, como consecuencia, la distancia metal-metal es flexible y no es óptima para la catálisis. Algunas veces con un macrociclo se pueden coordinar dos metales, otras veces se necesitan dos macrociclos. La síntesis de macrociclos es costosa y necesita mucho tiempo para realizarse, esto los hace poco atractivos para aplicaciones prácticas. [33] Por otro lado se ha demostrado que en complejos binucleares ambos iones metálicos pueden actuar cooperativamente. Esta es una de las explicaciones del por qué, por lo general, los complejos binucleares son más activos que sus análogos mononucleares, ya que un ion metálico puede proveer al nucleófilo, mientras que el otro coordina al sustrato, o ambos pueden participar en enlazar al sustrato, en la activación del estado de transición y en la hidrólisis. También se ha estudiado la influencia en las propiedades del ión metálico al enlazar a los ligandos moléculas como quelatos, grupos básicos y nucleófilos auxiliares, ya que estos favorecen las interacciones del complejo con el sustrato. Bazzicalupi y Valtancoli, en el 2008, sintetizaron 2 ligandos, uno que contiene 1, 10-fenantrolina L1 y el otro 2,2'-bipiridina L2 enlazados a un macrociclo (Fig. 16). Mientras que con L1 los complejos son mononucleares, L2 promueve la formación de complejos binucleares de Zn(II) en agua. [45]

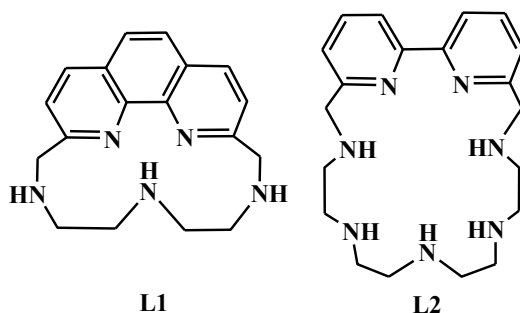


Fig.16 Estructuras de los ligandos macrociclos derivados de poliaminas con 1,10-fenantrolina (L1) y 2,2'-bipiridina (L2)

En ambos complejos $[ZnL1]^{2+}$ y $[Zn_2L2]^{4+}$, el ión metálico presenta una esfera de coordinación no saturada por los átomos donadores del ligante, y ambos pueden desprotonar de una manera sencilla a la molécula de agua, creando un nucleófilo en forma de hidroxocomplejo a

pH ligeramente alcalino. Se ha propuesto que para la hidrólisis de BNPP los anillos aromáticos en los ligantes refuerzan la interacción entre el diéster de fosfato y el complejo, gracias a interacciones débiles de tipo hidrofóbicas y apilamientos π entre los ligantes y los anillos aromáticos del sustrato. Lo que se ve reflejado en un aumento en la velocidad de hidrólisis. Para el complejo de Zn(II) con el ligante L1 la forma activa en la hidrólisis de BNPP a 35 °C es $[\text{ZnL1}(\text{OH})]^+$, que se forma al desprotonar una molécula de agua a pH alcalino $\text{p}K_a = 9.2$, obteniendo una constante de hidrólisis de segundo orden de $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Al complejarse el Zn(II) con L2 se vio la formación del complejo binuclear $[\text{Zn}_2\text{L2}]^{4+}$ en un pH ligeramente ácido. Al elevar el valor de pH dos hidroxido especies están presentes: el $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})]^{3+}$ y el $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})_2]^{2+}$, con valores de $\text{p}K_a$ de 7.6 y 8.82 respectivamente. El valor de $\text{p}K_a = 7.6$ para la formación del complejo $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})]^{3+}$ es particularmente bajo. Esto se atribuye al ensamblado con el macrociclo y en la cavidad de éste a la formación de un puente hidroxido entre los dos iones de zinc $\text{Zn}_2(\mu\text{-OH})$. Este hidróxido puente es un nucleófilo débil debido a su interacción con dos centros metálicos electrofílicos. Contrariamente el valor de $\text{p}K_a = 8.82$ para la formación de $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})_2]^{2+}$ es más alto. Esto se debe a que además del hidróxido puente, el otro ión hidróxido está unido a solo un ión Zn(II), él cual tiene una función como nucleófilo fuerte (Fig. 17).

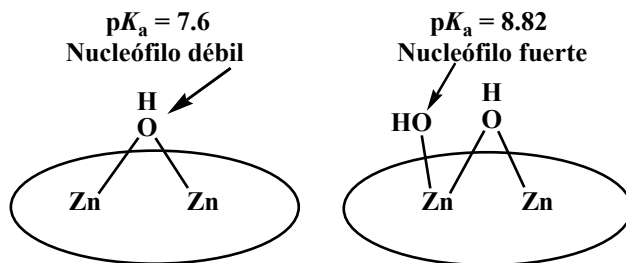


Fig. 17 Estructura propuesta para los complejos $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})_2]^{2+}$.

Ante la hidrólisis de BNPP en agua a 35 °C, sólo el dihidroxocomplejo resultó activo $[\text{Zn}_2\text{L2}(\text{OH})_2]^{2+}$ (Fig. 18), con una constante de $9.6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La constante de segundo orden para el complejo binuclear es ocho veces mayor que la que se encontró para el complejo mononuclear y éste incremento en la velocidad se lo atribuyen a una doble activación por ácido de Lewis, ya que en el complejo binuclear ambos iones zinc pueden enlazar al fosfodiéster,

seguido del ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo por el hidróxido coordinado al metal que no es puente.

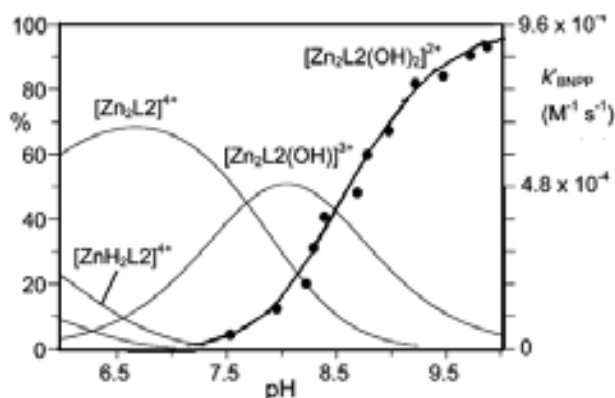


Fig. 18 Eje y, lado izquierdo: Curva de distribución de especies para el complejo binuclear L2 (líneas sólidas), Eje y, lado derecho: k_{BNPP} (●) para la hidrólisis de BNPP en función del pH, $I = 0.1\text{M NMe}_4\text{NO}_3$, $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$.

En ese mismo estudio se demostró que los complejos de L1 y L2 pueden hidrolizar al ADN superenrollado, la hidrólisis ocurre a pH neutro, en dónde la única especie en disolución es $[\text{ZnL1}]^{2+}$ y en el caso de L2, los complejos $[\text{Zn}_2\text{L2H}(\mu\text{-OH})]^{4+}$ y $[\text{Zn}_2\text{L2}(\mu\text{-OH})]^{3+}$ no presentan actividad ante la hidrólisis de BNPP. Las especies activas en el caso de los complejos de L1 y L2 presentan la misma eficiencia hidrolítica con el sustrato ADN en baja concentración molar ($<10\mu\text{M}$). Esto indica que no existe cooperatividad entre los dos centros metálicos en la actividad catalítica, en los complejos binucleares de L2, sugiriendo un mecanismo diferente, al asociativo para el caso del ADN superenrollado. [45]

Subat y König en un estudio con ligantes macrocíclicos derivados de 1,4,7,10-tetrazaciclododecanona ($[\text{12}]_{\text{aneN}_4}$) y diferentes moléculas que actúan como espaciadores, y los cationes Ni(II), Cu(II) y Zn(II), encontraron [46] que la catálisis de BNPP se ve auxiliada por un ambiente hidrofóbico de los complejos de los ligantes L1 – L6 (Fig. 19), al tener interacciones del tipo $\pi\text{-}\pi$, entre los sustituyentes aromáticos del complejo y los anillos aromáticos del BNPP, favoreciendo la preorganización del sustrato y la reactividad de las hidroxio especies.

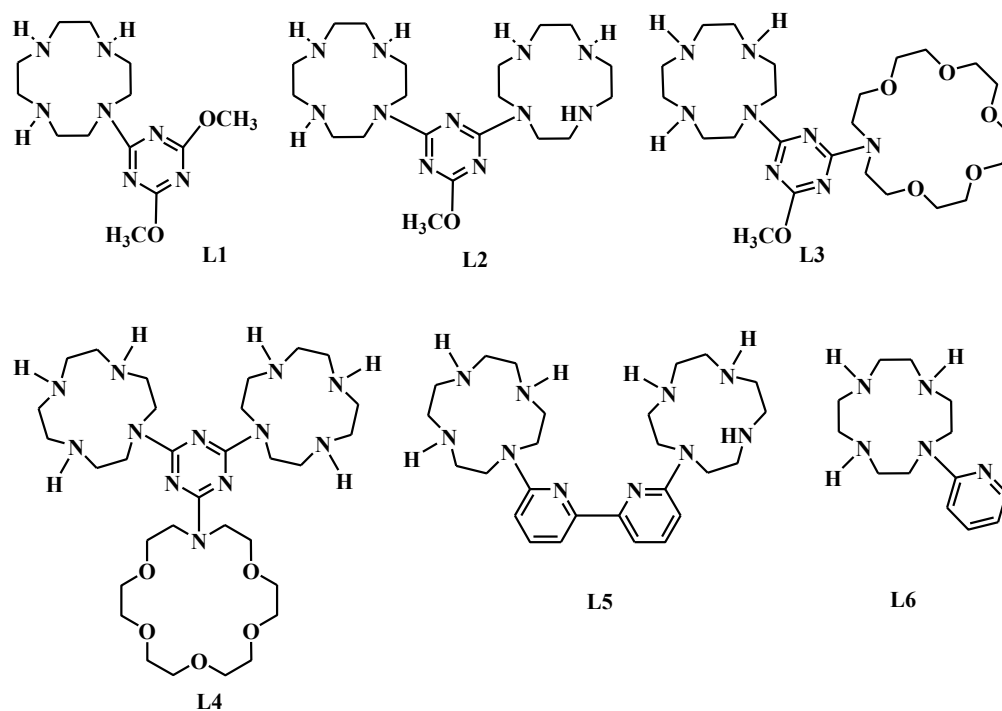


Fig. 19 Estructura de los ligandos derivados del [12]aneN₄ L1- L6

Los ligandos L1 y L6 forman complejos mononucleares con los 3 cationes, mientras que L3 solo compleja al Zn(II). Los complejos con Ni(II) y con Cu(II) presentan baja actividad ante la hidrólisis de BNPP en agua, $k_{\text{obs}} \cong 10^{-8} - 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ $I = 0.1 \text{ M NaCl}$, pH en el intervalo de 7-9 con 50 mM de HEPES o TRIS como amortiguadores a 25 °C. Bajo estas mismas condiciones, al graficar la constante de segundo orden con respecto al pH, los complejos de L1, L3 y L6 con el catión Zn(II) exhiben una curva tipo sigmoideal, la cual es característica de los procesos cinéticos controlados por un equilibrio ácido-base. Y el punto de inflexión corresponde al valor del $\text{p}K_{\text{a}}$ de la molécula de agua coordinada $\text{ZnL3 } \text{p}K_{\text{a}} = 8.28$ y $\text{ZnL6 } \text{p}K_{\text{a}} = 7.89$. Por lo tanto la especie reactiva es Zn(II)-OH^- . Dicho hidróxido puede atacar al átomo de fósforo como en el mecanismo que se ha informado para complejos de Zn(II) con ligandos azo. [38] Los ligandos L2, L4, L5 promueven la formación de complejos binucleares (Fig. 19) y sólo con Zn(II) se encontró actividad catalítica significativa ante la hidrólisis de BNPP. Los complejos $\text{Zn}_2\text{L2}$ y $\text{Zn}_2\text{L4}$ que poseen moléculas espaciadoras más cortas son capaces de hidrolizar al BNPP uno o dos órdenes de magnitud más rápido que $\text{Zn}_2\text{L5}$. Se ha demostrado que, para complejos binucleares de Zn(II), aquellos sistemas que poseen moléculas espaciadoras cortas son capaces de coordinar al diéster de fosfato de manera bidentada, por lo cual incrementan la activación del sustrato (activación por

doble ácido de Lewis) y le dan mayor proximidad para que el nucleófilo ataque. La cooperatividad entre los dos centros metálicos en Zn_2L4 se ve reflejada en las altas constantes de velocidad encontradas para este complejo, $k = 2.45 \times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$ a pH 8 y 25 °C. Estas constantes de velocidad son significativamente mayores que las informadas con anterioridad para la hidrólisis de BNPP por sistemas semejantes de Zn(II). [46] El éxito de estos sistemas se debe a que los macrociclos de poliaminas no reducen en su totalidad la carga positiva del ión Zn(II), por lo cual no afecta su electrofilia y previenen la precipitación de los hidróxidos. Aunque las constantes de hidrólisis de BNPP en agua siguen siendo modestas. Al utilizar los iones de lantánidos la velocidad se podría incrementar, pero la dificultad es que los iones de lantánidos trivalentes no forman complejos estables con este tipo de ligantes (azo) y requieren ligantes con átomos donadores por oxígeno, preferentemente grupos aniónicos. Sin embargo, estos grupos reducen la carga total del complejo y la eficiencia catalítica. Aunque en el 2005 el grupo de Chang [47] logró al anexar grupos carboxilos a un azamacrociclo, crear un ligante que incrementa la actividad fosfoesterolítica de los iones de Ln(III), en particular con Eu(III) y el ligante 1,7- dicarboximetil- 1, 4, 7, 10- tetraazaciclododecano (DO2A) el cual es hexadentado, por lo cual el complejo tiene 6 sitios de coordinación ocupados por el ligante (DO2A) y 3 moléculas de agua coordinadas (Fig. 20).

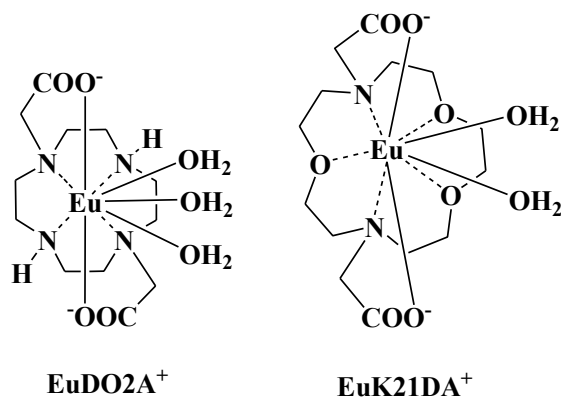
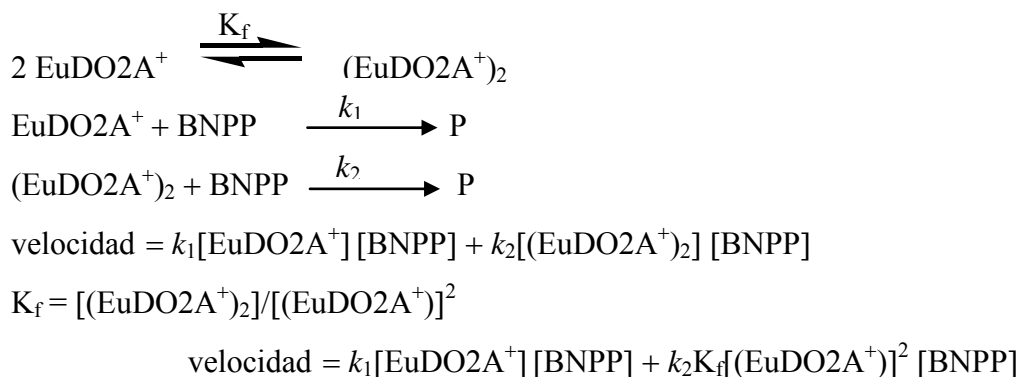


Fig. 20 Fórmulas estructurales de los complejos $EuDO2A^+$ y $EuK21DA^+$

El complejo $EuDO2A^+$ en concentración $[EuL]_T = 1mM$ con $\mu = 0.1 M$ de $(CH_3)_4NCl$ a 25 °C en agua, puede hidrolizar a la molécula de BNPP con una constante de velocidad de segundo orden de $k = 4.67 \times 10^{-2} M^{-1} s^{-1}$ en un intervalo de pH de 6.3 a 8.74. Los autores encontraron un valor cinético de la constante de hidrólisis de agua, informando un $pK_h = 8.4 \pm 0.3$

que correlaciona con el encontrado por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser el cual es de $pK_h = 8.1 \pm 0.3$. Con esta misma técnica determinaron el número de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación del ión, encontrando 3 moléculas de agua coordinadas para EuDO2A^+ y 2 moléculas de agua en el caso de EuK21DA^+ , donde K21DA es N, N'- ácido diacético- 1,7- diaza- 4, 10, 13- trioxaciclopentadecano (Fig. 22). Para el complejo EuK21DA^+ la constante de velocidad de segundo orden es de $k = 1.31 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, es decir $\cong 10^2$ veces menor que en el caso del complejo EuDO2A^+ . Los autores explican el incremento en la velocidad debido a que EuDO2A^+ presenta una basicidad mayor que EuK21DA^+ $pK_h = 7.8 \pm 0.1$. Además el macrociclo DO2A es más rígido, tiene una cavidad pequeña y presenta constantes de formación mayores con los iones lantánidos que el ligante K21DA. En el macrociclo K21DA la cavidad es mayor, por lo que es probable que el ion Eu(III) se encuentre más adentro en ella, reduciendo la tendencia del sustrato a enlazarse con él. Pero los autores concluyen que: el factor más importante para una hidrólisis eficiente es el número de moléculas de aguas coordinadas y el efecto estérico impuesto por el ligante macrocíclico. Se realizaron estudios variando la concentración del metal, encontrando un orden de reacción con respecto al metal mayor a uno, por lo cual los autores ajustaron a un modelo que incluye dos contribuciones: una atribuida a la especie monomérica y otra a la dimérica. (Esquema 1).



Esquema 1. Modelo de reacción para las dos contribuciones: monomérica y dimérica

Este modelo se basa en la formación de la especie $(\text{EuDO2A}^+)_2$ donde proponen que un ión hidróxido u oxo actúa como puente entre los complejos mononucleares, indicando que la especie activa es dimérica. Esta propuesta también se fundamenta en el estudio que realizaron

para la hidrólisis de BNPP y diferentes iones trivalentes de lantánidos (Ln^{3+}) con el ligante DO2A (Tabla 3).

Tabla 3. Constantes de velocidad para la hidrólisis de BNPP y $\text{p}K_h$ calculados para diferentes cationes y el macrociclo DO2A, $\mu = 0.1 (\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ a 25 °C.

Complejo	$\text{p}K_h$	$k_{\text{LnL(OH)}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	Intervalo de pH
EuDO2A^+	8.4 ± 0.3	4.67×10^{-2}	6.3-8.74
LaDO2A^+	8.4 ± 0.2	1.71×10^{-2}	6.83-8.69
YbDO2A^+	9.4 ± 0.3	3.03×10^{-3}	8.70-10.9

En la Tabla 3 se muestran las constantes de velocidad de segundo orden para la reacción de hidrólisis del sustrato BNPP calculadas a partir del modelo establecido en el esquema 1, por los complejos LnDO2A^+ . La mayor aceleración la provee el ión Eu(III) , lo que correlaciona con la acidez del catión entre La(III) y Eu(III) (Tabla 3), aunque el $\text{p}K_h$ calculado con el macrociclo es muy cercano en ambos casos (Tabla 3), lo que nos habla de un nucleófilo con la misma basicidad. Sin embargo, esta idea no explica el por qué un nucleófilo más fuerte creado al hidrolizar una molécula de agua por el complejo YbDO2A^+ , con $\text{p}K_h = 9.4 \pm 0.3$ presenta constantes de velocidad menores (Tabla 3) que los complejos con cationes menos ácidos. Los autores lo correlacionan con el número de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación del ión, que decrece de $n = 3$ para (Ce- Eu), hasta $n = 2$ de (Tb- Yb). En el esquema 1 se explica la formación de la especie dimérica. Los autores proponen dos tipos de dihidróxidos dependiendo del número de moléculas de agua coordinadas, uno activo ante la hidrólisis de BNPP como en el caso de los hidróxidos de La(III) y Eu(III) y el macrociclo DO2A y otros inactivos como en el complejo YbDO2A^+ (Fig. 21).

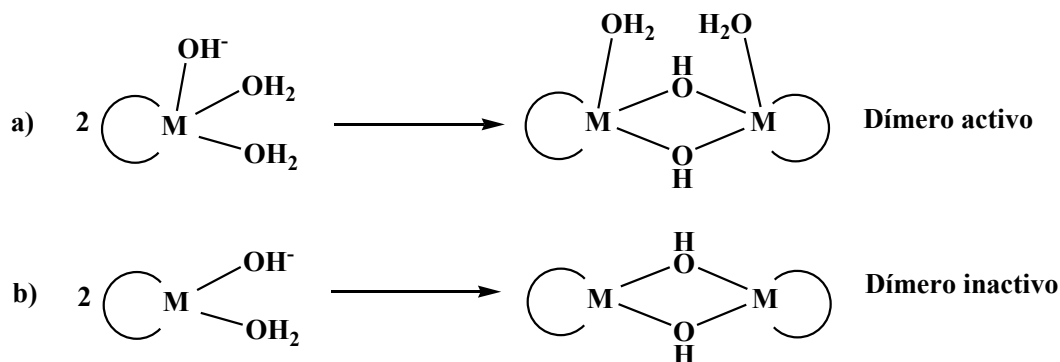


Fig. 21 Dímeros de LnDO2A^+ a) Dímero activo, b) Dímero inactivo ante la hidrólisis de BNPP

Asumiendo que YbDO_2A^+ presenta número de coordinación ocho, con dos moléculas de agua en su estructura, el dímero resultante $[\text{Yb}(\text{DO}_2\text{A})(\mu\text{-OH})_2]$ es inactivo. Esto se debe a que los dos iones hidróxido están fuertemente unidos al ión $\text{Yb}(\text{III})$ a valores de pH altos, por lo cual no existen sitios de coordinación vacantes y el sustrato no se puede enlazar para llevar a cabo la hidrólisis; en cambio, el complejo EuDO_2A^+ con tres moléculas de aguas de coordinación puede formar un dímero activo ya que presenta moléculas de agua adicionales (Fig. 21), que se pueden intercambiar por el sustrato y llevar a cabo una catálisis eficiente. [47]

En un enfoque diferente al trabajo de Chang y colaboradores, el diseño de nucleasas artificiales con ligantes carboxilato en su estructura, es deseable, pues dichos grupos son análogos a los aminoácidos en las enzimas. Así existe una gran variedad de trabajos con aminoácidos como ligantes en forma de: grupos bencimidazoles, aminas, piridinas y alcóxidos, pero nuevamente, las constantes de velocidad obtenidas en agua son modestas, y en otros casos no permite la identificación de las especies activas ante la hidrólisis de BNPP. Aguilar-Pérez y Yatsimirsky, en el 2006, informaron del estudio de cinco iones de lantánidos y el ligante 4-imidazolcarboxilato (Fig. 22). El ligante se escogió por la semejanza en su estructura a los carboxilatos, pero dicho ligante aniónico es menos básico, lo que permitió la estabilización y caracterización de los hidróxidos. [48]

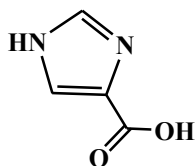


Fig.22 Estructura del ligante ácido 4- imidazolcarboxilico (4- ICA)

Las especies activas que proponen los autores son binucleares: en el caso de los complejos con $\text{La}(\text{III})$ y $\text{Pr}(\text{III})$ se tiene un complejo activo del tipo $[\text{Ln}_2\text{L}_2(\text{OH})_4]$ (Fig. 23a) y para los cationes $\text{Nd}(\text{III})$, $\text{Eu}(\text{III})$ y $\text{Dy}(\text{III})$ la especie activa $[\text{Ln}_2\text{L}(\text{OH})_5]$ (Fig. 23b). La mayor reactividad se encontró con el catión $\text{La}(\text{III})$ en concentración 2mM y la misma concentración del ligante 4- ICA, que presenta una constante de segundo orden ante la hidrólisis de BNPP de $k = 4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en agua. En las mismas condiciones se encontró un efecto inhibitorio por parte del ligante 4- ICA en concentración 4mM, y el orden de aceleración en la reacción de hidrólisis por la serie de lantánidos es el siguiente: $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} > \text{Dy}$.

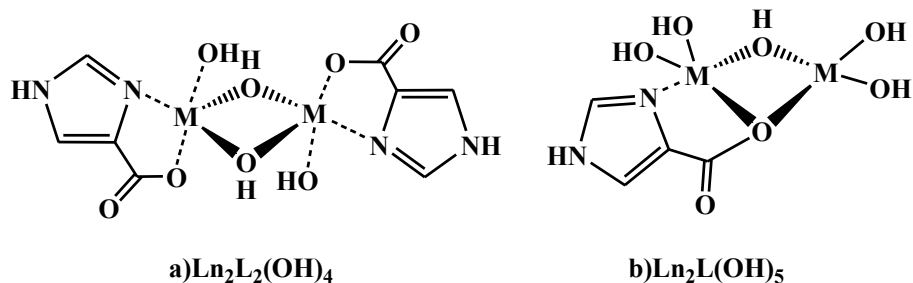


Fig.23 Estructura de los complejos activos de 4- ICA: a) $\text{Ln}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$ y b) $\text{Ln}_2\text{L}(\text{OH})_5$

En el estudio del efecto salino que realizaron en estos sistemas, los autores hallaron que la velocidad de hidrólisis disminuye en presencia de aniones en altas concentraciones como: NO_3^- , $(\text{EtO})_2\text{PO}_2^-$, CH_3COO^- , con este último, en el estudio cinético encontraron la mayor constante de afinidad $K = 230 \text{ M}^{-1}$ hacia el ión $\text{Nd}(\text{III})$. Esto se atribuye a que el anión acetato puede enlazarse de manera bidentada entre los dos centros metálicos a manera de puente, impidiendo la coordinación del sustrato BNPP e inhibiendo la catálisis. Con estos estudios los autores proponen un mecanismo de hidrólisis el cual involucra la complejación reversible de la especie binuclear activa $[\text{Ln}_2\text{L}_2(\text{OH})_4]$ por el diéster de fosfato en forma de puente (activación por doble ácido de Lewis), seguido por el ataque de un hidróxido puente unido al metal al átomo de fósforo (ruta A) o seguido por el ataque de una molécula oxo, creada a partir de la desprotonación del hidróxido puente por un ión hidróxido adicional en el complejo (ruta B) (Fig. 24). [48]

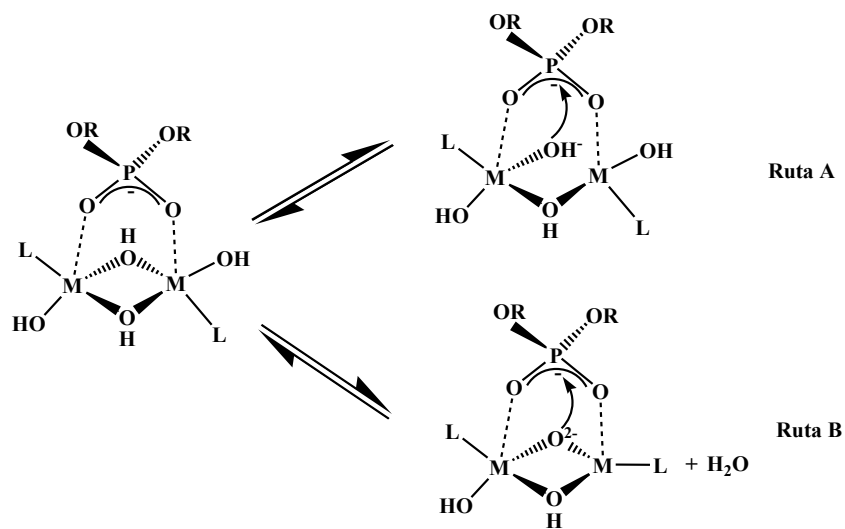


Fig. 24 Mecanismos propuestos para la hidrólisis de BNPP por el complejo de 4- Imidazolcarboxilato activo $\text{LaL}_2(\text{OH})_4$.

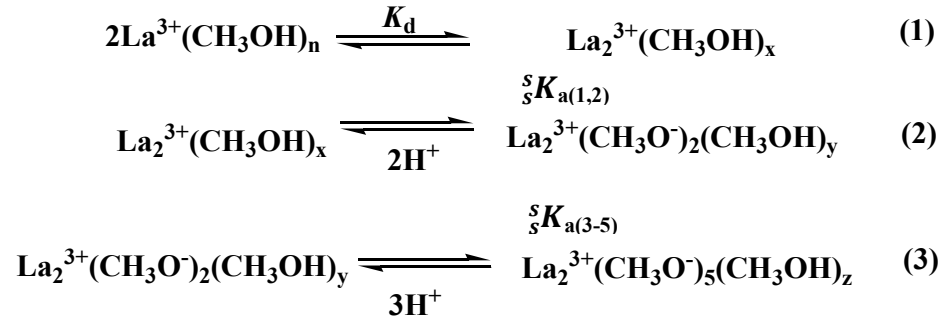
Este tipo de sistemas, con iones lantánidos y ligantes carboxilato en agua a 25 °C, proveen una eficiencia catalítica para el sustrato BNPP del orden de 10^5 en agua, que se expresa en términos de la relación de las constantes de segundo orden de la reacción catalizada por el hidróxocomplejo entre la constante de segundo orden de la reacción catalizada por el ión hidróxido, este es uno de los sistemas más rápidos, hasta el momento, para iones lantánidos en agua. Sin embargo, el uso de ligantes estabilizadores tanto para prevenir la precipitación de los iones lantánidos a valores de pH altos como para imitar el ambiente proteico alrededor del catión metálico en las enzimas no es la única estrategia, existe otra forma y es el empleo de disolventes orgánicos en vez de medios acuosos.

2.4.6. Estudios de la reactividad fosfoesterolítica en disolventes orgánicos

La gran aceleración que proveen las enzimas en las reacciones de transferencia de grupos fosforilo depende fuertemente del microambiente en el sitio activo, [49] algunos cálculos hechos para la reacción que cataliza la nucleasa de estafilococo muestran que la constante de velocidad puede ser incrementada en un factor de 10^{17} como consecuencia de la desolvatación del sustrato, aboliendo la formación de enlaces de hidrógeno, y a través de un sitio activo pre organizado estratégicamente donde se encuentran ácidos y/o bases débiles en un ambiente con baja constante dieléctrica. [27] Por ello el uso de medios no acuosos es una aproximación que resulta apropiada para imitar el microambiente al interior de las enzimas naturales. El estudio del efecto del disolvente en las reacciones de hidrólisis de fosfodiésteres catalizadas por complejos metálicos se puede dividir en dos grandes ramas: una, es el uso de disolventes orgánicos anhidros (en particular metanol), y la otra, el uso de mezclas ricas en disolventes orgánicos y agua. Uno de los primeros en ver el efecto del disolvente en la velocidad de la reacción de hidrólisis de BNPP fue Kimura, quién en su estudio con Zn(II) y el ligante (S)-1-(2-hidroxi-2-feniletíl)- 1,4,7,10-tetrazaciclododecano (Fig. 12), encontró una aceleración de 1700 veces en la velocidad al pasar de medio acuoso a DMF anhidra, la $k_{\text{BNP}} = 1.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 35 °C. Atribuyen ésta notable aceleración a que el alcóxido (nucleófilo) es mucho más reactivo en este medio dipolar aprótico que en medio acuoso debido a que se encuentra menos solvatado. [38]

Neverov y Brown, informaron en el 2001, el incremento en la velocidad de metanólisis para el sustrato BNPP por el uso de La(III) en metanol anhidro y metóxido de sodio a 25 °C. [50] Estos autores calcularon la constante de segundo orden para el ión metóxido, asumiendo que la

reacción en el disolvente es sólo atribuible al ion metóxido como nucleófilo. La constante de velocidad se puede escribir como $k_{\text{Disolvente}} = k_{\text{CH}_3\text{O}^-} \times [\text{MeO}^-]$. Los autores calcularon la constante de autoprotólisis para metanol que fue de $10^{-16.77}$ a 25 °C. Con estas relaciones la constante de segundo orden para el ión CH_3O^- es de $k_{\text{CH}_3\text{O}^-} = 2.5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta constante que es muy cercana en valor a la constante de segundo orden encontrada para el ataque del BNPP por el ión hidróxido en agua, cuyo valor es de $k_{\text{OH}^-} = 5.8 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La aceleración de la reacción de metanólisis provista por el ión La(III) en un $\text{s}^{\circ}\text{pH}$ de 7.7 es de 9.4×10^{10} y a un $\text{s}^{\circ}\text{pH}$ de 8.9 de 1.4×10^{10} . Este incremento en la velocidad la atribuyen a la formación de dímeros a partir del monómero dependiendo del $\text{s}^{\circ}\text{pH}$ y sin ligantes estabilizadores a 25°C (Esquema 2). Ya que en la titulación por potenciometría de $\text{La}(\text{OTf})_3$ por MeO^- en metanol, se encontraron dos eventos en la región de $\text{s}^{\circ}\text{pH}$ de 6 a 11, el primero tiene un $(\text{s}^{\circ}\text{pK}_a)_1$ aparente de 7.86 con una relación $[\text{CH}_3\text{O}^-]/[\text{La}^{3+}] = 1$ y el segundo $(\text{s}^{\circ}\text{pK}_a)_2$ de 10.44 que consume una relación de $[\text{CH}_3\text{O}^-]/[\text{La}^{3+}] = 1.5$. Esta última proporción no es estequiométrica, y se explica por la formación de dímeros (Esquema 2) en la cual, una vez formado el dímero de $\text{La}_2^{3+}(\text{CH}_3\text{OH})_x$ solvatado por moléculas de disolvente, el primer valor $(\text{s}^{\circ}\text{pK}_a)_1$ de 7.86 para la ionización de metanol se atribuye a la formación de $\text{La}_2^{3+}(\text{CH}_3\text{O}^-)_2(\text{CH}_3\text{OH})_y$, con dos iones metóxidos y el valor de $(\text{s}^{\circ}\text{pK}_a)_2$ de 10.44, se explica con la formación del complejo $\text{La}_2^{3+}(\text{CH}_3\text{O}^-)_5(\text{CH}_3\text{OH})_z$ con cinco metóxidos.



Esquema 2. Formación de dímeros de La(III) en metanol anhidro y metóxido de sodio a 25 °C y a $\text{s}^{\circ}\text{pH}$:

a) $\text{s}^{\circ}\text{pK}_{a(1,2)}$ 7.86, b) $\text{s}^{\circ}\text{pK}_{a(3-5)} \sim 10.44$

Los autores sugieren que los dímeros están puenteados por iones CH_3O^- y proponen diferentes estructuras para ellos (Fig. 25) todas con al menos un ión metóxido como puente (Fig. 25C), y con un número incierto de moléculas de disolvente. [50]

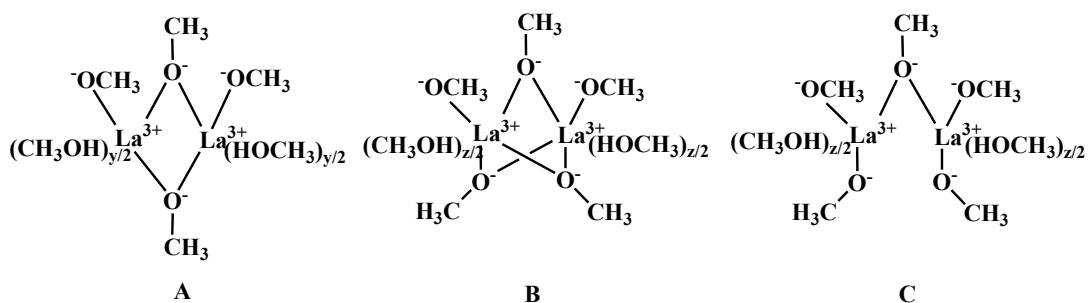


Fig. 25 Estructuras propuestas para los dímeros de La(III) puenteados por iones metóxido, en metanol a 25 °C.

En un estudio posterior en metanol anhidro, los mismos autores utilizaron los cationes Zn^{2+} , Co^{2+} y Eu^{3+} logrando mantener solubles sus metóxidos en toda la región de pH sin la ayuda de ligantes estabilizadores. [51] Encontraron que las constantes de disociación aparente $(\text{p}K_a)_n$, dependen fuertemente de las condiciones experimentales como la concentración inicial de la sal, el valor de la fuerza iónica y de interacciones específicas con los contraiones. Los valores de $(\text{p}K_a)_1$ y $(\text{p}K_a)_2$ en la Tabla 4 se refieren al consumo del primer y segundo equivalente de metóxido; es decir, al valor para la ionización de las moléculas de metanol unidas al metal.

Tabla 4 Constantes de ionización de las moléculas de metanol unidas al ión metálico $M^{x+}(\text{CH}_3\text{O})$ en metanol a temperatura ambiente. $\text{p}K_i = 10^{-16.77}$ a 25 °C.

Ión Metálico	$(\text{p}K_a)_1$	$(\text{p}K_a)_2$
Zn^{2+}	10.34 ± 0.14	9.25 ± 0.18
Co^{2+}	12.84 ± 0.03	9.96 ± 0.06
La^{3+}	7.3 ± 0.05	10.36 ± 0.06
Eu^{3+}	6.61 ± 0.06	8.17 ± 0.04

Los iones metálicos Zn^{2+} y Co^{2+} muestran un perfil de titulación brusco en el que se consumen dos equivalentes de metóxido por equivalente de ión metálico. Ya que el valor del $(\text{p}K_a)_2$ es menor que el valor del $(\text{p}K_a)_1$ (Tabla 4) se ve reflejada la cooperatividad por estos iones metálicos entre la primera y segunda ionización de metanol. En cambio, al titular el catión Eu^{3+} el perfil obtenido es por pasos consecutivos y se consumen dos equivalentes de metóxido por uno de metal. Al titular el catión La^{3+} sólo se llega a consumir 1.5 equivalentes de metóxido, los autores lo relacionan con la formación de dímeros de lantano (Fig. 25). Para comprobar esto

hicieron un estudio por RMN de ^{31}P con el sustrato no activado difenilfosfato en concentración 2mM. En la titulación encontraron que el s_pK_a de 3.95 del difenilfosfato se reduce a 3, en presencia del catión La^{3+} en concentración de 4mM. Este resultado indica que el fosfodiéster se compleja fuertemente por el ión $\text{La}(\text{III})$ y proponen dos estructuras posibles para los complejos de acuerdo a la estequiometria (Fig. 26). Emplean dos ajustes, el primero es en la relación de un ión metálico por dos moléculas de fosfodiéster (Fig. 26 A), y la segunda relación son dos iones metálicos por dos moléculas de fosfodiéster, ésta última es indistinguible de la relación uno a uno (Fig. 26 B). [51]

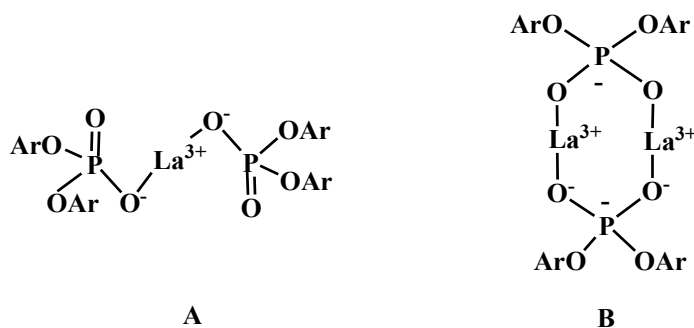
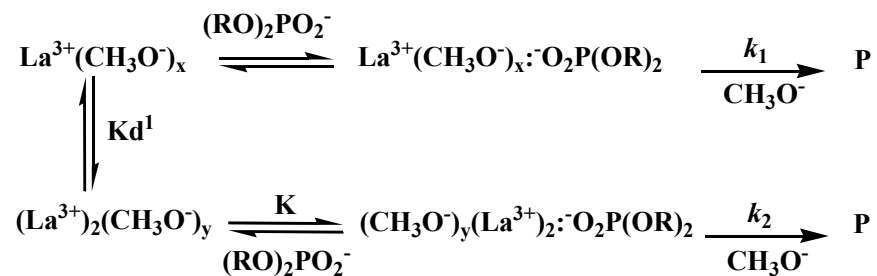


Fig. 26 Estructuras posibles de los complejos de $\text{La}(\text{III})$ en presencia de difenilfosfato en MeOH : A) Complejo 1:2, b) Complejo 2:2 (ó 1:1)

Sin embargo, con estos experimentos no lograron comprobar ni el número total de iones metóxidos unidos ni la estructura de los complejos, ya que ambas estructuras (Fig. 26 A y B) son indistinguibles por RMN y por potenciometría a $25\text{ }^\circ\text{C}$; sin embargo, lo que si proponen es un esquema de reacción para el sustrato no activado difenilfosfato, en este incluyen un pre-equilibrio en el cual se unen el complejo $\text{M}^{x+}:\text{CH}_3\text{O}^-$ y el diéster de fosfato $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ para posteriormente llevar a cabo la catálisis (Esquema 3).



Esquema 3. Proceso secuencial para metanólisis de fosfodiésteres promovida por: k_1 especie monomérica de La^{3+} y k_2 especie dimérica de La^{3+}

En el esquema 3 también se presenta una K_d que corresponde a la constante de dimerización de la especie monomérica a la dimérica y las contribuciones a la catálisis de BNPP derivadas del complejo mononuclear k_1 y del complejo binuclear k_2 . Los valores encontrados para la k_1 ($M^{-1}s^{-1}$) y para la k_2 (s^{-1}) son experimentales y los calcularon de manera separada en diferentes valores de ξ pH analizando las secciones lineales de las dependencias de k_{obs} vs $[La^{3+}]$ a altas y bajas concentraciones del metal siguiendo la aparición de fenol por su absorbancia a 279nm. La constante de metanólisis atribuida enteramente al disolvente para difenilfosfato la calcularon en $k_{CH_3O^-} = 2 \times 10^{-10} M^{-1}s^{-1}$. Los resultados obtenidos de las constantes para la metanólisis de difenilfosfato por La^{3+} se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de k_2 para la metanólisis de difenilfosfato por La^{3+} a 25 °C. [51]

ξ pH	$10^5 k_2 (s^{-1})$	$(k_2/k_{disolvente})$
10.22	0.33 ± 0.04	5.8×10^{10}
11	0.55 ± 0.07	1.6×10^{10}
11.64	1.6 ± 0.3	1.1×10^{10}
12.08	1.85	4.5×10^9

Las constantes k_2 se determinaron a altas concentraciones del complejo en las relaciones k_{obs} vs $[La^{3+}]_{Tot}$ a ξ pH fijo, con el fin de asegurar que todo el fosfodiéster se encontrara complejoado por el metal (Esquema 3), y los autores proponen que la gran aceleración en la reacción de metanólisis es promovida por una segunda molécula de complejo, la cual suministra al nucleófilo (metóxido), mientras que la primera molécula de complejo coordina al fosfodiéster por activación de ácido de Lewis. El mecanismo propuesto está en acuerdo con los valores de k_2 (Tabla 5) en donde se observa que al incrementar el ξ pH existen dos efectos contrarios, por un lado un mayor número de iones metóxido unidos al metal que pueden servir como nucleófilos, pero, por otro lado, la carga total del complejo disminuye y el fosfodiéster no se atrae disminuyendo la aceleración. Este efecto contrario se ve en el caso de ξ pH de 12.08 en donde la concentración de iones metóxidos es mayor (Tabla 5) pero la relación $k_2/k_{disolvente}$ es casi un orden de magnitud menor que para los ξ pH menores. [51] Aún así, la aceleración provista sobrepasa por varios órdenes de magnitud a los sistemas acuosos con iones lantánidos y ligantes estabilizadores. De estos valores podemos decir, sin lugar a dudas, que las velocidades de estos sistemas catalíticos con moléculas pequeñas en metanol se aproximan a las de las enzimas

naturales. La eficiencia de las nucleasas artificiales en medios no acuosos se debe principalmente al aumento en las interacciones electrostáticas derivadas de un medio menos polar y con constante dieléctrica más baja que el agua; sin embargo, dichos centros activos en las metaloenzimas deberán ser lo suficientemente polares para permitir la incorporación de iones metálicos provenientes del agua, por lo que, un mejor modelo enzimático será una mezcla rica en disolventes orgánicos como DMF o DMSO y agua, imitando el modo de solvatación de los grupos peptídicos, los cuales incorporan a los cationes metálicos provenientes del agua mediante un cambio negativo en la energía libre. [52]

Las mezclas de disolventes, especialmente aquellas que incluyen agua, se consideran potencialmente interesantes para aplicaciones tecnológicas, debido a sus bajos requerimientos de purificación, fácil manipulación y bajo costo en comparación con los disolventes no acuosos. [53] Aunado a esto, se ha demostrado que la velocidad de hidrólisis de diferentes ésteres de fosfato se incrementa al utilizar las mezclas de disolventes. Un ejemplo de ello es el estudio que realizó Kramer, quien intentando mimetizar el sitio activo de las fosfatasa con Cu(II) funcionalizado con grupos amino y el ligante $[6,6'-(\text{Me}_2\text{HNCH}_2\text{C}\equiv\text{C})_2\text{bpy}]^{2+}$ (L), para dar el complejo $[\text{LCu}(\text{NO}_3)_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})]$, utilizó como sustrato al BNPP y al complejo de Cu(II) en concentración 5mM como catalizador en la mezcla etanol: agua (19:1) por razones de solubilidad, a un pH de 6.6 con $I = 100$ mM (2, 4, 6 trimetilpiridina) a 20°C. En estas condiciones la k_{cat} fue de $4.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y los autores proponen con base en los estudios cinéticos y potenciométricos un mecanismo de hidrólisis en el cual un hidróxido unido al metal realiza el ataque al átomo de fósforo del fosfodiéster el cual presenta una doble activación por coordinación con el metal y por enlace de hidrógeno con el grupo amonio $-\text{NMe}_2\text{H}^+$. (Fig. 27)

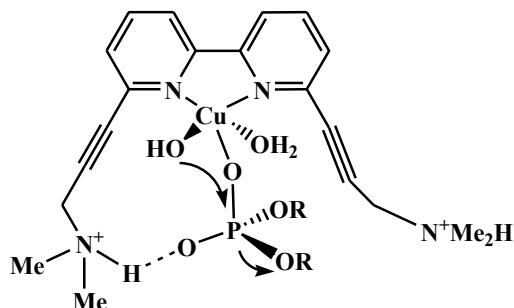


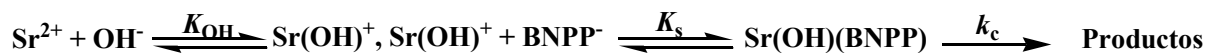
Fig. 27 Mecanismo plausible en la hidrólisis de BNPP por el complejo de Cu(II) en Etanol: H₂O (19:1) a pH de 6.6 y 20 °C.

El mecanismo propuesto también se basa en otros dos estudios que realizaron. El primero utilizando otro ligante pero esta vez con grupos $-NMe_3^+$ en vez de los amonio, encontraron que la velocidad disminuía mil veces; el segundo estudio se hizo variando el porcentaje de agua (5-15%) en la mezcla, lo que dio como resultado que la velocidad de hidrólisis decrece hasta diez veces a mayor cantidad de agua. Los autores explican estas observaciones atribuyéndolo a que la interacción con el grupo amonio se ve desfavorecida en presencia de agua, ya que esta compete por el enlace de hidrógeno con el sustrato. [54] La abolición de enlaces de hidrógeno y la desolvatación del sustrato son factores importante en las reacciones de transferencia de grupos fosforilo, y más si se llevan a cabo en presencia de metales que, principalmente, presentan interacciones del tipo electrostáticas como los metales alcalinotérreos y los iones de lantánidos, en donde los medios ricos en disolventes dipolares apróticos, como el DMSO y con bajo contenido de agua, favorecen las interacciones catalizador- sustrato y ayudan a prevenir la precipitación de los hidróxidos a valores de pH que en agua sería imposible alcanzar. En un trabajo relacionado con esto en el 2004, Taran y Yatsimirsky informaron del incremento en la velocidad de hidrólisis de BNPP por iones de metales alcalinotérreos en la mezcla de DMSO al 90% v/v a 25 °C. [55] El uso de estos iones de metales alcalinotérreos como catalizadores no ha sido extensivamente estudiado a pesar de ser los cofactores de muchas reacciones enzimáticas y por ende biológicamente relevantes (Tabla 1), en ese estudio encontraron que la catálisis promovida por los cationes del bloque s en concentraciones de 1mM ó 2mM (Tabla 6), incrementa la velocidad de hidrólisis en un factor de 10^3 - 10^5 gracias al uso de mezclas ricas en DMSO ya que en medio acuoso estos cationes en ese intervalo de concentración no presentan actividad alguna.

Tabla 6. Constantes observadas para la hidrólisis de BNPP en presencia de metales alcalinotérreos en DMSO al 90% a 25 °C.

[M^{x+}]	[OH⁻]	k_{obs} (s⁻¹)	Especie activa
-----	Bu ₄ NOH 5mM	4.5 x10 ⁻⁸	OH ⁻
-----	NaOH 5mM	1.7 x10 ⁻⁶	OH ⁻
Mg ²⁺ 2mM	Bu ₄ NOH 5mM	1.7 x10 ⁻⁵	Mg(OH) ₂
Mg ²⁺ 2mM	NaOH 5mM	1 x10 ⁻³	MgNa(OH) ₂ ⁺ , MgNa(OH) ₃
Mg ²⁺ 2mM, Na ⁺ 5mM	Bu ₄ NOH 5mM	8.4 x10 ⁻⁴	Mg(OH) ₂
Sr ²⁺ 1 mM	Bu ₄ NOH 2mM	1 x10 ⁻³	Sr(OH) ⁺
Sr ²⁺ 1 mM	NaOH 2mM	4.9 x10 ⁻⁴	Sr(OH) ⁺

Podemos apreciar en la Tabla 6 como los hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos son más reactivos ante la hidrólisis de BNPP que el OH⁻ libre por varios órdenes de magnitud, y también observamos la dependencia en la velocidad con respecto al tipo de hidróxido empleado: con un catión voluminoso como el Bu₄N⁺ la $k_{\text{obs}} = 4.5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ es casi dos órdenes de magnitud menor que al utilizar NaOH a la misma concentración (5mM). Lo cual sugiere un efecto de formación de pares iónicos entre el catión Na⁺ y el fosfodiéster, ya que el Na⁺ al ser pequeño se puede aproximar al sustrato ayudando a neutralizar la carga y de esta manera facilitando el ataque por el OH⁻. El mismo comportamiento se observa con el catión Mg²⁺, con el cual la velocidad se incrementa en mayor proporción en presencia de NaOH como base (Tabla 6). Por el contrario, al utilizar Sr²⁺ el comportamiento es inverso, es decir, la mayor aceleración se observa al emplear el catión voluminoso Bu₄N⁺. Los autores realizaron titulaciones potenciométricas para caracterizar los hidróxidos, y encontraron en el caso de Mg²⁺ una sola especie en la mezcla Mg(OH)₂, contrario al caso de Sr²⁺ el cual puede existir en tres formas químicas diferentes, de las cuales sólo una el SrOH⁺ correlaciona con la actividad catalítica, y claramente se observa (Tabla 6) como las especies catiónicas presentan mayor actividad ante la hidrólisis de BNPP que las especies neutras Mg(OH)₂, y proponen la formación de hidroxocomplejos mixtos en el caso del estudio con Mg²⁺ y Na⁺ del tipo MgNa(OH)₂⁺ y/o MgNa(OH)₃ los cuales son responsables de una mayor aceleración en la hidrólisis al utilizar los cationes sodio (Tabla 6). El mecanismo propuesto en el caso del Sr²⁺ (esquema 4) incluye un primer equilibrio de formación de los hidróxidos, seguido de la asociación reversible de SrOH⁺ con el BNPP para finalmente llevar a cabo la hidrólisis.



Esquema 4. Mecanismo de reacción para el catión Sr²⁺ en presencia de Bu₄NOH en DMSO al 90% v/v a 25°C.

El mecanismo que se presenta (Esquema 4) es el que opera en agua, pero, en el caso de los metales alcalinotérreos, el uso del medio con bajo contenido de agua ayudó a que estos ácidos débiles de Lewis activaran lo suficiente al sustrato y al nucleófilo y como resultado se elevó la actividad catalítica. Este es un resultado inesperado ya que el DMSO estabiliza cationes

más fuertemente que el agua. [55] El incremento en la actividad catalítica en DMSO al 90% se atribuye a una asociación más fuerte entre los aniones hidróxido y el fosfodiéster aniónico con el ión metálico en DMSO y a la solvatación preferente de los cationes de lantánidos trivalentes por el DMSO, lo cual crea un microambiente anhidro en la esfera de coordinación del catalizador favorable para la reacción. Así, las mezclas DMSO- agua ricas en disolvente orgánico son apropiadas para modelar el microambiente al interior del centro catalítico de las enzimas, ya que al incrementar la velocidad de hidrólisis y resolver los problemas de precipitación de los hidróxidos metálicos permite estudios tanto de la actividad como de los mecanismos de hidrólisis con cationes metálicos que en medios acuosos serían imposibles de realizar. [16]

2.5. Hidrólisis de ARN y su molécula modelo HPNPP

El diseño y desarrollo de ribonucleasas artificiales se ha investigado exhaustivamente hasta la fecha, sin embargo, aún no se han dado conclusiones definitivas para el mecanismo de reacción asistido por metales. El ARN (Fig. 3B) es más reactivo que el ADN ante la hidrólisis del enlace P- O, debido a la presencia del grupo 2' -OH en la ribosa que puede actuar como nucleófilo intramolecular. Esta elevada actividad hace al ARN adecuado para realizar investigaciones en las secuencias de ARN directamente, dinucleótidos y ésteres de nucleótidos. El mecanismo de hidrólisis para el ARN y los ésteres de nucleótidos no activados se da mediante la transferencia del éster de fosfato al 2' -oxígeno formando un intermediario fosforano pentacoordinado, el cuál dependiendo de las condiciones puede ser considerado como intermediario o estado de transición (Fig. 28). La ruptura del enlace P- O del intermediario libera al 2', 3'-fosfato cíclico y al 5' -nucleótido como productos de la reacción (ruta A en la Fig. 28). La partida del grupo saliente se asume como el paso limitante de la reacción y en las reacciones catalizadas por iones metálicos las especies fosforano pueden ser vistas como estados de transición o intermediarios de muy corta existencia. La reacción competitiva es de isomerización y se da por la pseudorotación alrededor del átomo de fósforo en el intermediario fosforano, seguida por la ruptura del enlace 3' -O-P endocíclico, resultando el isómero 2' -5' del material de partida (ruta B en la Fig. 28). Esta reacción competitiva se observa usualmente bajo condiciones neutras o ácidas en ausencia de metales, y es una prueba de la existencia del intermediario.

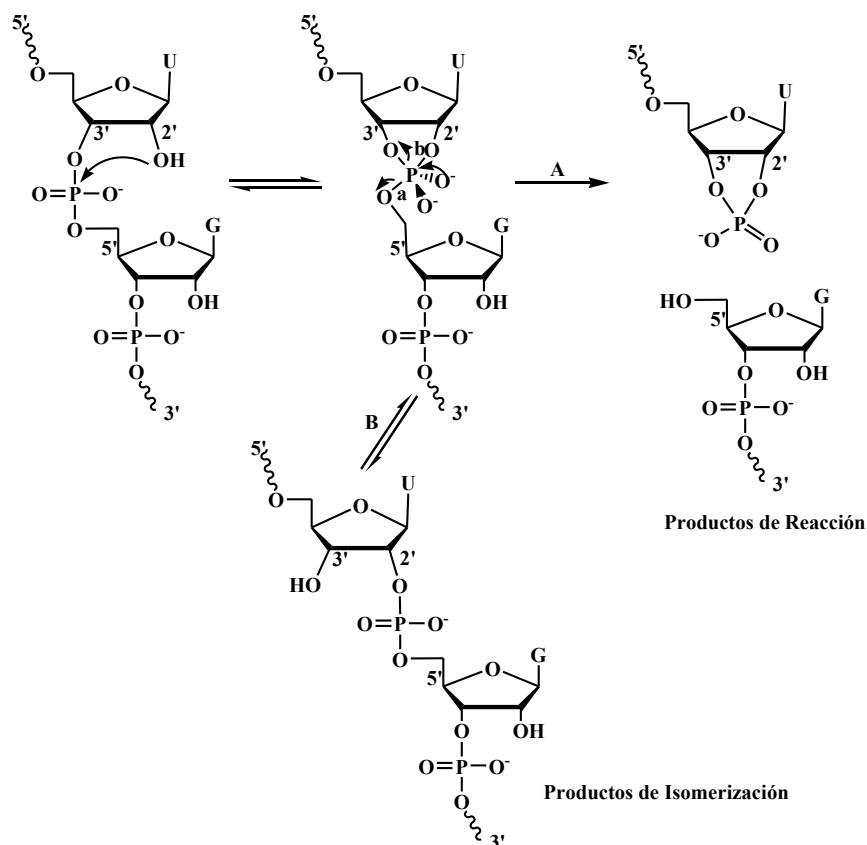


Fig. 28 Mecanismo propuesto para la ruptura de ARN (ruta A) y mecanismo de isomerización (ruta B).

El estudio de la reactividad del ARN es complicado ya que la estabilidad del enlace fosfodiéster depende fuertemente de la estructura secundaria del biopolímero. En las estructuras de doble hélice el apilamiento de bases entre las cadenas dificulta la salida del 5'-nucleotido al adoptar una posición apical en el intermediario fosforano, otra dificultad al trabajar con ARN es que las ribonucleasas naturales se encuentran presentes y pueden afectar los resultados. [56] Por estos inconvenientes también se emplea un sustrato modelo del ARN el 2- hidroxipropil *para* -nitrofenil fosfato (HPNPP) el cual se puede hidrolizar con una velocidad de reacción grande a temperatura ambiente y los requerimientos para una catálisis efectiva son menos rígidos, desde que el sustrato en sí mismo contiene al nucleófilo (Fig. 29). Se han propuesto dos mecanismos cinéticamente indistinguibles para la hidrólisis de HPNPP por metales, el primero incluye la desprotonación del grupo hidroxil del sustrato por un hidróxido unido al metal (Fig. 29A) el cual actúa como en una catálisis de base general. El segundo mecanismo implica la coordinación

directa de la función alcohólica del sustrato al ión metálico y el subsecuente ataque nucleofílico al átomo de fósforo (Fig. 29B). [18]

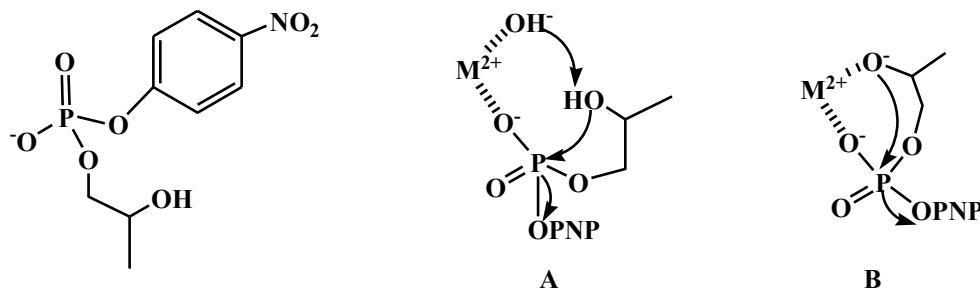
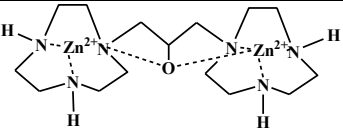
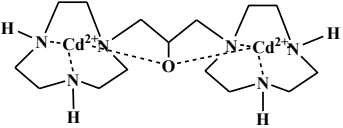
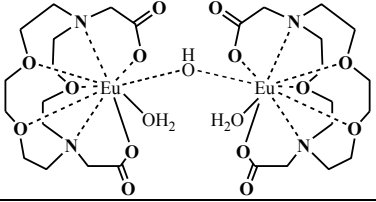
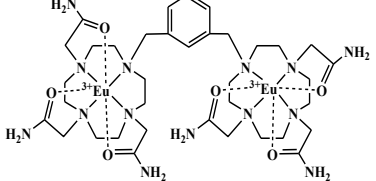
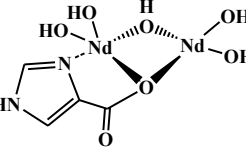
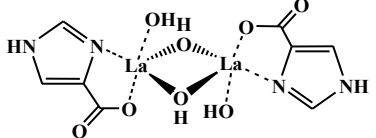
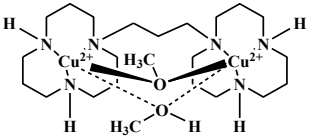
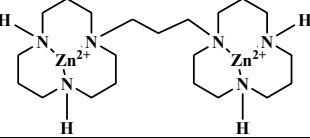
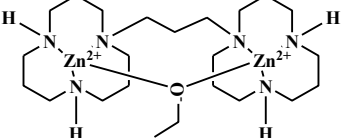


Fig. 29. Estructura del HPNPP y mecanismos de ruptura del enlace fosfodiéster.

Ambos mecanismos se han observado con complejos metálicos, siendo el método experimental que ayuda a comprobar el tipo de mecanismo protolítico o nucleofílico el de efecto isotópico cinético del disolvente, en el cuál se realizan los estudios cinéticos de hidrólisis en agua y posteriormente en D_2O . Si el valor de las constantes de velocidad disminuye en presencia de D_2O podemos atribuirlo a un movimiento concertado del protón en el estado de transición. [57] Se han informado algunos efectos isotópicos del disolvente para las reacciones de transferencia de grupos fosforilo catalizadas por proteínas o por ribozimas. Con el modelo protolítico se esperaría un efecto isotópico grande $^Dk > 2$, ya que se puede considerar al protón como "en vuelo" y se realizan cambios de manera acoplada en los enlaces en el estado de transición, mientras que el modo nucleofílico (Fig. 29B) sólo producirá un efecto cinético isotópico pequeño $^Dk < 1.5$, atribuido a los cambios de solvatación entre los reactantes y el estado de transición. [58] En la tabla 7 se muestran algunos de los complejos o sistemas metálicos que se han utilizado hasta la fecha como ribonucleasas artificiales.

Tabla 7. Catalizadores más eficientes ante la hidrólisis de HpNPP a 25 °C

Catalizador (C)	[C], mM	k , s ⁻¹	k_2 , s ⁻¹ M	pH	Disolvente	Ref.
	0.2		0.68	9.3	H ₂ O	[59]
	0.2		2.8	9.3	H ₂ O	[59]
	1.5	29 x 10 ⁻⁵		9	H ₂ O	[60]
	0.2 - 1		5.5	7.6	H ₂ O	[61]
	2		4.9		H ₂ O	[48]
	2		41		H ₂ O	[48]
(La ³⁺) ₂ (CH ₃ OH) _x	0.5	1.72 x 10 ⁻²		7.6	Metanol	[62]
(La ³⁺) ₂ (CH ₃ O) ₂ (CH ₃ OH) _x	0.5	1.02 x 10 ⁻¹		9.8	Metanol	[62]
	0.25 - 1	0.69		7.4	Metanol	[63]
	0.2 - 1.2		2.75 x 10 ⁵	9.5	Metanol	[14]
	0.02 - 0.2	168		9	Etanol	[64]

Todos los catalizadores en la tabla 7 son complejos binucleares. Los factores importantes que modulan la actividad son: la carga del ión metálico, su acidez (Tabla 1) y los ligantes ya que influyen en la geometría alrededor del átomo central. Los complejos de Zn(II) y Cd(II) con el ligante 2- hidroxipropano- 1,3- bis(1,4,7- triazaciclonan- 1- il) (L2OH) presentan constantes modestas de segundo orden ante la hidrólisis de HPNPP en agua a pH alcalino y a pesar de que ambos iones metálicos son isoelectrónicos y de que el Zn(II) es mucho más ácido que el Cd(II) el último presenta una k_2 tres veces mayor (Tabla 7). Los autores de este trabajo atribuyen estas observaciones a diversos factores entre ellos el pK_a de ionización del agua que lleva a la formación de la especie activa $M_2(L_2O)(OH)$ que en el caso del complejo de Zn(II) es pK_a 7.8 y para el de Cd(II) el pK_a es de 9, lo que nos indica una mayor acidez en el caso del complejo de Zn(II) para ionizar a la molécula de agua. Sin embargo dicha acidez no es determinante en la velocidad ya que el complejo con Cd(II) es más efectivo ante la hidrólisis debido a la alta basicidad del hidróxido unido al metal, el cual puede aceptar con mayor facilidad el protón del sustrato y de este modo generar el alcóxido en una catálisis del tipo base general (Fig. 29A). [59] Por otro lado, los iones de lantánidos trivalentes con macrociclos y ligantes quelato con donadores como aminas, amidas y alcoholes previenen la precipitación de los hidróxidos y la disociación de los complejos binucleares y al reemplazar a las moléculas de agua coordinadas enlazan fuertemente a los ésteres de fosfato aniónicos, dando lugar a interacciones del tipo esfera interna. En los trabajos hechos en agua con complejos de lantánidos no informan un efecto cinético isotópico primario del disolvente, por lo que podemos pensar que la catálisis ácido- base concertada de Brønsted no contribuye significativamente, y que son más importantes los efectos electrostáticos y/o de sinergismo entre los centros metálicos. [57] Por ello una mejor estrategia al diseñar futuros catalizadores con iones de lantánidos es el utilizar ligantes neutros o ligantes carboxilato débiles, como el 4-ICA en donde la especie catalítica es neutra pero es capaz de atraer al éster de fosfato promoviendo una catálisis eficiente. [48] Sin lugar a dudas la reducción de la constante dieléctrica del medio favorece las reacciones de transferencia de grupos fosforilo (Tabla 7), ya que catalizadores con el ligante 1,3- bis- N_1 -(1, 5, 9- triazaciclododecil) propano, que en agua presentan constantes modestas, en metanol y etanol anhidro alcanzan velocidades casi enzimáticas, debido a la acción combinada del complejo binuclear altamente activo y el efecto del medio que se manifiesta al encontrarse el nucleófilo menos solvatado y al incrementar

la fuerza de las interacciones electrostáticas al pasar a un medio con menor constante dieléctrica y menos polar que el agua. [64]

2.6. Destoxificación de triésteres de fosfato

El descubrimiento de la alta toxicidad para los seres vivos de varios compuestos de organofosfatos pentavalentes como insecticidas, herbicidas y algunas armas químicas (Fig. 30) ha creado la necesidad de investigar procesos amigables con el ambiente y de hidrólisis suave (pH neutro y temperatura ambiente), los triésteres de fosfato reaccionan con el grupo serina de la enzima acetilcolinesterasa, inhibiendo la liberación de acetilcolina hasta llegar a producir paros neurotóxicos.

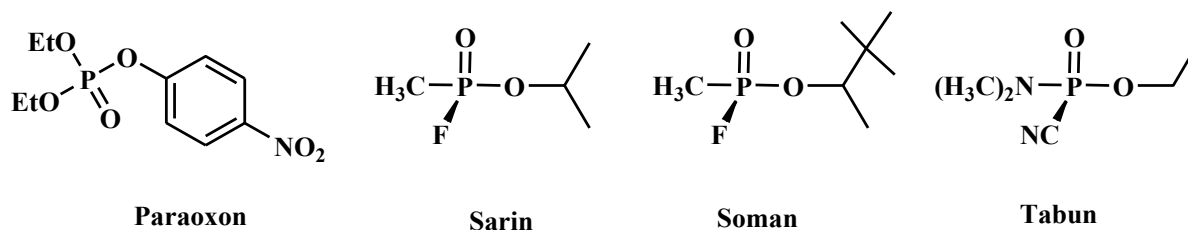


Fig. 30 Estructura de los triésteres de fosfato utilizados como herbicidas o agentes neurotóxicos

Aunque los triésteres de fosfato como pesticidas son importantes en la agricultura, la exposición e éstos y su uso prolongado, así como su acumulación, se reconocen como problemas ambientales a nivel mundial. Entre los métodos más utilizados para su degradación se encuentran la fotólisis, la oxidación, la combustión y la degradación bacteriana. La búsqueda de sistemas nucleofílicos capaces de hidrolizar a los organofosfatos ha sido extensa; aparte de los derivados de iodosil y el iodilcarboxilato que son los más estudiados, otros sistemas incluyen a los alcóxidos, a las oximas, a los peróxidos y a diversos complejos metálicos. Los iones metálicos utilizados son los de transición y los lantánidos y su mecanismo de acción es el de activación electrofílica (ácido de Lewis) seguida por el ataque del hidróxido unido al metal. Sin embargo, en el caso de los triésteres de fosfato que no poseen carga neta se ha demostrado que la activación del sustrato es un factor que contribuye más a la aceleración de la reacción, que la contribución del decremento en la nucleofilia del OH⁻ al estar coordinado. De entre los complejos metálicos (Fig. 31), aquellos con carácter anfifílico son los más efectivos para sustratos lipofílicos neutros.

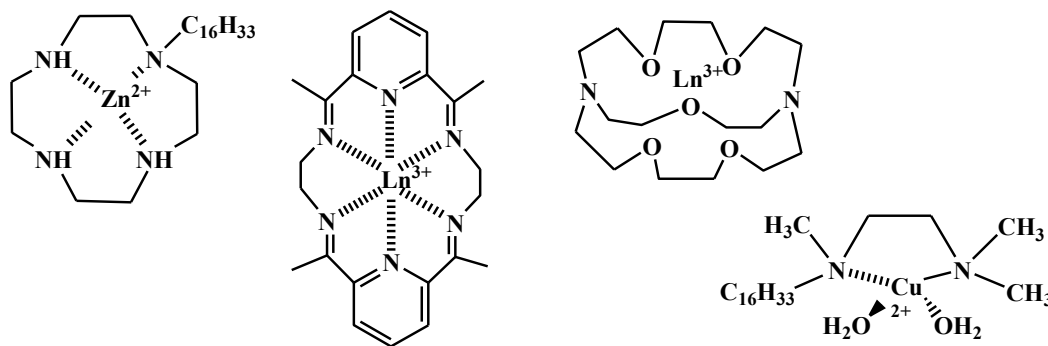


Fig. 31 Estructuras de algunos de los complejos metálicos utilizados para hidrolizar triésteres de fosfato

El nucleófilo OH^- puede hidrolizar al paraoxón en agua con una constante de $0.42 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C , [48] muy pocos complejos hasta el momento proveen mayor eficiencia catalítica que el OH^- libre y sólo la combinación de complejos metálicos con micelas logran mejorar la aceleración prevista por el OH^- en agua. [65] Nuevamente el uso de medios no acuosos como metanol ayuda a elevar la solubilidad de los organofosfatos, y utilizando $\text{La}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ a pH de 8.2 a 25°C , Tsang, Neverov y Brown, en el 2003, con el sustrato paraoxón informaron de una constante de segundo orden de $17.5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y en este valor de pH proponen como especie activa al $\text{La}^{3+}_2(\text{OCH}_3)_2$, la cuál es un dímero puentado por 2 iones metóxido, pero en presencia del sustrato uno de los metóxidos deja de ser puente y es capaz de atacar al átomo de fósforo, liberando al producto $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{OCH}_3$. [66]

Como conclusión podemos decir que hay éxitos importantes en el diseño y estudio de los mecanismos de acción de numerosos catalizadores en la hidrólisis de ésteres de fosfato basados en complejos metálicos. Sin embargo, su eficiencia catalítica todavía está lejos de la enzimática. Los mayores efectos catalíticos han sido mostrados hasta la fecha en sistemas no-acuosos. En estos medios se logra la formación de complejos polinucleares activos, mejor asociación entre sustratos y catalizadores y la deshidratación del nucleófilo, los mismos factores que son responsables de la alta actividad en las enzimas naturales. No obstante, el uso de disolventes anhidros es poco práctico. Por esta razón es importante un estudio con posibilidad de lograr efectos parecidos en medios orgánicos acuosos. En particular son interesantes mezclas de agua con disolventes dipolares apróticos como DMSO, donde se observa un fenómeno de solvatación

preferible, gracias al cual los iones metálicos pueden tener un microambiente esencialmente no acuoso en un medio con relativamente alta cantidad de agua total.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Explorar la actividad catalítica de diversos iones metálicos, en mezclas de disolventes dipolares apróticos con agua, en la ruptura de ésteres de fosfato modelos de ADN, ARN y triésteres tóxicos con el propósito de mejorar la eficiencia de la catálisis.

3.2. Objetivos Particulares

- Estudiar la cinética de la hidrólisis de ésteres de fosfato como BNPP, HPNPP y paraoxón en mezclas de disolventes polares apróticos con agua en presencia de iones y complejos de metales de transición y de lantánidos trivalentes en un amplio intervalo de concentraciones, de componentes y de pH.
- Caracterizar la estabilidad y la composición de los hidroxocomplejos metálicos que funcionan como especies activas por medio de titulaciones potenciométricas, de titulaciones espectrofotométricas y por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en estos medios.
- Proponer un mecanismo de reacción y el efecto que ejerce el medio en la hidrólisis catalítica de ésteres de fosfato.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Para los estudios cinéticos, espectrofotométricos y potenciométricos se utilizaron los siguientes reactivos y disolventes sin purificación ni tratamiento previo.

En el caso de los metales de transición las sales utilizadas fueron:

Zn(ClO₄)₂ · 6H₂O, Alfa Aesar

Zn(NO₃)₂ · 6H₂O, Alfa Aesar

Cd(NO₃)₂ · 4H₂O, Alfa Aesar

Ni(ClO₄)₂ · 6H₂O, Alfa Aesar

Co(ClO₄)₂ · 6H₂O, Alfa Aesar

Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O, Alfa Aesar

Cu(NO₃)₂ · 2.5H₂O, Aldrich

Mn(ClO₄)₂ · 6H₂O, Alfa Aesar

Fe(ClO₄)₂ hidratado, Aldrich

Para los cationes de lantánidos se emplearon:

La(ClO₄)₃ Aldrich, solución en agua 99.9%, 40% en peso, densidad a 25°C 1.479 g/mL

Eu(ClO₄)₃ Aldrich, solución en agua 99.9%, 50% en peso, densidad a 25°C 1.487 g/mL

Nd(ClO₄)₃ Aldrich, solución en agua 99.9 %, 40% en peso, densidad a 25°C 1.436 g/mL

La(CF₃SO₃)₃ Aldrich, 99.999%

Eu(CF₃SO₃)₃ Aldrich, 99.999%

Tb(CF₃SO₃)₃ Aldrich, 99.999%

Bases

Hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado Aldrich, 97%

Hidróxido de tetrabutilamonio Aldrich, solución en agua 40% en peso, densidad 0.995 g/mL a 25°C.

Hidróxido de sodio perlas, J.T. Baker, 98.8%

Metilamina, Merck, 40%

Sustratos

Bis (4-nitrofenil) fosfato BNPP, que se recristalizó de etanol: agua

2- hidroxipropil-4- nitrofenil fosfato, HPNPP se preparó conforme a lo informado. [67]

Difenilfosfato, Aldrich, 99%

Paraoxón –dietil-p-nitrofenilfosfato, Aldrich, 98.4%, densidad 1.2683 g/mL a 25°C

4-nitrofenilfosfato de sodio •6H₂O, Sigma- Aldrich, 98%

Ligantes

1,10 fenantrolina, Aldrich, 97%

Etilendiamina, Aldrich, 98%

2,2' - bipyridina, Aldrich, 98%

2,2':6',2''-Terpiridina, Aldrich, 98%

1,4,7- Triazaciclonoctano, Aldrich, 97%

1,5,9- Triazaciclododecano ·3HBr, Aldrich, 99%

Dietilentriamina, Aldrich, 97%

Trietilentetraamina, Aldrich, 98%

2-piridinaldoxima, Aldrich, 99%

2,3-butanodionamonoxima, Aldrich, 97%

Glicina, Sigma, >99%

Disolventes

DMSO, J. T. Baker, 99%

DMF, J. T. Baker, 99%

MeCN, J. T. Baker, 99.5%

Dioxano, J. T. Baker, 99%

Metanol, J. T. Baker, 99%

D₂O, Aldrich, 99.996%

H₂O (en los casos que utilizamos agua como disolvente ésta fue desionizada obtenida a partir de agua destilada con el equipo NANOPURE BARNSTEAD).

Otros

NaClO₄, Aldrich, 99%

NaNO₃, Aldrich, 99%

Bu₄NBr, Aldrich, 99%

4-Nitrofenol, Aldrich, 99%

Fenol, Aldrich, 99%

NaCl, Aldrich, 99%

HClO₄, J.T. Baker, 69- 72% densidad 1.67 g/mL a 25°C
HCl, J.T. Baker, 36.5- 38% densidad 1.18 g/mL a 25°C
Ácido acético glacial, Mallinckrodt, densidad 1.059 g/mL a 25°C
Acetato de sodio anhidro, Sigma, 99%
NaCF₃SO₃, Aldrich, 98%
Triflato de tetraetilamonio, Fluka, >98%
Naranja de Xilenol, Aldrich, 99%
EDTA, Aldrich, 99%
Bis-Tris Propano, Sigma, >99%
Tris[hidroximetil]amino-metano, Sigma, 99%
Biftalato ácido de potasio, Aldrich, estándar analítico, 99.95- 100.05%
Resina de intercambio iónico IR-120 H Amberlite® Sigma-Aldrich

4.2. Determinación de la concentración de Ln³⁺

La concentración de iones lantánidos en disolución se determinó por una titulación con EDTA con naranja de xilenol como indicador. [68]

4.3. Estudios cinéticos

Las mediciones cinéticas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Hewlett- Packard 8453 de arreglo de diodos, equipado con una celda termostatada.

Las constantes de velocidad mayores a 0.1s⁻¹ se midieron con el equipo de stopped- flow Applied Photophysics SX.18 MV termostatado a 25 °C.

4.3.1. Hidrólisis de BNPP

Las soluciones de partida se prepararon en agua. La concentración inicial para los diferentes cationes fue 0.1 M. El hidróxido de tetrametilamonio se preparó 0.5 M y se valoró con HClO₄ ya estandarizado para obtener la concentración real. El BNPP se preparó 0.001 M en agua.

El curso de la reacción de hidrólisis se siguió monitoreando la aparición del anión 4-nitrofenolato, a 420nm, el cual presenta un equilibrio de desprotonación a pH 7 en agua (Fig. 32).

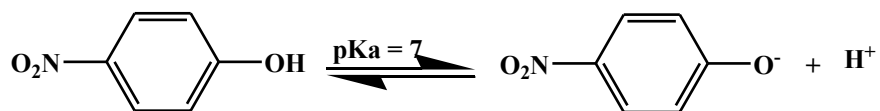


Fig. 32 Equilibrio de desprotonación del *p*- nitrofenol en agua a pH 7

Los primeros estudios realizados fueron con metales de transición, para ver cuál de ellos daba alta actividad en la hidrólisis de BNPP.

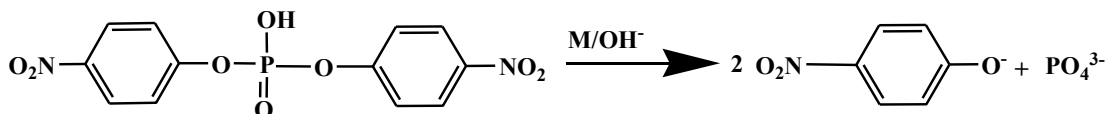


Fig. 33 Reacción general de hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos metálicos

Las constantes de velocidad observada para la hidrólisis de BNPP (Fig. 33), se midieron en condiciones de pseudo- primer orden, manteniendo la concentración de metal en exceso.

Por analogía con un estudio anteriormente realizado en nuestro grupo de trabajo [55] se utilizó DMSO al 90% v/v como medio de reacción, a 37 °C. Para las dependencias de la k_{obs} vs $[\text{OH}^-]_{\text{Tot}}$ las concentraciones en la celda fueron: M^{2+} [1-2mM], Bu_4NOH [1-2.8mM], [2mM] de los diferentes ligantes, BNPP 1×10^{-5} M.

Se realizó un estudio preliminar con los iones de lantánidos trivalentes para determinar el porcentaje en volumen de DMSO en el cuál la actividad catalítica fuera máxima a 25 °C. Para esto se emplearon disoluciones de 0, 20, 40, 60, 80, 90, 95 % v/v de DMSO. El máximo en la velocidad se encontró en 80% v/v de DMSO. Por ello se utilizó este porcentaje de mezcla en todos los estudios con lantánidos a 25 °C.

Los estudios de las dependencias de la k_{obs} vs $[\text{OH}^-]_{\text{Tot}}$ cuyas condiciones en la celda fueron: Ln^{3+} 1mM, Me_4NOH [1-2.8mM], BNPP 1×10^{-5} M. Es importante mencionar que tanto el metal, como el hidróxido y el BNPP se agregaron en disolución acuosa, cubriendo el 20% de la mezcla que corresponde a agua y el resto fue DMSO.

Para los estudios de las dependencias de la k_{obs} vs la concentración de $[\text{Ln}^{3+}]_{\text{Tot}}$ en DMSO al 80% v/v las concentraciones en la celda a un volumen total de 2.5mL, se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8. Concentraciones de Ln(III) y Me₄NOH utilizadas en las dependencias k_{obs} vs [Ln³⁺] en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

mM Ln ³⁺	mM OH ⁻
0.5	1
0.75	1.5
1	2
1.5	3

En todos los casos la concentración de sustrato BNPP fue 1×10^{-5} M. El ajuste en el caso de las cinéticas rápidas (al menos 90% de conversión) se hizo a una cinética de primer orden con la ecuación 4.1

$$A = \Delta A_{\infty}(1 - e^{-k_{obs} t}) + A_0 \quad (4.1)$$

En el caso de las cinéticas lentas se utilizó el método de las velocidades iniciales. El ajuste se hizo a la ecuación 4.2, graficando la absorbancia del 4- nitrofenolato con respecto al tiempo. De la pendiente se obtuvo la velocidad inicial, que al dividirla entre la absorbancia al infinito (A_{∞}), nos dio la constante de velocidad observada k_{obs} . La absorbancia al infinito se obtuvo de agregar una alícuota del 4- nitrofenol en la cual la concentración correspondía a la concentración de sustrato inicial.

$$v_o = \left[\frac{dA_{NF}}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = k_{obs} \varepsilon_{NF} [BNPP] = k_{obs} A_{\infty} \quad (4.2)$$

4.3.2. Estudios cinéticos con HPNPP

La solución de partida se preparó en agua en concentración 1×10^{-2} M del 2-hidroxiopropil-p-nitrofenil fosfato (HPNPP), se pasó por una columna de intercambio catiónico IR-120 H⁺ para intercambiar los iones Ba²⁺, provenientes de la síntesis de la sal, por iones H⁺. Para los estudios de dependencias de k_{obs} vs [OH⁻]_{Tot} en DMSO al 80% v/v a 25 °C se utilizó en la celda Ln³⁺ en concentración 1mM, Me₄NOH [1–2.8mM]_{Tot}, HPNPP 1×10^{-5} M.

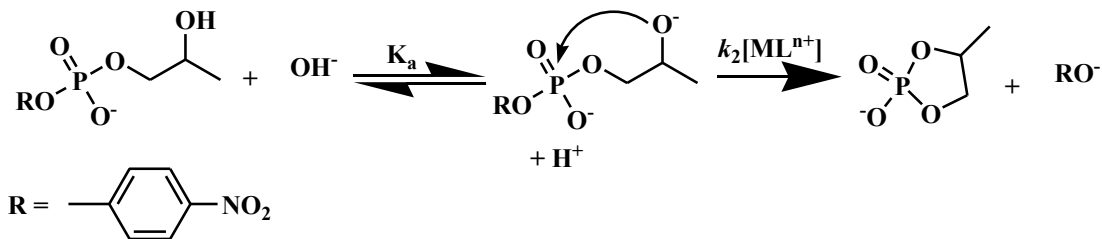


Fig. 34 Mecanismo para HPNPP en agua que consiste en equilibrio de desprotonación, seguido por el ataque al átomo de fósforo.

Para los estudios de las dependencias de la k_{obs} vs la concentración de $[\text{Ln}^{3+}]_{\text{Tot}}$ las concentraciones y proporciones en la celda fueron las mismas que en el caso del estudio con el sustrato BNPP (Tabla 8). En todos los casos la concentración de sustrato HpNPP fue de 1×10^{-5} M.

4.3.3. Hidrólisis de Difenilfosfato

Se realizó el estudio en presencia de 1mM de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$, con variación de Me_4NOH en concentraciones de 1–2.8 mM, 1×10^{-5} M del sustrato no activado Difenilfosfato (Fig. 35) en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Se monitoreo la aparición de fenol en 275nm y 280nm.

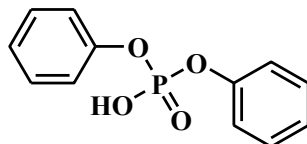


Fig. 35 Estructura del diéster de fosfato no activado difenilfosfato

4.3.4. Estudios con Paraoxón

Se realizó el estudio k_{obs} vs la concentración de $[\text{OH}]_{\text{Tot}}$, en presencia de 1mM de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$, con variación de Me_4NOH [1–2.8mM], el sustrato que es un triéster de fosfato paraoxón (Fig. 36) en concentración 1×10^{-5} M.

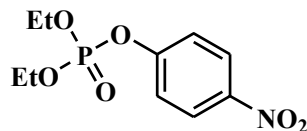


Fig. 36 Estructura del triéster de fosfato paraoxón

4.3.5. Estudios con *p*-nitrofenilfosfato

Se realizó el estudio de k_{obs} vs la concentración de $[OH^-]_{Tot}$, en presencia de 1mM de $La(ClO_4)_3$, con variación de Me_4NOH [1.5–3.8mM], *p*-nitrofenilfosfato (Fig. 37) $1 \times 10^{-5}M$.

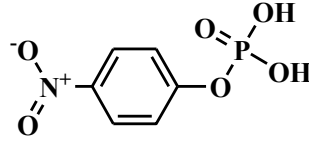


Fig. 37 Estructura del monoéster de fosfato *p*- nitrofenilfosfato

4.4. Estudios Potenciométricos

Se realizaron titulaciones potenciométricas en una celda de 30mL, bajo atmosfera de nitrógeno a 25 °C, las mediciones de pH se hicieron con un potenciómetro modelo Orion 710A. Con un electrodo Orion ROSS.

4.4.1. Determinación del pK_w en DMSO al 80% v/v a 25 °C

El electrodo fue calibrado en términos de $[pH^+]$ por titulaciones de $HClO_4$ en concentraciones de 1-3mM, en presencia de 10mM de $NaClO_4$. Para este medio DMSO al 80% v/v, la constante de autoprotólisis del agua determinada fue de $pK_w = 18.5 \pm 0.1$. [69] Dicha constante se calculó mediante el ajuste a la ecuación 4.3, de graficar el volumen de Me_4NOH añadido contra el pH.

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH - pK_i)} - f \cdot 10^{-pH})}{C_B + f \cdot 10^{-pH} - 10^{(pH - pK_i)}} \quad (4.3)$$

En donde V es el volumen añadido, C_B es la concentración de la base añadido, V_0 es el volumen inicial de ácido fuerte, pH es el valor de pH medido, el pK_i es el cologaritmo del producto iónico del agua en este medio (K_i) y f es un factor de corrección que es una función de los coeficientes de actividad y la diferencia en el potencial de la interfase del electrodo (potencial de unión). La ecuación 3 está en términos de concentraciones ya que se obtuvo mediante la sustitución de $[H^+]$ (que es la concentración de H^+ "aparente", es decir la empleada al medir el valor de pH directamente) por 10^{-pH} , K_i (corresponde al producto iónico del agua "aparente" sin considerar los coeficientes de actividad) por 10^{-pK_i} . En la ecuación original aparece el término V_e que corresponde al volumen en el punto de equivalencia, que al ser multiplicado por C_B es

equivalente al producto de V_0 y C_A cuyo valor de concentración es conocido, mediante la relación $V_e C_B = V_0 C_A$. Las concentraciones de base añadida, el volumen inicial y los volúmenes a adicionados son conocidos. De este modo se calcularon los valores de pK_i y de f y se corrigieron los valores de pH observados mediante la relación $f(pH_{corr} = pH - \log f)$.

4.4.2. Determinación de constantes de hidrólisis de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v a 25 °C

Se realizaron al menos tres titulaciones con cada sal de $Ln(ClO_4)_3$ en concentraciones de [0.5-2mM]. El titulante Me_4NOH se adicionó en pequeñas cantidades, la estabilidad y reproducibilidad en las mediciones de pH no se vio afectada por la presencia y/o ausencia de electrolito soporte (10mM $NaClO_4$). De la misma forma se llevaron a cabo titulaciones de $Ln(CF_3SO_3)_3$ en concentraciones de [0.5- 2 mM]. El titulante Me_4NOH se adicionó en pequeñas cantidades. En ausencia o en presencia de electrolito soporte (10mM $NaCF_3SO_3$ ó 10mM $Et_4NCF_3SO_3$) la reproducibilidad y estabilidad en las mediciones de pH no se vio afectada.

4.5. Estudios Espectrofotométricos

Se utilizó un espectrofotómetro Unicam Uv500 y celdas de cuarzo de 5 cm. Las titulaciones espectrofotométricas de $Nd(ClO_4)_3$ se realizaron en concentraciones de [1-1.5mM], con Me_4NOH a 25° C en DMSO al 80% v/v.

4.6. Titulaciones por RMN ^{31}P

Se adquirieron los espectros de ^{31}P en un espectrómetro de RMN Varian Gemini 300. Se realizaron titulaciones por RMN de ^{31}P en presencia de difenil fosfato en concentración de 2mM y $La(ClO_4)_3$ en concentraciones [0-10mM] a 25° C en 80% v/v DMSO- D_2O . También en las mismas concentraciones de metal y diéster de fosfato se realizó la titulación en D_2O a 25°C. Se midieron los desplazamientos químicos (δ) y se ajustó a la ecuación 4.4 y corresponde a una asociación del tipo 1:1 y toma en cuenta las condiciones de intercambio rápido de ligantes.

$$\Delta\delta = (\delta_{enlazado} - \delta_{libre})K[La(III)]/(1+K[La(III)]) \quad (4.4)$$

También se titularon 2mM de paraoxón y $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentraciones [0-10mM] a 25 °C en DMSO al 80% v/v y D_2O .

4.7. Titulaciones por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser

Se utilizaron celdas estándar de cuarzo de 1cm de trayectoria óptica, para los estudios en el láser, se midió el espectro de excitación de $\text{Eu}(\text{III})$ y el tiempo de vida del estado excitado con un láser de Nd-YAG y MOPO SL, las mediciones de luminiscencia con resolución en el tiempo se llevaron a cabo con un osciloscopio Tektronix TDS 3034B.

La transición ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_0$ del ión $\text{Eu}(\text{III})$ se monitoreó entre 578nm y 582nm (Fig. 38). Mientras que el espectro de emisión se obtuvo de la transición ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ en $628 \pm 27\text{nm}$ a 25 °C.

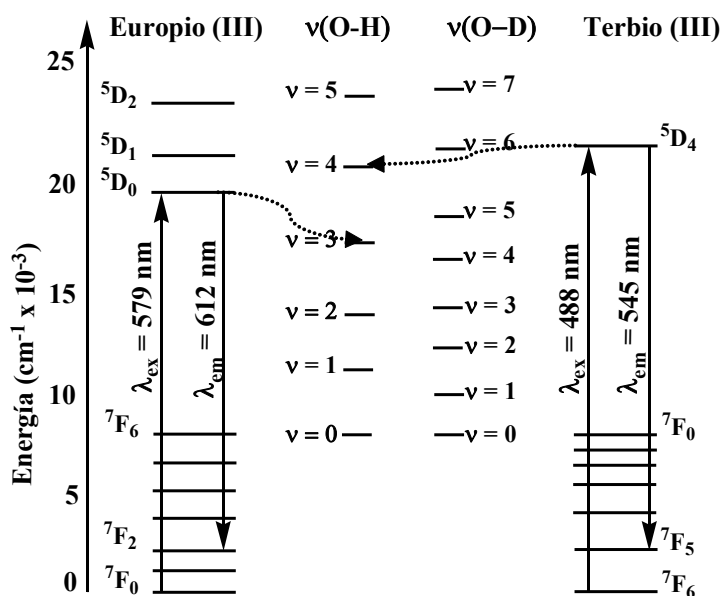


Fig. 38 Diagrama de Jablonsky para las transiciones electrónicas de $\text{Eu}(\text{III})$ y $\text{Tb}(\text{III})$

Se realizó en primer lugar un estudio para determinar el número de moléculas de agua coordinadas al metal, para ello se utilizó $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM de y $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en concentración 1mM, se midieron sus espectros de excitación y el tiempo de vida del estado excitado en: H_2O , D_2O , DMSO, 80%DMSO v/v, 80%DMSO- 20% D_2O v/v. Los ajustes a una función exponencial se hicieron mediante la ecuación 4.5, y se obtuvo el tiempo de vida del estado excitado (τ) en donde α es el factor pre exponencial.

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/ \tau_i) \quad (4.5)$$

Al inverso de τ se le conoce como a la constante de decaimiento del estado excitado (k_{obs}), la cual se puede dividir entre las contribuciones k_{rad} de los procesos radiativos y k_{nr} de los procesos de decaimiento no radiativos ecuación 4.6, es decir en la primera contribución k_{rad} la energía se transfiere a las moléculas de agua (Fig. 38) en las cuales las vibraciones (O-H) están involucradas (ecuación 4.7) y por ello se pueden conocer las contribuciones de cada molécula de agua coordinada al ión metálico, en la segunda constante k_{nr} se encuentran las demás contribuciones excepto las del agua.

$$\tau^{-1}_{\text{obs}} = k_{\text{obs}} = k_{\text{rad}} + k_{\text{nr}} \quad (4.6)$$

$$k_{\text{H}_2\text{O}} = k_{\text{rad}} + k_{\text{nr}} + \Sigma k_{\text{XH}} \quad (4.7)$$

Para encontrar la contribución k_{rad} se recurre al efecto isotópico en el cuál se reemplaza al agua por D_2O , ya que los osciladores O-D presentan un efecto menor en el proceso de abatimiento del estado excitado que los osciladores O-H (Fig. 38). Por ello se obtiene la $k_{\text{D}_2\text{O}}$ (ecuación 4.7b) y con ello podemos saber la contribución de k_{nr} . [70]

$$k_{\text{D}_2\text{O}} = k_{\text{rad}} + k_{\text{nr}} \quad (4.7b)$$

Con la diferencia de constantes Δk (ecuación 4.8), se consigue determinar el número de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación q mediante la relación 4.9, en la cual A es un factor para cada tipo de ión lantánido y depende de los ligantes que están presentes en la primera esfera de coordinación.

$$\Delta k = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} \quad (4.8)$$

Los ligantes que abaten la fluorescencia son los que presentan osciladores -OH y moléculas como alcoholes, aminas, amidas y agua. El factor A en la ecuación 4.9 toma en cuenta estas contribuciones al abatimiento en las constantes de velocidad. En el caso de Eu(III) el valor de A es 1.05 y el número de moléculas de agua será q . [70]

$$q = A * (\tau^{-1}_{\text{H}_2\text{O}} - \tau^{-1}_{\text{D}_2\text{O}}) \quad (4.9)$$

Posteriormente se obtuvieron los tiempos de vida de decaimiento del estado excitado de Eu(III) en la mezcla DMSO al 80% v/v a 25 °C y mediante la ecuación (4.10) obtenemos la fracción mol del disolvente en la primera esfera de coordinación L_s , y la k_w es la constante de decaimiento del ión Eu(III) en agua, k_s es la constante de decaimiento del ión Eu(III) en el disolvente no acuoso y k_{mix} es la constante de decaimiento del ión Eu(III) en la mezcla. [71]

$$L_s = (k_w - k_{\text{mix}})/(k_w - k_s) \quad (4.10)$$

Por espectroscopia de luminiscencia inducida por láser se llevó a cabo la titulación de de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM y de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en concentración de 1mM en DMSO al 80%v/v a 25°C con Me_4NOH . Se obtuvieron tanto los espectros de excitación como los tiempos de vida del estado excitado.

Para comprobar la existencia de dímeros en la disolución se recurrió a la técnica de transferencia de energía resonante entre lantánidos (LRET). [72] El estudio se realizó obteniendo los espectros de emisión de diversos $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$.

4.8. Programas de Cómputo

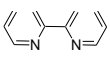
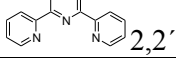

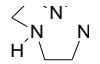
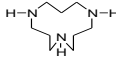
- Origin versión 5.0 para los ajustes de las constantes de velocidad al método integral (ec. 4.1) ó por velocidades iniciales (ec. 4.2).
- HYPERQUAD 2003 versión 3.0.51, se utilizó para calcular las constantes de equilibrio.
 - Se utilizó el parámetro estadístico sigma, el cual relaciona la diferencia entre los valores medidos y los valores calculados, y su valor debe ser cercano a uno, para asegurar que los datos que se han ajustado dentro del error experimental de la técnica empleada.
- Los diagramas de distribución de especies se modelaron en el programa HYSS 2003.
- La desconvolución de los espectros de excitación se llevó a cabo con el programa PEAK FIT 4.12.
 - Se obtuvo el full width at half maximum (FWHM) de la desconvolución de los espectros de excitación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de metales de transición en DMSO al 90% v/v

Debido a la aceleración en la reacción de hidrólisis que se encontró con hidroxocomplejos de metales alcalinotérreos en la mezcla de disolventes DMSO al 90% v/v a 37 °C. [55] Se utilizó, por analogía como medio dicha mezcla de disolventes para comenzar con los estudios de hidrólisis. Se probaron las sales de cationes como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} en concentración total de 2mM. Realizando estudios de dependencia de la k_{obs} vs la variación en la concentración de OH^- con hidróxido de tetrabutilamonio como base, ya que a altos porcentajes de codisolvente orgánico el NaOH es insoluble. Todos los hidróxidos de los cationes con excepción del Ni^{2+} precipitaron en la mezcla, antes de formarse hidroxocomplejos activos ante la hidrólisis de BNPP. Se encontró actividad catalítica relevante por el catión Ni^{2+} en concentración de 2mM, por ello se estudió con mayor detalle y diferentes ligantes en concentración de 2mM, estos ligantes son donadores por nitrógeno como: aminas alifáticas, aromáticas, fenantrolinas y aza macrociclos (Tabla 9).

Tabla 9. Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP por diferentes hidroxocomplejos de Ni^{2+} , en DMSO al 90% v/v a 37 °C. ^a1mM de Bu_4NOH . ^b0.8mM de Bu_4NOH . ^cpH = 8.6, T = 75 °C. [36]

Ligante	$k_{obs} (s^{-1})^a$	$k_{obs} (s^{-1})^b$	$k_{obs} (s^{-1})^c$
Sin ligante	1.02×10^{-6}	4.06×10^{-6}	2.35×10^{-7}
 1, 10-Fenantrolina	1.36×10^{-6}	1.1×10^{-6}	
 2,2':6',2''-Terpiridina	3.4×10^{-5}	1.22×10^{-5}	
 2,2- Bipiridina	1.56×10^{-5}	1.3×10^{-6}	8.31×10^{-7}
 1,4,7-Triazaciclononano	9.64×10^{-7}	4.19×10^{-7}	
 1,5,9-Triazaciclododecano	1.58×10^{-5}	7.09×10^{-6}	
$(NH_2CH_2CH_2)_2NH$	3.18×10^{-5}	1.93×10^{-5}	
$NH_2CH_2CH_2(NHCH_2CH_2)_2NH_2$	1.29×10^{-5}	8.56×10^{-6}	9.94×10^{-7}

El uso de mezclas de DMSO al 90% v/v ayuda a elevar la actividad fosfoesterolítica de los hidróxidos de Ni^{2+} sin el uso de ligantes estabilizadores, en comparación con la actividad en agua aproximadamente un orden de magnitud. [36] Sin embargo, los estudios con el catión Ni^{2+} desnudo presentan baja reproducibilidad, en la (Tabla 9) se muestra como varía la k_{obs} con respecto a la concentración de OH^- 0.8mM y 1mM, y con respecto al uso de los diferentes ligantes (2mM). En todos los casos se observa que al utilizar ligantes la k_{obs} aumenta a mayor concentración de hidróxido. Se comparan los resultados únicamente hasta una concentración de 1mM de hidróxido, debido a que no todos los ligantes evitan la precipitación de los hidróxidos a altos valores de pH, asumiendo que la geometría del centro metálico es octaédrica en el medio de trabajo, por lo cual la esfera de coordinación aun posee sitios vacantes por la estequiometría M:L empleada [1:1]. [73] En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos, podemos notar que los complejos con ligantes tridentados promueven con mayor eficiencia la aceleración de la reacción de hidrólisis que los complejos que poseen ligantes bidentados como 1,10- fenantrolina ó 2,2-bipiridina. Y es importante notar que el ligante tridentado 1,5,9- triazaciclododecano permitió la estabilización del catión hasta una concentración de 2.8mM de OH^- sin precipitación y sin perder la actividad catalítica. (Fig. 39)

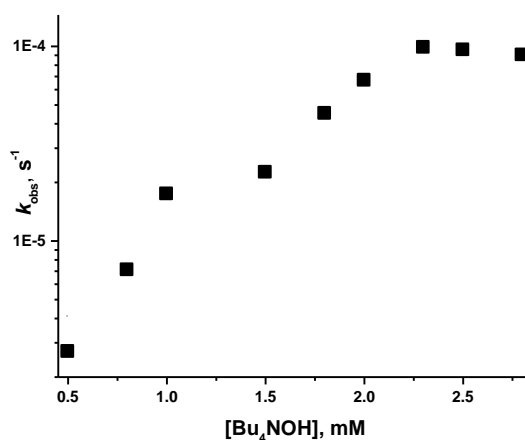


Fig. 39 Constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de BNPP en presencia de Ni^{2+} en concentración de 2mM y el ligante 1,5,9- triazaciclododecano en concentración 2mM vs la concentración de Bu_4NOH en DMSO al 90% v/v a 37 °C (coordenadas semilogarítmicas).

En la Fig. 39 se observa un máximo en la velocidad observada a una concentración de 2.3mM de OH^- , con una constante de $6.84 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, es decir casi 300 veces mayor que la

constante que se observa en agua para el catión desnudo. Se sabe que los acuaiones y los solvatos de DMSO del Ni(II) presenta una geometría octaédrica, en el caso de los complejos estabilizados 3 sitios de coordinación estarían ocupados por el azaciclo tridentado . [73] Además en mezclas de agua con DMSO el catión Ni^{2+} está preferentemente solvatado por DMSO en la mezcla de trabajo es decir en DMSO al 90% v/v. [74] Ya que la mayor actividad catalítica se da en la relación estequiométrica M:L:OH [1:1:1], podemos suponer cómo activa una especie del tipo Ni(L)OH^+ , en donde el resto de sitios de coordinación vacantes pueden ser ocupados por el sustrato, por el disolvente o por el agua. Se realizó el estudio de dependencia de la k_{obs} en función del porcentaje de DMSO en la mezcla de disolventes para ver como afectaba la composición del medio en la velocidad de hidrólisis en las condiciones anteriores de catalizador, ligante y OH^- en concentración de 2mM de (Fig. 40).

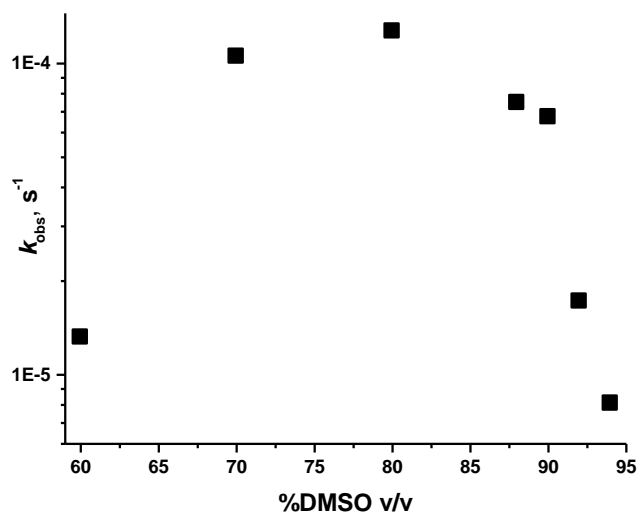


Fig. 40 Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP en presencia de Ni^{2+} 2mM, 1,5,9-triazaciclododecano 2mM, y OH^- 2mM vs el porcentaje de DMSO v/v a 37 °C (coordenadas semilogarítmicas).

Este estudio muestra una gráfica en forma de campana, con un máximo en la velocidad en 80% de DMSO v/v (Fig. 40); por debajo de 60% de DMSO v/v los hidroxocomplejos precipitaron ya que el medio es más rico en agua y no permite la estabilización de las hidroxoespecies a valores elevados de pH posiblemente por la formación de agregados polinucleares, en concentraciones mayores a 80% de DMSO v/v la velocidad disminuye

conforme aumenta la concentración del codisolvente orgánico, una posible explicación es que en 80% de DMSO v/v aún existen suficientes moléculas de agua en la esfera de coordinación del metal para que al hidrolizarse puedan fungir como nucleófilo. Mientras que en disoluciones con mayor contenido de DMSO éste no permite la formación de hidroxocomplejos tan rápidamente, ya que habrá que desplazar al DMSO coordinado por moléculas de agua que se encuentran en tan baja proporción en el medio que se hacen inaccesibles, y como consecuencia la velocidad de hidrólisis disminuye a valores mayores al 85% de DMSO v/v. Vale la pena mencionar que a pesar de la notable aceleración en la reacción de hidrólisis de BNPP que proveen los hidroxocomplejos de níquel con el ligante 1,5,9- triazaciclododecano en DMSO al 80% v/v $\cong 10^3$, con respecto a la velocidad para los mismos hidroxocomplejos en agua, el sistema mixto no fue lo suficientemente reproducible como para permitir el estudio de la especiación. Por esta razón y de acuerdo a lo informado en la literatura, el uso de iones de lantánidos trivalentes es una estrategia para mejorar la actividad catalítica de las nucleasas artificiales por esta razón se utilizaron para la hidrólisis de ésteres de fosfato. [28]

5.2. Hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de percloratos de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v

Se estudió la dependencia de la constante de velocidad observada k_{obs} con respecto a la concentración de DMSO en las mezclas con agua a 25 °C, para ello se utilizaron $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM y Me_4NOH en concentración 2mM. (Tabla 10).

Tabla 10 Constantes de velocidad observada para la hidrólisis de BNPP por Eu^{3+} (1mM) y OH^- (2mM) en mezclas DMSO- agua de diferentes composiciones a 25 °C.

DMSO, % vol	k_{obs} , s^{-1}
0	2×10^{-4}
20	0.0011
40	3×10^{-4}
60	0.0018
80	0.0099
90	0.0070

En la Tabla 10 se muestra la variación de la k_{obs} con respecto al porcentaje de DMSO, se observa un máximo en la velocidad en 80%. Por debajo de esta proporción de codisolvente orgánico la velocidad disminuye, una posible explicación para este hecho es que el medio al

tener una cantidad de agua > 50 % en peso, no permite la estabilización de los hidroxocomplejos a valores altos de pH, como para elevar la actividad catalítica, es hasta DMSO al 60% v/v donde el efecto del medio empieza a ser importante ya que la aceleración provista sobrepasa por 1 orden de magnitud a la k_{obs} en agua, llegando al máximo en DMSO al 80% v/v en donde el efecto previsto por el medio en la aceleración es de $\cong 10^2$. Posteriormente disminuye a mayor concentración de DMSO. Como en el caso con el catión Ni(II) esta disminución en la velocidad, la podemos atribuir a que en porcentajes mayores al 80% de DMSO v/v el catión Eu(III) se encuentra preferentemente solvatado por DMSO. [71] Lo cual repercute en la formación del nucleófilo OH⁻ unido al metal a partir de la desprotonación del agua, ya que ésta se encuentra en muy baja proporción en la esfera de coordinación del ión a altos porcentajes de codisolvente orgánico. Se probó la estabilidad del sistema dejando incubar al Eu(ClO₄)₃ en concentración de 1mM de y Me₄NOH en concentración de 2mM en DMSO al 80% v/v por 90 minutos durante los cuales no se perdió la actividad catalítica. Con base en estos resultados preliminares de actividad y estabilidad se escogió la mezcla DMSO al 80% v/v como medio óptimo para los estudios posteriores.

La hidrólisis alcalina de BNPP no se ve afectada por la mezcla del DMSO con el agua ya que la constante de segundo orden encontrada $k_2 = 2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ es muy similar a la informada en agua $k_2 = 1.08 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. [48] En la Fig. 41 se encuentra la gráfica de la dependencia de k_{obs} vs la variación en la concentración de [Me₄NOH] para Ln(ClO₄)₃ en concentración de 1mM en DMSO al 80% v/v a 25 °C sin el uso de ligantes estabilizadores ni electrolito soporte.

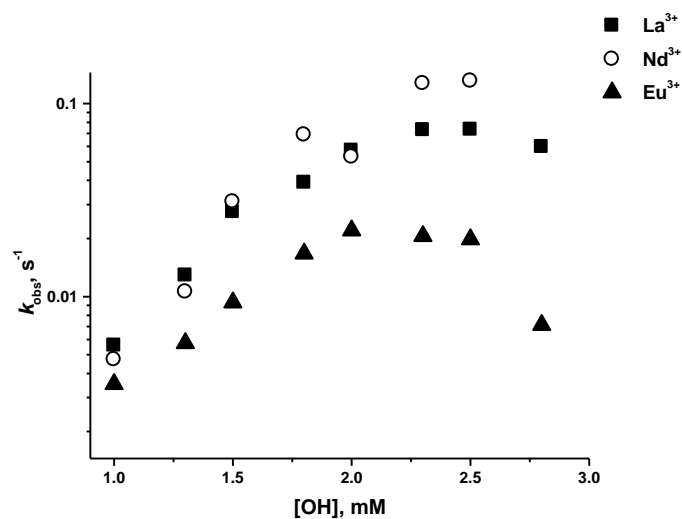


Fig. 41 Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP k_{obs} vs $[OH^-]$, en presencia de $Ln(ClO_4)_3$ (1mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C (coordenadas semilogarítmicas).

Entre los cationes estudiados la mejor actividad ante la hidrólisis de BNPP la muestra el ión Nd(III). El valor de la k_{obs} se incrementa conforme aumenta la concentración de ión hidróxido, con un perfil (Fig. 41) que pasa por un máximo en la constante de velocidad a una concentración entre 2.3mM y 2.5mM de OH^- para posteriormente disminuir. Un comportamiento del mismo tipo se observa con el catión La(III) con un máximo similar en la k_{obs} ; en el caso de Eu(III), la k_{obs} se incrementa significativamente a partir de una concentración de OH^- de 1.8mM, pero se mantiene casi constante sin pasar por un máximo hasta una concentración de hidróxido de 2.5mM. No podemos correlacionar la actividad catalítica en este estudio con la acidez del catión, pero el hecho de que la velocidad disminuya para los tres cationes, para concentraciones de OH^- superiores a 2.5mM, posiblemente muestre la competencia entre la formación de las especies activas y el equilibrio de precipitación de $Ln(OH)_3$. El orden de reacción con respecto a hidróxido varía con los 3 iones, desde 1.32 para Eu(III) hasta 3.76 para Nd(III) lo cual puede reflejar la existencia de diferentes especies hidroxiladas. Para tener información adicional del sistema se realizaron los estudios cinéticos del cambio en la k_{obs} al variar la concentración de metal, manteniendo fija la relación $[Ln(III)]:[OH^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. La (Fig. 42) muestra en coordenadas logarítmicas la dependencia obtenida.

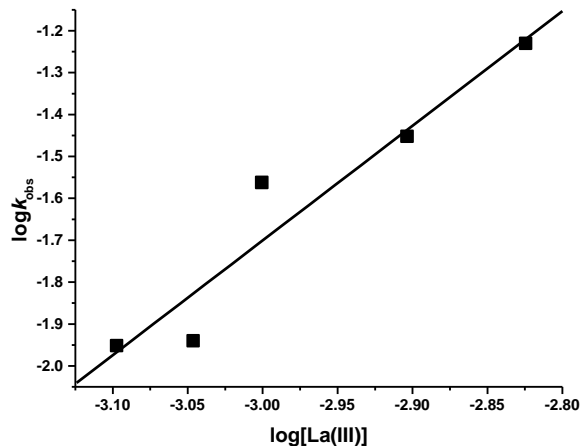


Fig. 42 Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs log de la concentración de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$, en la relación $[\text{La}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

De la pendiente de la (Fig. 42) se obtiene el orden de reacción con respecto al metal que en el caso $\text{La}(\text{III})$ fue de 2.5 ± 0.4 , lo cual refleja la existencia de especies polinucleares, también se determinaron los órdenes de reacción para los cationes $\text{Nd}(\text{III})$ y $\text{Eu}(\text{III})$ los cuales fueron 2.3 ± 0.2 (Anexo 1a) y 1 ± 0.05 (Anexo 1b) respectivamente. $\text{La}(\text{III})$ y $\text{Nd}(\text{III})$ presentan un comportamiento cinético muy similar (Fig. 41) y el orden de reacción es casi igual en ambos casos, por lo que es probable que especies hidroxiladas y polinucleares del mismo tipo sean las responsables de la alta actividad catalítica. El catión $\text{Eu}(\text{III})$ presenta un perfil cinético diferente y el orden de reacción encontrado es menor.

Se encontró un efecto inhibitorio en la velocidad de hidrólisis de BNPP al adicionar sales neutras para fijar la fuerza iónica (Tabla 11). La k_{obs} disminuye cinco veces por el uso de 10mM de NaClO_4 y disminuye diez veces por el uso de nitratos y cloruros.

Tabla 11. Efecto Salino en la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de La(III) (1mM) y de Me₄NOH (2mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

La(III)	Sal adicionada, mM	k_{obs} , s ⁻¹
La(ClO ₄) ₃	-----	0.058
	1mM NaClO ₄	0.027
	5mM NaClO ₄	0.018
	10mM NaClO ₄	0.012
	10mM NaNO ₃	0.005
	10mM NaCl	0.004
La(CF ₃ SO ₃) ₃	-----	0.037

La velocidad de hidrólisis en este medio es sensible incluso al tipo de contraión empleado: la k_{obs} disminuye un poco al utilizar una sal de La(CF₃SO₃)₃ (Tabla 11) en vez de percloratos. Este efecto inhibitorio se puede explicar en términos de la formación de pares iónicos, los cuáles pueden bloquear la interacción de los cationes con el sustrato aniónico y cambiar el tipo de especies presentes en disolución. [43,48] Incluso el uso de amortiguadores para fijar el pH disminuyen la velocidad de hidrólisis de BNPP. En la Fig. 43 se muestra la dependencia de la k_{obs} con respecto a la variación en la concentración de Tris como base libre, en presencia de Eu(ClO₄)₃ en concentración de 1mM en DMSO al 80% v/v a 25 °C. La gráfica muestra el mismo tipo de perfil que al utilizar Me₄NOH como base, es decir pasa por un máximo pero la velocidad es cinco veces menor en comparación con la obtenida sin el uso de amortiguadores o sales para mantener constante la fuerza iónica.

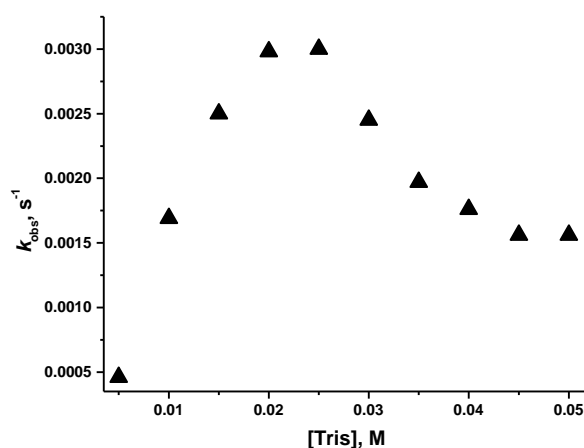


Fig. 43 Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs la concentración de [Tris], en presencia de Eu(ClO₄)₃ (1mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

5.3. Hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de triflatos de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v

A pesar de que la velocidad de hidrólisis no mejoró por el uso de las sales de triflatos de lantánidos en el medio DMSO al 80% v/v (Tabla 11), se decidió estudiar el perfil de k_{obs} en función de la concentración de $[OH^-]$ en presencia de $Ln(CF_3SO_3)_3$ en concentración de 1mM (Fig. 44).

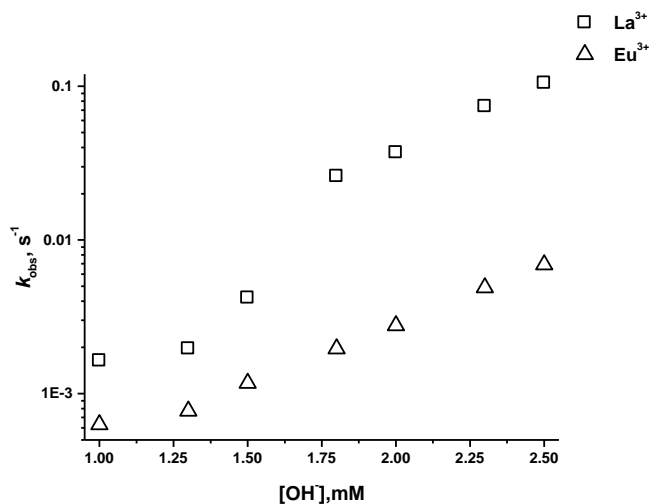


Fig. 44 Constantes de velocidad observada k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs la concentración de $[OH^-]$, en presencia de $Ln(CF_3SO_3)_3$ (1mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C (coordenadas semilogarítmicas).

En la figura 44 se muestra el perfil obtenido con el uso de triflatos de lantánidos, el ión La(III) presenta mayor actividad que el ión Eu(III) pero el perfil cinético de ambos cationes es muy similar ya que no pasa por un máximo. La velocidad de reacción se va incrementando conforme aumenta la concentración de hidróxido, el orden de reacción con respecto a hidróxido varía de 2.5 ± 0.2 para el ión Eu(III) hasta 5 ± 0.5 para La(III). Nuevamente, este orden de reacción nos da idea de que diferentes especies hidroxiladas están presentes en disolución. El orden de reacción con respecto a metal para el caso de Eu(III) (Fig. 45) fue de 1.9 ± 0.2 , lo que indica una contribución mayor a uno de las especies activas, probablemente es el reflejo de especies polinucleares como activas.

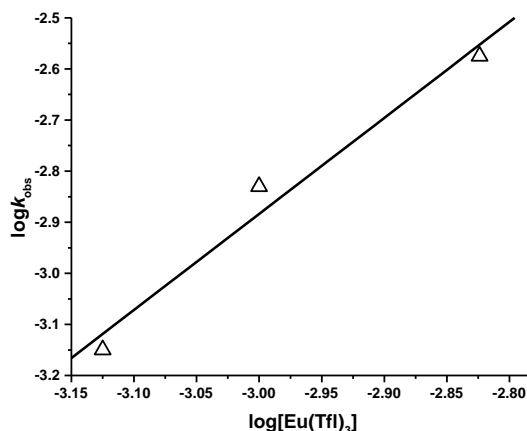


Fig. 45 Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs log de la concentración de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$, en la relación $[\text{Eu}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Se estudió el efecto en la velocidad de hidrólisis de BNPP por la adición de la sal triflato de sodio (Tabla 12). Se adicionó hasta una concentración de 10mM de $\text{Na}(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ sin encontrarse un efecto inhibitorio en la velocidad, al contrario de lo hallado para los percloratos de lantánidos, lo que hace al sistema menos sensible a las sales adicionadas y probablemente a amortiguadores, pero lamentablemente la velocidad no es mayor a la encontrada para los percloratos en las mismas condiciones.

Tabla 12. Efecto Salino en la velocidad de hidrólisis de BNPP en presencia de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) y de Me_4NOH (2mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

$[\text{Na}(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$, mM	k_{obs} , s^{-1}
0	0.0033
2.5	0.0035
5	0.0038
7.5	0.0035
10	0.0033

5.4. Transesterificación de HPNPP por hidroxocomplejos de lantánidos trivalentes en DMSO al 80% v/v

Se realizó el estudio de la transesterificación alcalina de HPNPP, la molécula modelo de ARN, la cual presenta un nucleófilo intramolecular en su estructura (Fig. 34). La constante de segundo orden encontrada $0.34 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el medio de estudio DMSO al 80% v/v sin metal fue tan sólo 3.5 veces mayor que la informada en agua $0.12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. También se obtuvieron los perfiles de k_{obs} al variar la concentración de $[\text{Me}_4\text{NOH}]$ para los percloratos de lantánidos y el triflato de europio (Fig. 46).

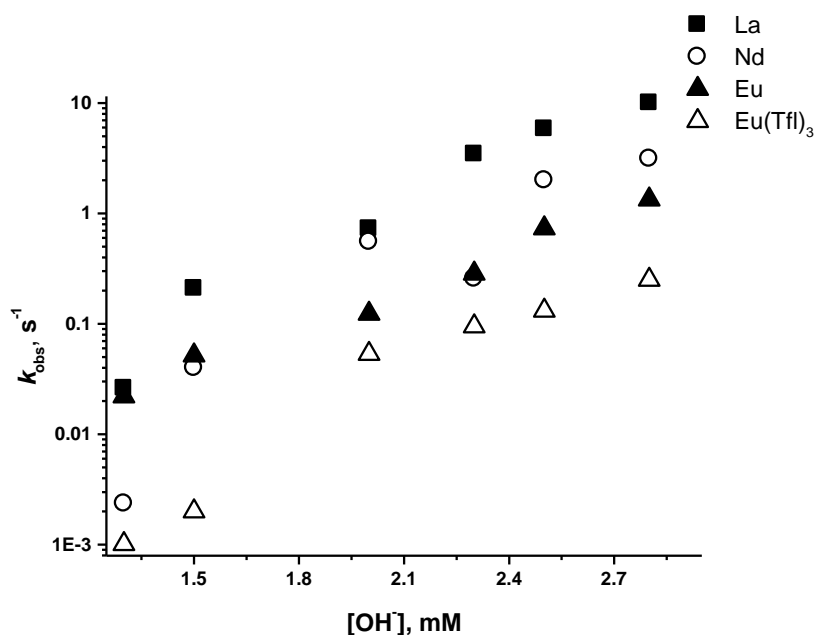


Fig. 46 Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs la concentración de $[\text{OH}^-]$, en presencia de $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ (1mM) y de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C (coordenadas semilogarítmicas).

El perfil cinético obtenido con los tres cationes y el triflato de europio es muy similar ya que no pasa por un máximo (Fig. 46) y la k_{obs} se incrementa al aumentar la concentración de hidróxido. La mayor aceleración la provee el catión La(III), y la actividad catalítica observada por el $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ es mayor a la informada en agua, pero dos veces menor que en el caso del perclorato de europio. El orden de reacción con respecto a hidróxido es mucho mayor que el

encontrado con el sustrato BNPP en los todos los casos y al graficar el log de la constante de velocidad observada en función del log de la concentración de metal para La(III) el orden es de 4.2 ± 0.2 (Fig. 47), para Nd(III) 3.4 ± 0.2 (Anexo 1d), en el caso de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ 2.6 ± 0.3 (Anexo 1e) y 3.1 ± 0.2 para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (Anexo 1f). Para este sustrato el orden es mayor que el encontrado para BNPP lo que probablemente refleje una contribución mayor de las especies activas a la velocidad de hidrólisis de HPNPP ó un cambio en el mecanismo de reacción implicado.

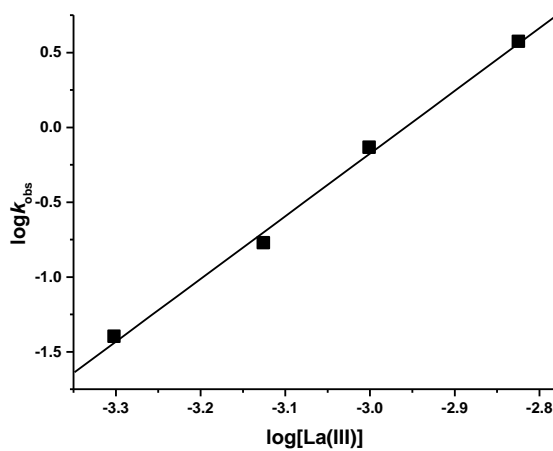


Fig. 47 Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs log de la concentración de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$, en la relación $[\text{La}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

5.5. Transesterificación de HPNPP por el catión Zn(II) en mezclas de disolventes dipolares apróticos

Se estudió el efecto de cambiar a los cationes de lantánidos trivalentes por uno de acidez parecida (Tabla 1) pero biológicamente relevante el $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$, el cual en concentración de 1mM no presento actividad catalítica notable ante la transesterificación alcalina de HPNPP en el medio estudiado anteriormente y sin ligantes estabilizadores, por lo que se probó estabilizarlo con el aminoácido glicina en concentración de 1mM y Me_4NOH también en concentración de 1mM para neutralizar a la glicina. Se obtuvo una k_{obs} de $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, dicha constante es baja, dado que el sustrato es un diéster activado. Esto se puede deber a que al coordinarse el grupo carboxilato del aminoácido al Zn(II), el catión pierde parte de su electrofilia, por ello se recurrió al uso de dietilentriamina en concentración de 1mM y se encontró una k_{obs} de $5.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. La k_{obs} es un

orden de magnitud mayor, lo cual refleja que el ligante tridentado neutro ayuda a mejorar la velocidad y estabilidad, pero esta constante de velocidad encontrada es modesta, razón por la cual se decidió cambiar de codisolvente orgánico en las mezclas con agua. Al utilizar DMF en la misma proporción DMF al 80% v/v a 25 °C en presencia de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ en concentración de 1mM y como ligante la dietilentriamina a la misma concentración que el metal, la k_{obs} obtenida fue de $2.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, este valor corresponde a la mitad del observado en el caso de DMSO, pero al cambiar de disolvente a MeCN al 80% v/v, la k_{obs} fue de $1.31 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Dado este último resultado se decidió utilizar MeCN como codisolvente y se realizó el estudio de la k_{obs} en función del porcentaje de MeCN v/v a 25 °C utilizando $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ y dietilentriamina ambos en concentración de 1mM (Fig. 48).

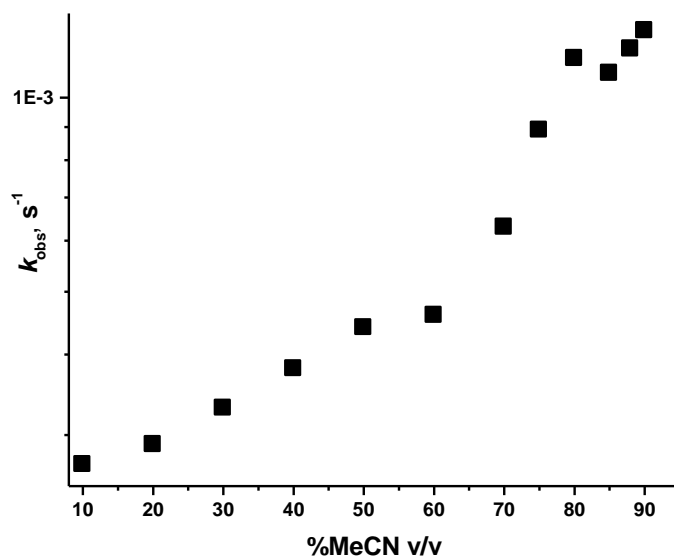


Fig. 48 Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs el porcentaje de MeCN, en presencia de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ (1mM) y dietilentriamina (1mM) a 25 °C (coordenadas semilogarítmicas).

En la Fig. 48 se observa el aumento de la k_{obs} al incrementar el porcentaje del codisolvente orgánico MeCN sin pasar por un máximo, esto se debe probablemente a que a mayor concentración de MeCN en el medio, éste desplaza a las moléculas de agua de la esfera de coordinación del Zn(II) permitiendo mayores interacciones entre el catalizador y el sustrato por la disminución en la constante dieléctrica del medio, lo que da como resultado que la velocidad

aumente. La velocidad encontrada es modesta pero aun así sobrepasa a algunos sistemas reportados en agua con ligantes estabilizadores. [60]

5.5.1. Transesterificación de HPNPP por Zn(II) y diversos cationes en acetonitrilo

Dado que en el estudio anterior en medio básico con el catión Zn(II) se encontró actividad modesta y que el sustrato HPNPP posee su propio nucleófilo, se decidió realizar una serie de estudios pero esta vez en ausencia de hidróxido o de aminas, en este caso el mecanismo es diferente ya que la acidez del metal asiste la partida del grupo saliente. En un estudio realizado por Hong y Suh, en el 2000, encontraron como varía la k_{obs} al cambiar la concentración de MeCN en las mezclas con agua en presencia de HClO₄ como catalizador. La velocidad fue de 2 ó 3 órdenes de magnitud mayor al pasar de agua a la mezcla con MeCN y encontraron que en este medio la naturaleza del ácido afecta la velocidad. Es decir la reacción con HClO₄ procede de 3 a 4 veces más rápido que en presencia de HCl. Esto se debe a que en disolventes orgánicos los ácidos no se encuentran totalmente ionizados y al ser el HClO₄ un ácido más fuerte esta diferencia en la acidez se ve reflejada en la constante de velocidad. [75] Por analogía en medio ácido, realizamos el estudio en presencia de Zn(II) en concentración de 1mM y medimos la dependencia de la k_{obs} con respecto al porcentaje de agua en la mezcla con MeCN sin ligantes estabilizadores.

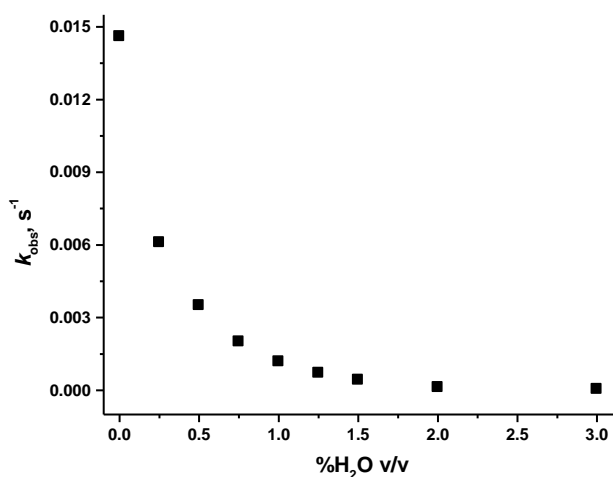


Fig. 49 Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs el porcentaje de MeCN, en presencia de Zn(ClO₄)₂ (1mM) a 25 °C.

En la Fig. 49 podemos observar cómo afecta a la velocidad de hidrólisis la adición de agua al MeCN a 25 °C, es decir en puro disolvente orgánico la velocidad es 6 veces mayor que al agregar tan solo 0.25% de H₂O, la dependencia es muy fuerte y las constantes de velocidad obtenidas son grandes hasta 1.5% de H₂O. Este comportamiento se puede correlacionar con la preferencia del Zn(II) a estar solvatado por moléculas de MeCN lo cual sólo sucede a porcentajes menores de 2.6% de H₂O. [76] Donde las moléculas de codisolvente orgánico sustituyen a las de agua, aboliendo la competencia del protón proveniente del agua por el fosfodiéster. Al aumentar el porcentaje de MeCN observamos como la interacción del Zn(II) con el diéster de fosfato se vuelve muy eficaz debido a la ausencia de agua en la esfera de coordinación del catión zinc, lo que trae como consecuencia el drástico aumento en las constantes de velocidad.

Dado que encontramos una aceleración en la velocidad de hidrólisis por Zn(II) en MeCN y buscando nuevos sistemas que catalicen la ruptura de HPNPP probamos diferentes cationes de metales. Como se muestra en la Tabla 13 no son mejores catalizadores los cationes más ácidos como era de esperarse para un mecanismo en el que el catión asiste la partida del grupo saliente al estabilizar el estado de transición por una mayor atracción del oxígeno por ácido de Lewis. Podemos atribuir las diferencias en la reactividad observadas a la geometría que presentan los centros metálicos, es decir los números de coordinación altos 8 ó 9 que presentan La³⁺ y Mg²⁺ no favorecen el estado de transición para la hidrólisis ácida de HPNPP mientras que cationes con números de coordinación 4 ó 5 como Zn²⁺ y Cu²⁺ si lo hacen. Otra posible explicación a este comportamiento es que los cationes de transición como Zn²⁺ y Cu²⁺ se asocien más fuertemente al fosfodiéster en este medio. [77]

Tabla 13. Constantes de velocidad observadas para la transesterificación de HPNPP por cationes metálicos en MeCN a 25 °C.

Metal	<i>k</i>_{obs}, s⁻¹
La ³⁺	3.35 x 10 ⁻³
Mg ²⁺	3.18 x 10 ⁻³
Cu ²⁺	1.55 x 10 ⁻²
Zn ²⁺	1.8 x 10 ⁻²
Ni ²⁺	0

5.6. Estimación de las constantes de asociación de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ y difenilfosfato

Para tener una idea de la fuerza de la asociación entre el diéster de fosfato y el ion metálico $\text{La}(\text{III})$ en el medio de trabajo DMSO al 80% v/v y compararlo con agua, se realizaron titulaciones por RMN de ^{31}P . En este experimento se utilizaron concentraciones de 2mM de diéster no activado difenilfosfato (Fig. 35). Al adicionar diferentes concentraciones de $\text{La}(\text{III})$ este induce corrimiento de las señales de RMN de ^{31}P del difenilfosfato a valores de desplazamiento químico (δ) más negativos, este comportamiento ha sido observado para diferentes fosfodiésteres, así como para difenilfosfato en metanol. [51] La Fig. 50 muestra el cambio en los valores de δ como función de la concentración de $\text{La}(\text{III})$ en DMSO al 80% v/v y en D_2O a 25 °C.

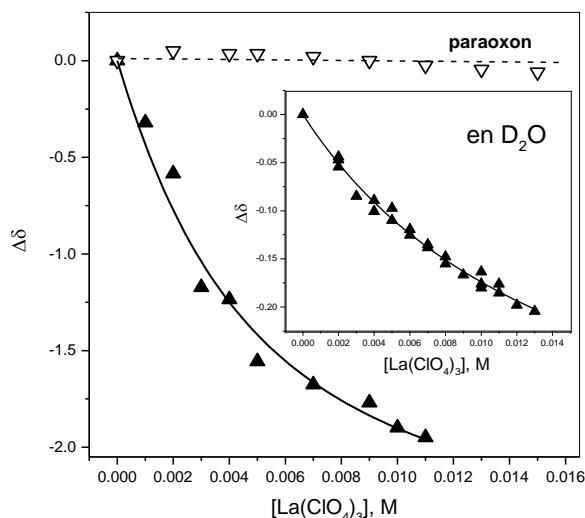


Fig. 50 Titulación por RMN de ^{31}P de difenilfosfato y paraoxon en $\text{DMSO-}d_6$ al 80%, D_2O al 20% y D_2O puro a 25 °C, líneas continuas son el ajuste a la ecuación 4.4.

Las constante de asociación (K) encontrada en D_2O es de $K = 65 \pm 8 \text{ M}^{-1}$ y para el caso de DMSO al 80% la $K = 170 \pm 40 \text{ M}^{-1}$, lo cual comprueba que el fosfodiéster se asocia más fuertemente en el medio de estudio que en agua. Sin embargo el efecto es menor a un orden de magnitud, lo cual se atribuye a que en las mezclas DMSO- agua a partir de 50% en mol, el catión está preferentemente solvatado por DMSO, [71] lo que favorece la interacción entre el catalizador que es un catión y el sustrato aniónico por una menor constante dieléctrica del medio.

[14] En orden con estas interpretaciones la mezcla de DMSO con el agua no incrementa la asociación del catalizador La(III) con el triéster de fosfato paraoxón el cual es neutro (Fig. 50).

5.7. Caracterización de las especies presentes en disolución

5.7.1. Titulaciones potenciométricas de $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ en DMSO al 80% v/v

La especiación de los hidroxocomplejos se determinó por titulaciones potenciométricas, el volumen de DMSO empleado 80% en las mezclas con agua se considera como la máxima cantidad de codisolvente orgánico en el cual las lecturas de pH son confiables. El $\text{p}K_w$ encontrado coincide con el informado para este medio 18.5 ± 0.1 . [69] Las típicas curvas de titulación para los iones de lantánidos en concentración de 1mM se muestran en la Fig. 51. Para los cationes más pequeños y ácidos como Eu(III) y Nd(III), la titulación con Me_4NOH (a) fue posible hasta la relación ion metálico: hidróxido = 1:3, pero en el caso de La(III) el cual se titula a un valor de pH mayor, sólo fue posible llegar hasta la relación 1:2.5, después de este valor él $\text{La}(\text{OH})_3$ comienza a precipitar.

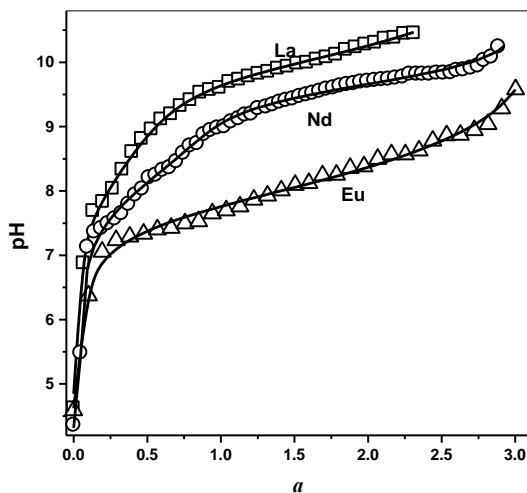
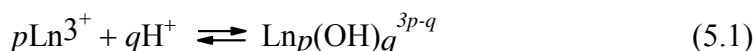


Fig. 51 Curvas de titulación potenciométrica para $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM con Me_4NOH en concentración de 0.1M en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas continuas son el ajuste generado por HYPERQUAD en acuerdo con las constantes de equilibrio de la Tabla 14.

Se realizaron al menos tres titulaciones independientes con cada catión metálico en el medio de trabajo los ajustes se muestran en los Anexos 2a-d. Los resultados de las titulaciones para la formación de hidroxocomplejos se ajustaron con la ecuación 5.1, y el mejor ajuste se

obtuvo para un modelo de reacción que incluye la formación sucesiva de especies mononucleares $\text{Ln}(\text{OH})_n^{3-n}$, en donde n va de 1 a 3 y un complejo binuclear con composición $\text{Ln}_2(\text{OH})^{5+}$. Si ajustamos a un modelo que sólo incluye especies binucleares del tipo $\text{Ln}_2(\text{OH})_n^{6-n}$ los resultados estadísticos son peores, sin embargo no se puede discriminar entre un modelo ó el otro sólo por el criterio estadístico, dado que el sistema contiene tres o más especies que se superponen en el diagrama de distribución y por consiguiente no se pueden excluir especies con diferentes nuclearidades.



Dado que se encontró un fuerte efecto inhibitorio por parte de NaClO_4 en la velocidad de hidrólisis de BNPP (Tabla 11), se realizaron dos series de titulaciones: una fijando la fuerza iónica con 10mM de NaClO_4 y la otra sin electrolito soporte como en los experimentos cinéticos. Las constantes de hidrólisis respectivas definidas como en la ecuación 5.2 se aprecian en la Tabla 14.

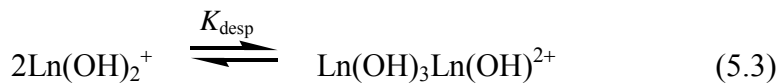
$$\beta_{pq} = [\text{Ln}_p(\text{OH})_q]^{3p-q} / [\text{Ln}^{3+}]^p [\text{H}^+]^q \quad (5.2)$$

Tabla 14 Constantes de hidrólisis para $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ en DMSO al 80% v/v a 25°C.

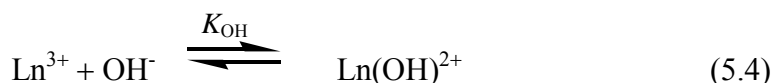
Especies	Log β_{pq}						H₂O		
	[NaClO₄] = 0			NaClO₄ = [10 mM]			La³⁺	Nd³⁺	Eu³⁺
$\text{Ln}_2(\text{OH})^{5+}$	-5.7 ± 0.2	-5.5 ± 0.1		-5.65 ± 0.09	-4.9 ± 0.1				
$\text{Ln}(\text{OH})^{2+}$	-9.1 ± 0.1	-8.5 ± 0.1	-7.6 ± 0.1	-8.59 ± 0.09	-8.21 ± 0.03	-8.81 ^a	-8.18 ^a	-7.76 ^a	
$\text{Ln}(\text{OH})_2^+$	-19.18 ± 0.09	-17.9 ± 0.3	-15.8 ± 0.2				-16.2 ^b	-14.9 ^c	
$\text{Ln}(\text{OH})_3$	-29.55 ± 0.07	-27.64 ± 0.06	-24.2 ± 0.2	-28.4 ± 0.2	-25.1 ± 0.3		-24.3 ^b	-24.1 ^c	

^a A fuerza iónica $I = 0$ (78). ^b A fuerza iónica $I = 1$ (27) (79). ^c A Fuerza iónica $I = 0$ (80)

El principal efecto al adicionar NaClO_4 es la desaparición de la especie $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ (Tabla 14), en apariencia por el desplazamiento en el equilibrio de desproporción (K_{desp}) a través de la mezcla de los complejos mono y trihidroxo como se ilustra en la ecuación 5.3.



La constante de equilibrio K_{desp} se puede estimar de los valores de β_{pq} dados en la Tabla 14 como $K_{\text{desp}} = \beta_{13}\beta_{11}/(\beta_{12})^2 = 0.5$ para La(III) y 4 para Eu(III) en ausencia de perclorato de sodio, bajo estas condiciones la fracción de $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ llega a un máximo de 30 - 40% de la concentración total del metal. Si por ejemplo incrementáramos la K_{disp} por 1 orden de magnitud como resultado obtendríamos pares iónicos más fuertes de las especies dicatiónicas con los percloratos que las especies monocatiónicas, lo cual reduciría la fracción de hidroxocomplejos alrededor del 3 al 4% de la concentración total de metal, por lo que pasarían inadvertidas en la titulación por potenciometría. Por comparación se muestran los valores de las β_{pq} en agua que son muy cercanas a las encontradas en DMSO al 80%. De otro modo, si consideramos la formación de los hidroxocomplejos como un proceso asociativo, reacción 5.4, se observa una diferencia muy fuerte entre el valor de las constantes de formación en agua y en DMSO al 80%. Las constantes K_{OH} se relacionan con β_{11} en acuerdo con la ecuación 5.5 en donde K_w es la constante de autoprotólisis.



$$\log K_{\text{OH}} = \text{p}K_w - \text{p}K_a = \text{p}K_w + \log \beta_{11} \quad (5.5)$$

Si el $\text{p}K_w$ en agua se incrementa de un valor de 14 a un valor de 18.5 en DMSO al 80% pero el valor de β_{11} permanece casi constante (Tabla 14), esto significa que el $\log K_{\text{OH}}$ aumenta en 4.5 unidades al pasar de agua a la mezcla de disolventes. Entonces si en agua los valores de $\log K_{\text{OH}}$ están entre 5.2 y 6.2, en DMSO al 80% se encuentran entre 9.7 y 10.7, por ello el medio permite la formación de hidroxocomplejos en proporción significativa aun en soluciones neutras. Ya que el valor del pH de neutralidad que encontramos en DMSO al 80% es de 9.25. Este efecto se puede atribuir al bien conocido fenómeno de desestabilización de aniones en disolventes dipolares apróticos. [81] El mismo que es responsable del incremento en la reactividad de los nucleófilos aniónicos. [82]

La hidrólisis de los cationes de lantánidos en agua está dominada por la formación de especies polinucleares de composición desconocida y los hidróxidos precipitan en soluciones milimolares de metal a pH muy cercano a 8. En contraste, la hidrólisis en DMSO al 80% v/v es un proceso más simple dominado por la formación de complejos mononucleares. La razón de esto es la fuerte solvatación de los cationes por el DMSO más que por el agua, lo que se ve reflejado en los grandes valores de energías libres de transferencia de los cationes al pasar de agua a DMSO. [53] Y la preferencia en solvatación de los lantánidos por el DMSO en las mezclas con agua. [71] En apariencia este fuerte efecto de solvatación induce la despolimerización de las especies polinucleares. Al mismo tiempo los valores de las energías libres de transferencia de aniones de agua a DMSO son grandes pero positivas. [81] Por lo que los aniones se encuentran débilmente solvatados por DMSO, y esto ayuda a que dichos aniones puedan competir con el DMSO por la esfera de coordinación del metal, formando complejos de mayor estabilidad que en agua.

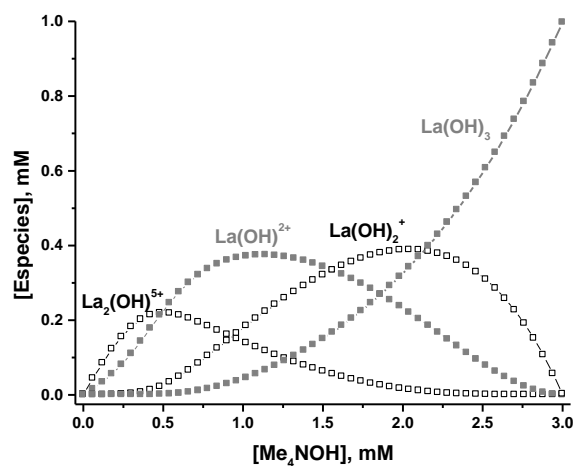


Fig. 52 Diagrama de distribución de especies para $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM, derivadas de la titulación potenciométrica en acuerdo con las constantes de equilibrio de la Tabla 14 en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

5.7.2. Titulaciones de $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ por espectroscopia Uv- visible

Se trató de corroborar el esquema de especiación obtenido por potenciometría (Fig. 52), mediante titulaciones conductimétricas y la técnica de espectrometría de masas FAB en su modo positivo, pero ambos experimentos arrojan resultados con los cuales no se puede ajustar a ningún modelo y por lo tanto concluir. Se encontró mayor información sobre el sistema en estudio al hacer la titulación de Nd(III) por Ultravioleta-visible ya que este catión posee una banda de absorción en la zona hipersensible de 570nm a 595nm debida a la transiciones 4f-4f en particular: de $^4I_{9/2} \rightarrow ^2H_{9/2}$ y $^4F_{5/2}$. Dicha zona presenta algunos cambios cuando se coordina el ión metálico con diferentes átomos donadores. [83]

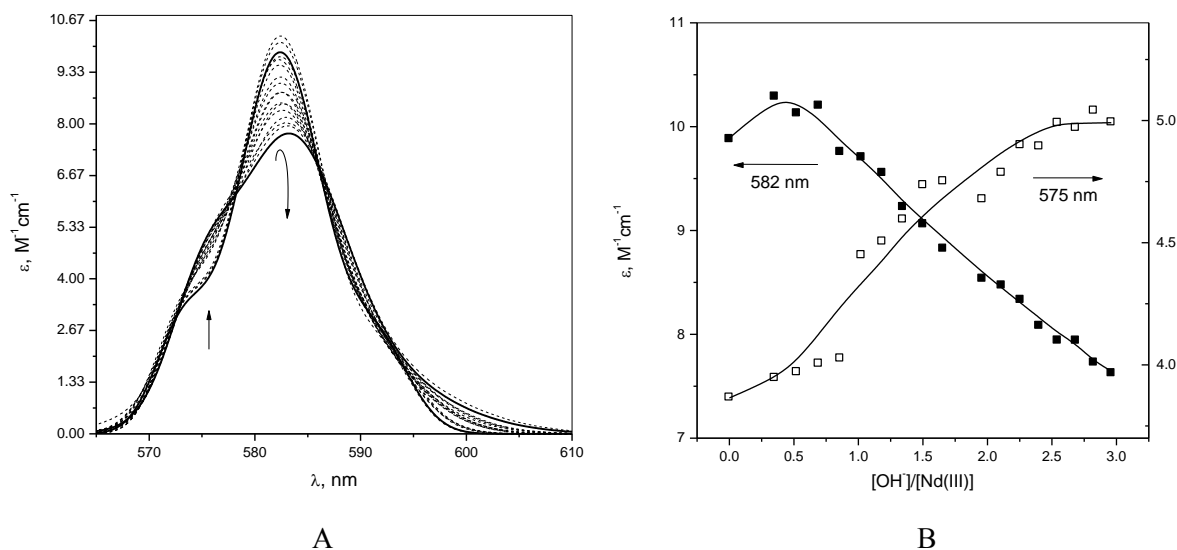


Fig. 53 A) Espectros de absorción para perclorato de Nd(III) en concentración de 1.5mM en la región hipersensible en función del incremento de Me_4NOH en DMSO al 80% a 25 °C. Las flechas señalan la dirección en la que se dan los cambios espectrales al aumentar la concentración de hidróxido. Líneas continuas son el espectro inicial y final. B) Gráfica de la absorbancia molar en 582nm (cuadrados, escala de la izquierda) y en 575nm (cuadrados abiertos, escala derecha) vs. la relación molar de hidróxido añadido entre el ión metálico. Líneas continuas muestran los perfiles calculados con las constantes de hidrólisis obtenidas por potenciometría.

La Fig. 53A muestra los cambios espectrales en la región hipersensible al titular Nd(III), la absorbancia en el máximo 582nm inicialmente se incrementa, pero después disminuye monótonicamente. El máximo en absorbancia corresponde a la relación molar $[\text{OH}^-]/[\text{Nd(III)}] = 1:2$, esta observación es indicativa de la formación del $\text{Nd}_2(\text{OH})^{5+}$. Un cambio opuesto y más

pequeño en la absorbancia se observa en 575nm en donde se observa una inflexión en la relación molar 0.5 (Fig. 53B) atribuido a la formación de la especie $\text{Nd}_2(\text{OH})^{5+}$, ambos perfiles están en acuerdo con el esquema de especiación derivado de las titulaciones potenciométricas. Las líneas continuas en la Fig. 53B son los perfiles teóricos calculados al hacer la suma de las contribuciones de las especies $\text{Nd}_p(\text{OH})_q^{3p-q}$ a la absorbancia molar observada $\epsilon_{\text{obs}} = \sum \epsilon_i f_i$ donde f_i son las fracciones molares de los hidroxocomplejos calculadas con las constantes de hidrólisis de la tabla y ϵ_i son los coeficientes de absorptividad molar, las absorptividades molares de las especies $\text{Nd}(\text{III})$ y $\text{Nd}(\text{OH})_3$ se tomaron de los espectros inicial y final respectivamente, y las absorptividades molares de los hidróxidos intermedios se estimaron por regresión múltiple de la absorptividad molar medida (ϵ_{obs}).

En solución acuosa la sustitución moléculas de agua coordinadas por otros átomos donadores usualmente conducen al incremento en la fuerza del oscilador (f) de la banda hipersensible, calculada por la integración de la banda de absorción. [83] Este efecto no se observa en DMSO al 80%, donde los hidróxidos sustituyen a las moléculas de DMSO coordinadas, los cambios espectrales que se muestran en la Fig. 53A están acompañados de cambios muy pequeños e irregulares en f alrededor del 5%.

5.8. Correlación de las constantes de velocidad observadas y las especies responsables de la actividad catalítica encontradas por potencimetría y Uv-vis para los $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$

5.8.1. Sustrato modelo de ADN: el BNPP

La Fig. 54 muestra la dependencia de la constante de velocidad observada de primer orden para la hidrólisis de BNPP a concentración variable de Me_4NOH en presencia de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración 1mM sobrepuesto con el diagrama de distribución de especies.

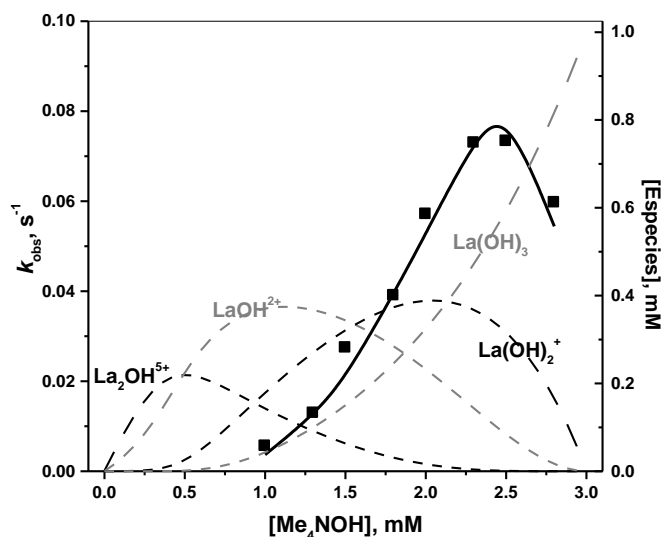


Fig. 54 Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP por $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ (1 mM) a concentración variable de Me_4NOH añadido en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Líneas punteadas muestran las especies y su concentración se lee en el eje derecho. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.6.

Una inspección del perfil cinético en la Fig. 54 muestra que éste no sigue a ningún hidroxocomplejo en particular. Y dado que la mayor actividad se observa para concentraciones mayores a 1mM de hidróxido añadido las especies $\text{La}_2(\text{OH})^{5+}$ y $\text{La}(\text{OH})^{2+}$ no contribuyen a la reactividad, por lo cual podemos pensar que la hidrólisis de BNPP se puede atribuir a la combinación de las especies $\text{La}(\text{OH})_2^+$ y $\text{La}(\text{OH})_3$. Los cálculos de la distribución de especies muestran que aunque $\text{La}(\text{OH})^{2+}$, $\text{La}(\text{OH})_2^+$ y $\text{La}(\text{OH})_3$ coexisten bajo estas condiciones contribuyen 24%, 39% y 32% respectivamente del $\text{La}(\text{III})$ total, sus abundancias relativas permanecen casi constantes cuando se varía la concentración total de metal, por lo cual la concentración de cada especie es una función lineal de la concentración total, por ende la pendiente de la Fig. 45 es el orden de reacción de las especies activas que en este caso es de 2.5 ± 0.4 , combinando ambos experimentos podemos concluir que la ley de velocidad es el producto de la concentración de $\text{La}(\text{OH})_2^+$ y $\text{La}(\text{OH})_3$ descrito en la forma de la ecuación 5.6, esto explica por qué se observa un máximo en la Fig. 54 y además es consistente con la cinética de segundo orden encontrada para $\text{La}(\text{III})$.

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{La}(\text{OH})_2] [\text{La}(\text{OH})_3] \quad (5.6)$$

Para BNPP se observa una correlación lineal satisfactoria entre k_{obs} y el producto $[\text{La}(\text{OH})_2^+] [\text{La}(\text{OH})_3]$ con una pendiente $(4.3 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ con una de $r^2 = 0.99$ (Fig. 55).

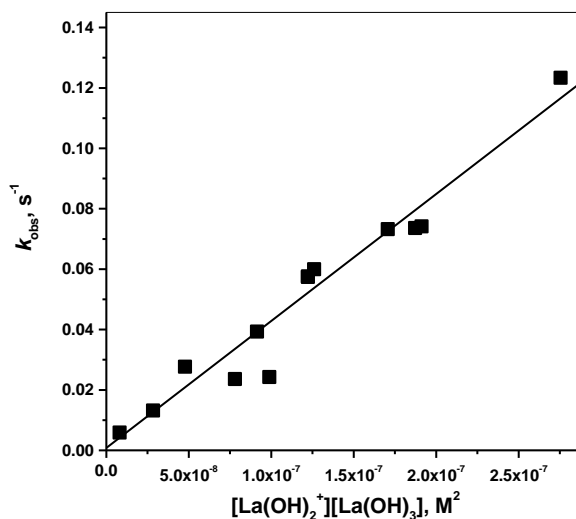


Fig. 55 Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP por $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C como función de las concentraciones calculadas de $\text{La}(\text{OH})_2^+$ y $\text{La}(\text{OH})_3$ en acuerdo con la ecuación 5.6. La pendiente es igual a k_3 .

Con el catión Nd(III) se observa una cinética similar, es decir la velocidad pasa por un máximo con un orden de reacción de 2.3 ± 0.2 (Anexo 1a). El análisis de las dependencias de la k_{obs} con respecto a la concentración de base y a la variación total del metal confirman la validez de la ecuación 5.6 para el Nd(III). La pendiente de la gráfica 56B es $(6.3 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$.

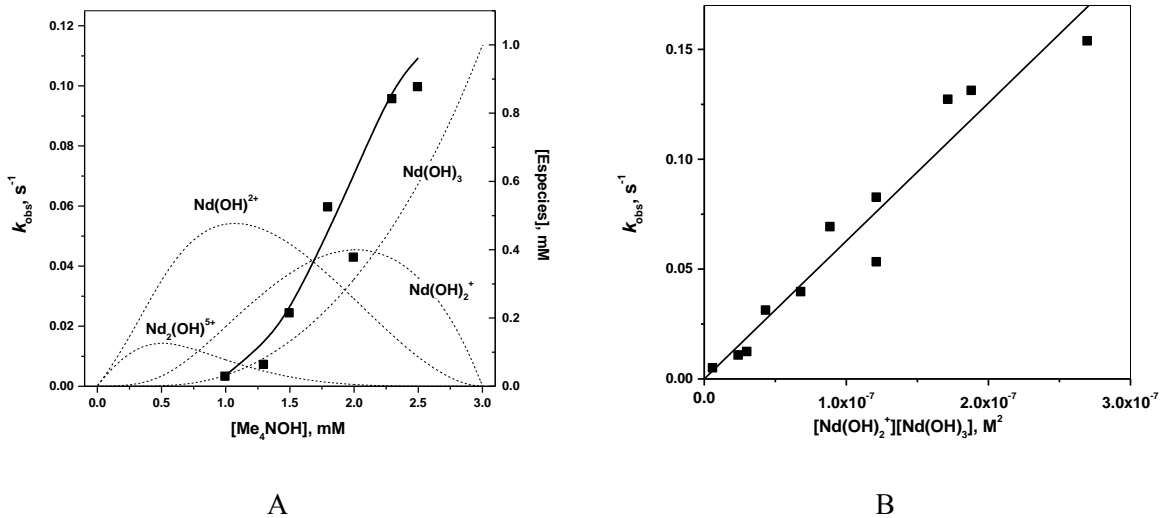


Fig. 56 A) Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP por $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ (1mM) a concentración variable de Me_4NOH en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas punteadas muestran las especies y su concentración se lee en el eje derecho. B) Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP por $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ como función de las concentraciones calculadas de $\text{Nd}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Nd}(\text{OH})_3$. Línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.6, la pendiente es igual a k_3 .

El comportamiento de $\text{Eu}(\text{III})$ como catalizador es similar al de los lantánidos anteriores pero el orden cinético encontrado es menor 1 ± 0.05 (Anexo 1b). Al analizar las dependencias tanto en hidróxido como en metal, los valores de k_{obs} muestran una correlación un poco dispersa pero aceptable con la especie $[\text{Eu}(\text{OH})_2^+]$ (Anexo 1c), una mejor correlación se obtiene al adicionar un término que es proporcional al producto de $[\text{Eu}(\text{OH})_2^+][\text{Eu}(\text{OH})_3]$ (Fig. 57), por lo cual la ecuación 5.7 es la forma final de la expresión para la ley de velocidad.

$$k_{\text{obs}} = k_2[\text{Eu}(\text{OH})_2] + k_3[\text{Eu}(\text{OH})_2][\text{Eu}(\text{OH})_3] \quad (5.7)$$

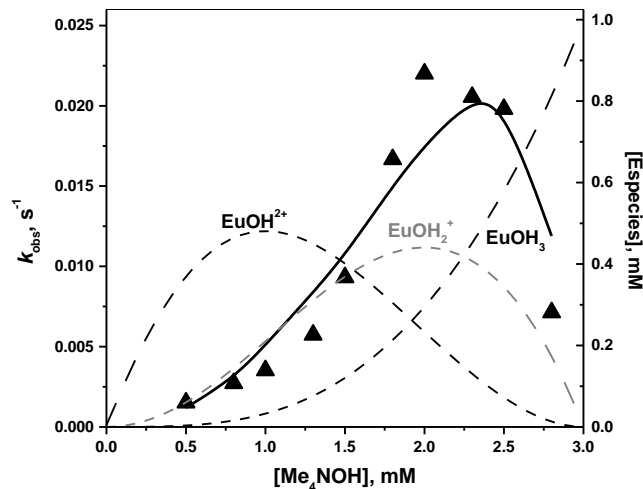


Fig. 57 Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP por $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ (1 mM) a concentración variable de Me_4NOH añadido en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas punteadas muestran las especies y su concentración se lee en el eje derecho. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.7.

5.8.2. *Sustrato modelo de ARN: el HPNPP*

En la Fig. 58 se muestra el perfil de la constante de velocidad observada de primer orden para la hidrólisis de HPNPP en presencia de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1 mM con respecto a la variación en la concentración de Me_4NOH sobrepuesto con el diagrama de distribución de especies. El perfil cinético sigue a la especie $\text{La}(\text{OH})_3$. El orden de reacción encontrado con respecto a la concentración total de $\text{La}(\text{III})$ fue de (4.2 ± 0.2) (Fig. 47) mayor que el encontrado con el sustrato anterior. La k_{obs} correlaciona con concentración de la especie $[\text{La}(\text{OH})_3]$ elevada al cubo y toma la forma de la ecuación (5.8) (Fig. 58A). La fig. 58b muestra la cinética de tercer orden con respecto a la concentración de metal con $k_4 = (2.5 \pm 0.6) \times 10^{10} \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

$$k_{\text{obs}} = k_4[\text{La}(\text{OH})_3]^3 \quad (5.8)$$

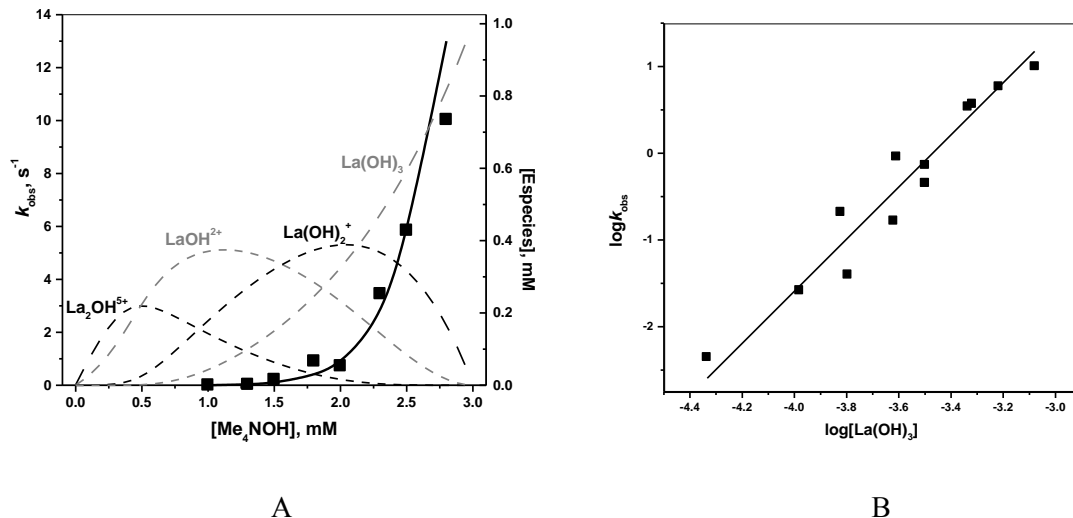


Fig. 58 A) Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP por $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ (1mM) a concentración variable de Me_4NOH en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas punteadas muestran las especies y su concentración se lee en el eje derecho. B) Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de HPNPP por $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ como función de las concentraciones calculadas de $\text{La}(\text{OH})_3$. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.8, la pendiente es igual a k_4 .

Como se mencionó en la sección anterior, Nd(III) presenta los mismos perfiles cinéticos que La(III). En la Fig. 59A se muestra como cambia la constante de velocidad observada de primer orden con respecto a la variación en la concentración de hidróxido para la hidrólisis de HPNPP sobrepuesto con el diagrama de distribución de especies obtenido por potenciometría. La línea negra y continua muestra el ajuste teórico a la ecuación 5.8 y la pendiente de la Fig. 59B es la $k_4 = (5.8 \pm 0.5) \times 10^9 \text{ M}^{-3}\text{s}^{-1}$.

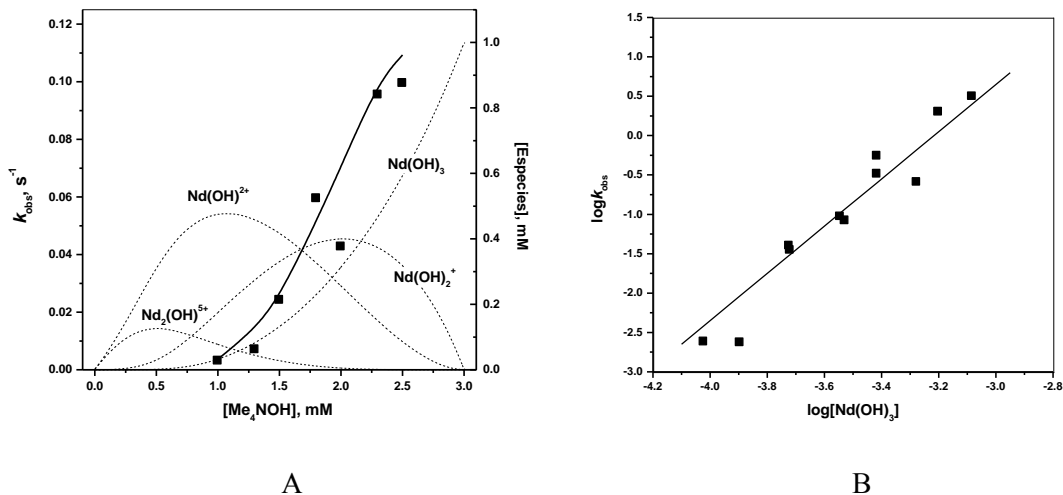


Fig. 59 A) Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP por $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ (1mM) a concentración variable de Me_4NOH en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas punteadas muestran las especies y su concentración se lee en el eje derecho. B) Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de HPNPP por $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ como función de las concentraciones calculadas de $\text{Nd}(\text{OH})_3$. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.8, la pendiente es igual a k_4 .

El perfil cinético obtenido para la variación de la constante de velocidad observada con respecto a la concentración de Me_4NOH en presencia de $\text{Eu}(\text{III})$ (Fig. 60) se parece al de los cationes de lantánidos anteriores sólo que se no se incrementa tan bruscamente; aunado a esto el orden de reacción con respecto al $\text{Eu}(\text{III})$ total es de (2.6 ± 0.3) (Anexo 1e) y al correlacionar la k_{obs} con $[\text{Eu}(\text{OH})_3]^2$ se obtiene la Fig. 60B y la pendiente $k_3 = (1.93 \pm 0.06) \times 10^6 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$. Por lo que la ley de velocidad para $\text{Eu}(\text{III})$ se puede expresar como en la ecuación 5.9.

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{Eu}(\text{OH})_3]^2 \quad (5.9)$$

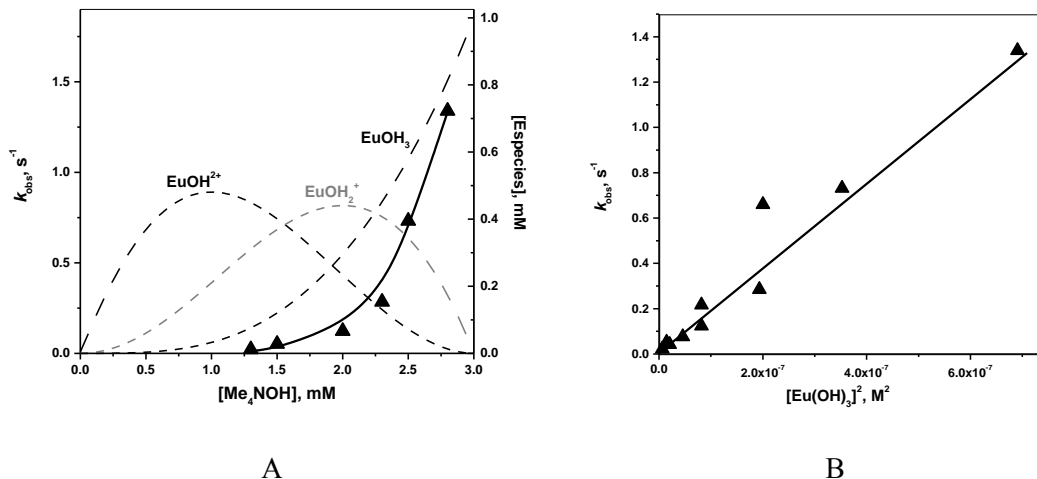


Fig. 60 A) Constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP por $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ (1mM) a concentración variable de Me_4NOH en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas punteadas muestran las especies y su concentración se lee en el eje derecho. B) Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de HPNPP por $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ como función de las concentraciones calculadas de $\text{Eu}(\text{OH})_3$. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación 5.9, la pendiente es igual a k_3 .

Las leyes de velocidad encontradas para la hidrólisis de dos fosfodiésteres y un triéster de fosfato por los tres cationes en presencia de hidróxido de tetrametilamonio se enuncian en la Tabla 15.

Tabla 15 Sumario de las constantes de velocidad para la hidrólisis de ésteres de fosfato por los cationes de lantánidos en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Ester de fosfato	k_{OH}^a $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Ley de velocidad	Constantes de velocidad ^b		
			La^{3+}	Nd^{3+}	Eu^{3+}
BNPP	2×10^{-5}	$k_3[\text{Ln}(\text{OH})_2^+][\text{Ln}(\text{OH})_3]$	$(4.3 \pm 0.1) \times 10^5$	$(6.3 \pm 0.3) \times 10^5$	$(6.5 \pm 0.1) \times 10^4$
		$k_2[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]$			21.2 ± 0.6
HPNPP	0.34	$k_4[\text{Ln}(\text{OH})_3]^3$	$(2.5 \pm 0.6) \times 10^{10}$	$(5.8 \pm 0.5) \times 10^9$	
		$k_3[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]^2$			$(1.93 \pm 0.06) \times 10^6$
Paraoxón	0.19	$k_2[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]$	0.105 ± 0.005		
		$k_2[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]$	0.086 ± 0.005		

^a Constantes de velocidad para la hidrólisis alcalina. ^b k_2 en $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, k_3 en $\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$, k_4 en $\text{M}^{-3} \text{s}^{-1}$.

La velocidad encontrada para la hidrólisis alcalina de dos fosfodiésteres en DMSO al 80% v/v a 25 °C es menor que la encontrada al combinar el hidróxido de tetrametilamonio y a los cationes de lantánidos (Tabla 15). Por ejemplo en presencia de 2mM de Me₄NOH la k_{obs} para BNPP es de $4 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ y la k_{obs} para HPNPP es de $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, la adición La(ClO₄)₃ en concentración de 1mM incrementa la k_{obs} para BNPP a 0.06 s^{-1} (Fig. 54) y la k_{obs} para HPNPP a 1 s^{-1} (Fig. 58), esto es por un factor de 10^6 y 10^3 respectivamente. El "efecto catalítico" se discutirá en la siguiente sección en términos del factor de aceleración sobre la velocidad de hidrólisis en presencia o ausencia de metal al mismo pH.

5.9. Cinética de hidrólisis del triéster de fosfato paraoxón por La(ClO₄)₃ en DMSO al 80% v/v

Observamos en este trabajo que con el triéster paraoxón (Fig. 36) la mezcla de los lantánidos con el hidróxido de tetrametilamonio causa un retraso en la hidrólisis. El efecto inhibitorio del metal se incrementa en la serie de lantánidos al ir de La(III) a Eu(III). La cinética de hidrólisis sólo se estudió en detalle con La(ClO₄)₃. En la Fig. 61 se muestra el diagrama de distribución de especies obtenidos por potenciometría sobrepuesto con la dependencia de la k_{obs} al variar la concentración de La(III) total en presencia de 3mM de Me₄NOH.

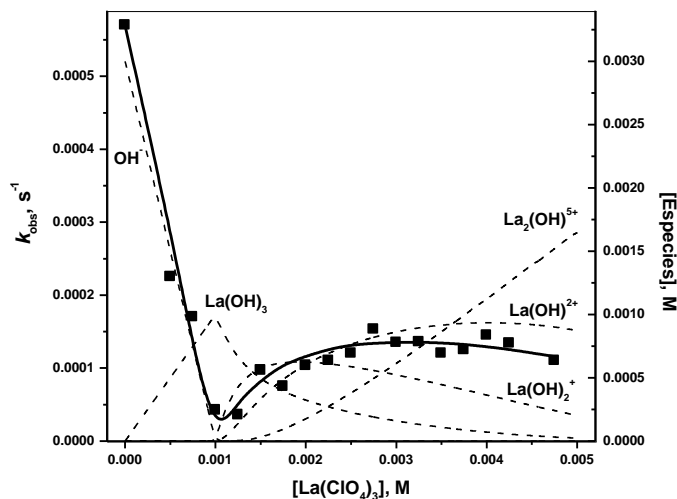


Fig. 61 Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de paraoxón por Me₄NOH (3mM) a concentración variable de La(ClO₄)₃ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las líneas punteadas muestran la distribución de especies cuya concentración se lee en el eje derecho. La línea continua es el perfil teórico para la k_{obs} calculado en acuerdo con la ecuación 5.10.

Al principio la k_{obs} disminuye abruptamente siguiendo el decremento en la concentración de hidróxido libre, pero alrededor de 0.001M de La(III) total la k_{obs} comienza a incrementarse nuevamente siguiendo el diagrama de distribución de la especie $\text{La}(\text{OH})_2^+$ y a la especie $\text{La}(\text{OH})^{2+}$. El resultado se ajustó a la ecuación 5.10 y las constantes de velocidad obtenidas se encuentran en la Tabla 15. Las constantes para ambos hidroxocomplejos con paraoxón son menores que las velocidades para la hidrólisis alcalina en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}}[(\text{OH})]^{-2} + k_2[\text{La}(\text{OH})^{2+}] + k_2'[\text{La}(\text{OH})_2^+] \quad (5.10)$$

5.10. Eficiencia catalítica y mecanismos propuestos para la hidrólisis de BNPP y HPNPP por hidróxidos de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en 80% DMSO v/v

La velocidad observada para la hidrólisis de los fosfodiésteres por los lantánidos en DMSO al 80% es mucho mayor que en agua. Diferentes leyes de velocidad se observan en agua y en DMSO por lo que no es posible compararlas directamente, pero si comparamos la k_{obs} para una concentración de 1mM de metal bajo las condiciones óptimas de pH, la reactividad en DMSO al 80% (k_{obs} en el intervalo de 0.02- 0.1 s^{-1} para BNPP y k_{obs} entre 1- 10 s^{-1} para HPNPP) es alrededor de 2 órdenes de magnitud mayor que la mejor actividad para los catalizadores de cationes de lantánidos en agua con ambos sustratos.

Las cinéticas de hidrólisis de segundo y tercer orden con respecto al metal posiblemente reflejen el hecho de que las especies activas son hidroxocomplejos binucleares o trinucleares, formados reversiblemente y en bajas concentraciones por la asociación de complejos mononucleares que existen predominantemente en disolución. Se han estabilizado complejos binucleares de lantánidos gracias a la ayuda de ligantes orgánicos los cuales se han identificado como las especies activas para la hidrólisis de fosfodiésteres en agua donde se favorece la agregación más que en DMSO. [48,52] De hecho complejos binucleares de lantánidos puenteados por aniones metoxi son las especies activas en la transesterificación de fosfodiésteres en metanol. [50,51] La reactividad de las hidroxoespecies en agua es mayor para los hidroxocomplejos con una relación OH:M mayor o igual a dos por ejemplo $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$ ó $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_5$. En DMSO al 80% se observa una tendencia similar y en ambos medios los cationes de lantánidos presentan una baja actividad catalítica ante la hidrólisis de los triésteres. Una

diferencia entre los sistemas acuosos y nuestro sistema de estudio es que en agua las mismas especies activas son las responsables de la hidrólisis de ambos fosfodiésteres BNPP y HPNPP, mientras que en DMSO al 80% la hidrólisis de HPNPP involucra complejos con una relación mayor de OH:M y de más alta nuclearidad que para el caso de BNPP.

Primero discutiremos el mecanismo de hidrólisis de BNPP, para los tres lantánidos encontramos una ley de velocidad en la cual hay una contribución que es proporcional al producto de las concentraciones de $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Ln}(\text{OH})_3$ lo cual posiblemente refleje la reacción (Ec. 5.11) en la cual se forma la especie activa $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$.



Con una constante de asociación $K_{\text{asoc}} = [\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+] / [\text{Ln}(\text{OH})_2^+][\text{Ln}(\text{OH})_3]$. De este modo la ecuación 5.6 se puede reescribir:

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{Ln}(\text{OH})_2 + \text{Ln}(\text{OH})_3] = (k_3/K_{\text{asoc}}) [\text{Ln}_2(\text{OH})_5] = k_2[\text{Ln}_2(\text{OH})_5] \quad (5.12)$$

En la ecuación 5.12 la ecuación de velocidad de segundo orden $k_2 = (k_3/K_{\text{asoc}})$ corresponde a la reacción entre el BNPP y la especie $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$. En este sentido sólo podemos estimar el límite superior del valor de la K_{asoc} y por consiguiente sólo el límite inferior de k_2 . Ya que por titulaciones potenciométricas no fue posible detectar $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$, su contribución a la concentración total de metal debe ser menor a 5%. Con una concentración total de metal de 1mM el $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ y el $\text{Ln}(\text{OH})_3$ contribuyen cada uno con el 30% de abundancia en soluciones básicas (Fig. 52), esto se cumple si la K_{asoc} es menor a 300 M^{-1} . Con esta información calculamos los valores de k_3 (Tabla 15), en este sentido la estimación de k_2 daría valores mayores o iguales a $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para La(III), $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el caso de Nd(III) y $2.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el caso de Eu(III). Si comparamos las constantes de velocidad de segundo orden para la hidrólisis de BNPP por el complejo $\text{Ln}_2(\text{OH})_5\text{L}$ ($L= 4\text{-Imidazolcarboxilato}$) cuyo valor es 1.5 y $0.84 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Nd(III) y Eu(III) respectivamente en agua (en el caso de La(III) las especies activas tienen diferente composición). [48] En DMSO al 80% la especie catalíticamente activa $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$ es al menos $10^2 - 10^3$ veces más reactiva. Esta aceleración se explica por una asociación más fuerte

entre el fosfodiéster aniónico con los cationes de lantánidos en DMSO al 80% que en agua (Fig. 50), ya que los complejos de lantánidos están preferentemente solvatados por DMSO en las mezclas con agua. Se ha demostrado por estudios de luminiscencia de Eu(III) con resolución temporal que a partir de 50% en mol de DMSO- agua (80% en volumen) la esfera de coordinación del ión metálico contiene una sola molécula de agua, cuando en general los números de coordinación para este catión son de 8 ó 9. [71] El hidróxido aniónico unido al metal debe estar rodeado sólo por moléculas voluminosas de DMSO y puede atacar al sustrato enlazado al metal en un ambiente microscópico prácticamente no acuoso en el cual la reactividad se incrementa gracias a la deshidratación. En otras palabras, en DMSO al 80% en donde la constante de hidrólisis alcalina es prácticamente la misma que en pura agua, la coordinación simultánea del fosfodiéster y los aniones hidróxido al ión metálico se podría interpretar como una transferencia a un medio prácticamente de DMSO el cual provee una aceleración en la hidrólisis alcalina de 2- 3 órdenes de magnitud. [52] La representación para las reacciones de segundo orden con La(III) y Nd(III) se esquematizan en la Fig. 62A y 62B mientras que en la Fig. 62C se ilustra la situación de una reacción de primer orden como en el caso de $\text{Eu}(\text{OH})^{2+}$ (las cargas de los grupos que no intervienen en la catálisis se omiten).

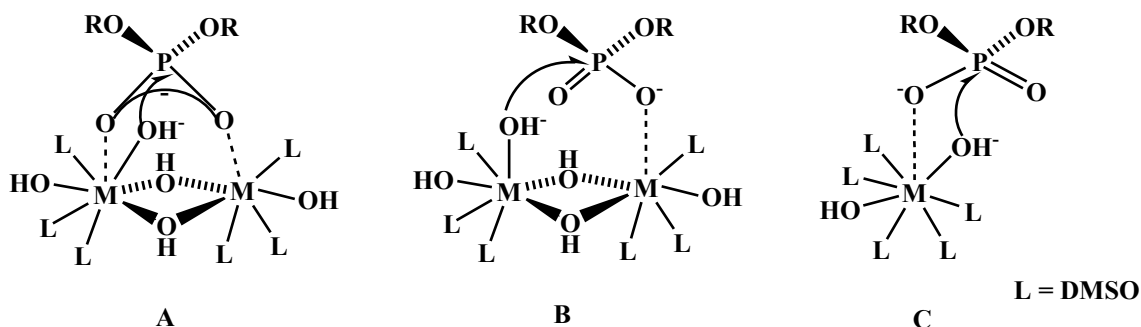


Fig. 62 Mecanismos propuestos para la hidrólisis de BNPP en DMSO al 80% v/v a 25 °C por complejos binucleares a) Doble activación por ácido de Lewis, b) Activación sencilla por ácido de Lewis y c) Activación sencilla por ácido de Lewis para complejos mononucleares. En los tres casos el nucleófilo es el hidróxido unido al metal.

En este estudio se encontró que para los cationes de lantánidos trivalentes el uso de DMSO no incrementa su eficiencia en la catálisis de triésteres de fosfato neutros como paraoxón. Estudios en agua con un sustrato similar, el 4- nitrofenildifenilfosfato, muestran que la constante de segundo orden encontrada para la hidrólisis por el complejo binuclear de La(III) es 2 veces

mayor que k_{OH} . [48] Pero en DMSO al 80% las constantes de velocidad k_2 y k_2' para la hidrólisis de paraoxón por hidroxocomplejos de La(III) son 2 veces menores que la k_{OH} encontrada (Tabla 15). Al ser paraoxón neutro y al contrario de lo que ocurre con fosfodiésteres aniónicos, la adición de DMSO no lo hace mejor ligante. Los resultados de la titulación por RMN de ^{31}P de paraoxón con $La(ClO_4)_3$ en la Fig. 50 muestran que se presenta una interacción muy débil o casi nula entre ellos, en este sentido paraoxón debe reaccionar con los hidroxocomplejos solvatados con DMSO por una vía intermolecular o por medio de una sustitución de ligantes desfavorable cuyo costo energético probablemente se toma del efecto del microambiente alrededor del metal creado a altos porcentajes de DMSO. En disolventes con menos poder donador tal como metanol los iones de lantánidos son catalizadores eficientes en la metanólisis de ambos sustratos BNPP y paraoxón.

La cinética de ruptura de HPNPP, la cual procede como una transesterificación intramolecular es más complicada. El mecanismo de reacción establecido en sistemas acuosos [57] se esquematiza en la Fig. 34 e involucra una desprotonación rápida y reversible del grupo β -hidroxilo y la ciclización subsecuente catalizada por el complejo metálico en su forma acuocomplejo más que en su forma hidroxilo. Este mecanismo para HPNPP da un perfil sigmoideo en las dependencias de la constante de velocidad al variar el pH como en el caso de la hidrólisis de BNPP lo cual los hace cinéticamente indistinguibles con la participación de hidroxocomplejos como especies activas, las cuales proveen un hidróxido unido al metal como nucleófilo mediante un mecanismo de esfera interna. Sin embargo en DMSO al 80% los perfiles para HPNPP de la variación de la velocidad con respecto a la variación en la concentración de hidróxido se encuentran más desplazados hacia soluciones más básicas (Fig. 46) y los órdenes cinéticos encontrados en metal son mayores, por lo cual los mecanismos cinéticamente indistinguibles de hidróxido "externo" ó "interno" que rigen en agua no se observan en DMSO al 80%, dado que los hidroxocomplejos responsables de la catálisis para BNPP son especies activas diferentes que para HPNPP. Una pregunta importante es si el mecanismo en la Fig. 34 puede seguir funcionando en DMSO al 80%. El problema radica en que en este medio el pK_a del grupo hidroxilo del HPNPP se debe incrementar enormemente comparándolo con el valor en agua y la concentración de la forma desprotonada debe ser muy baja como para que la reacción proceda con la velocidad observada. El valor de pK_a es desconocido pero se puede estimar de la siguiente manera: comenzando por el pK_a del grupo hidroxilo de la molécula de etilenglicol que en agua es

de 15.1 [84] y corrigiéndolo por el efecto de la sustitución del átomo de hidrógeno $\text{ROP(=O)(O}^- \text{)-}$ en el segundo grupo hidroxilo. En este sentido se obtiene el $\text{p}K_a$ del grupo hidroxilo $\text{ROP(=O)(O}^- \text{)-OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, el cual debe tener un valor muy cercano al $\text{p}K_a$ del HPNPP (la naturaleza del grupo R es insignificante ya que se encuentra separado del OH por 5 enlaces y el grupo metilo sólo presenta un modesto efecto inductivo). Una estimación del efecto que el cambio del grupo fosforilo puede hacerle al $\text{p}K_a$ se muestra en el siguiente ejemplo: para adenosina el valor es de 12.5. [85] Mientras que para adenosina 3'-etil fosfato el valor es 12.51. [86] En una serie de compuestos con estructura general de $\text{HOCH}_2\text{CH(NH}_3^+\text{)-X}$, en donde X es glicina, el $\text{p}K_a$ es de 7.33. Si X es leucina entonces su $\text{p}K_a$ es de 7.45 y en compuestos como $\text{PhOP(=O)-(O}^- \text{)-OCH}_2\text{CH(NH}_3^+\text{)-X}$, cuando X es glicina, el $\text{p}K_a$ es de 6.95 y para leucina el $\text{p}K_a$ es de 7.12. [87] Como se ilustra el efecto es pequeño y en promedio se puede esperar una reducción de 0.2 unidades, con lo cual podemos estimar el valor de $\text{p}K_a$ en 14.9 en agua para el HPNPP. Ahora debemos tomar en cuenta el efecto del DMSO, se ha demostrado que los valores de $\text{p}K_a$ para los ácidos ROH en DMSO al 80% correlacionan linealmente con su valor de $\text{p}K_a$ en agua con una pendiente de 1.4. [69] La ecuación de regresión completa tiene la forma $\text{p}K_a$ (DMSO 80%) = 1.42 $\text{p}K_a$ (acuoso) – 1.37. De este modo el $\text{p}K_a$ esperado para HPNPP en DMSO al 80% es de 19.8. Para el mecanismo dado en la Fig. 34, la constante de velocidad observada de segundo orden para la reacción catalizada está dada por la ecuación 5.13 donde k_2 es la constante de velocidad de segundo orden entre el sustrato desprotonado y la forma activa del complejo metálico como catalizador.

$$k_{2\text{obs}} = k_2 K_a / [\text{H}^+] \quad (5.13)$$

Si consideramos los resultados obtenidos para el catión Eu(III) , el cual presenta la cinética más simple y el menor orden de reacción con respecto a metal, en presencia de $\text{Eu(ClO}_4\text{)}_3$ en concentración de 1mM bajo condiciones en donde el todo el europio se encuentra como Eu(OH)_3 , la constante de velocidad observada es igual a 1.9 s^{-1} (Fig. 46). La cinética de segundo orden con respecto a Eu(OH)_3 probablemente refleje la participación del complejo binuclear $\text{Eu}_2(\text{OH})_6$ como especie activa. Aunque el valor de la constante de asociación para la formación del complejo $\text{Eu}_2(\text{OH})_6$ es desconocida, se puede estimar el valor que tomaría $k_{2\text{obs}}$ en su límite inferior, asumiendo la transformación de todo el Eu(OH)_3 en el complejo binuclear

activo. Entonces $k_{2\text{obs}} = k_{\text{obs}} / [\text{Eu}_2(\text{OH})_6] \geq 1.9 / 0.0005 \approx 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en una solución que contiene Eu(III) en concentración de 1mM y Me₄NOH en concentración de 3mM. En esta solución el pH es de 10.2 y si utilizamos la ecuación 5.13 para estimar el límite inferior de k_2 se obtiene:

$$k_2 = k_{2\text{obs}} [\text{H}^+] / K_a \geq 4 \times 10^3 \times 10^{-10.2} / 10^{-19.8} = 1.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad (5.14)$$

El valor de la constante de segundo orden para la reacción catalizada k_2 encontrado $1.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sobrepasa por varios órdenes de magnitud el límite de difusión aún para el catalizador menos activo, por lo cual el mecanismo de la Fig. 34 no es válido en este caso. Recientemente se han obtenido conclusiones semejantes sobre el mecanismo de ruptura de HPNPP por complejos binucleares de Zn(II) y Cu(II) en metanol. [63]

Un mecanismo alternativo involucra la transferencia de protón en el estado de transición del grupo β- hidroxilo del HPNPP a un hidróxido unido al metal el cual actúa como base general. Un rasgo característico de este mecanismo es la observación de un efecto isotópico cinético H/D grande. Ya que el efecto también existe en β_{pq} cuyos valores se definen por la ecuación 5.2, la sustitución de H₂O por D₂O podría afectar la distribución de hidroxocomplejos y de este modo indirecto podría repercutir en la constante de velocidad. Para excluir este efecto se hicieron mediciones de las constantes de velocidad para la hidrólisis de HPNPP en H₂O y en D₂O a una concentración fija de metal, pero a una relación variable de metal: hidróxido muy cercana a 1:3, para así garantizar la conversión completa del metal a Eu(OH)₃. El experimento se realizó con Eu(ClO₄)₃ en concentración 0.5mM en presencia de 1.3, 1.4 y 1.5 mM de Me₄NOH (relaciones molares 1:2.6, 1:2.8 y 1:3) en DMSO con 20% vol. de H₂O ó de D₂O. Las relaciones $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ que se obtuvieron fueron 0.8, 1.6 y 2.9 respectivamente. Por lo cual la conclusión es que existe un efecto isotópico en los valores de β_{pq} que se opone al efecto cinético isotópico y por ello el último es cercano a tres. Este valor de efecto isotópico del disolvente se encuentra en el intervalo típico para un mecanismo de catálisis por base general. [88] Es necesario notar que el efecto isotópico del disolvente probablemente afecta de manera indirecta los valores de β y refleja el efecto isotópico en la autoprotólisis del agua.

Con base en estos resultados, en este trabajo se propone que para la ruptura de la molécula de HPNPP están involucradas especies activas trinucleares, en el caso de La(III) y

Nd(III) y binucleares para Eu(III) (Tabla 15), las cuales se forman al ensamblarse de manera reversible las especies $\text{Ln}(\text{OH})_3$, y procede vía un mecanismo de base general asistido por el anión hidróxido unido al metal. En la Fig. 63 se muestra la representación esquemática del mecanismo para el complejo activo $\text{Ln}_2(\text{OH})_6$.

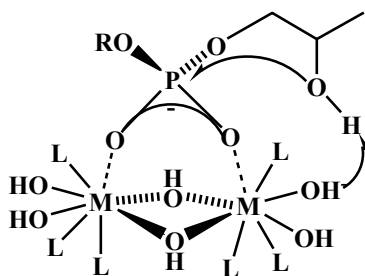


Fig. 63 Mecanismo propuesto para la hidrólisis de HPNPP por el complejo activo $\text{Ln}_2(\text{OH})_6$ en 80% DMSO v/v a 25 °C.

Es difícil proponer una estructura para las unidades de $\text{Ln}(\text{OH})_3$ en un arreglo trinuclear, sin embargo la cinética de tercer orden encontrada tiene precedentes tanto para la hidrólisis de BNPP por complejos de Ln(III) con macrociclos en etanol al 75% [39] así como para la hidrólisis de BNPP y algunos ribonucleótidos por complejos con peróxidos de Ln(III) en agua. [89] La razón por la cual la reacción con HPNPP incluye un complejo que contiene un número mayor de ligandos hidróxido unidos en comparación con el caso de BNPP no es clara. Aparentemente la coordinación de un anión hidróxido que pueda actuar como base fuerte se da más en el complejo neutro $\text{Ln}_2(\text{OH})_6$ que en el complejo catiónico $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$; dicha diferencia tiene repercusiones importantes ya que al parecer las especies neutras del tipo $\text{M}_n(\text{OH})_{3n}$ tienen una geometría adecuada en el estado de transición para la transesterificación de HPNPP vía un mecanismo de catálisis básica general, al contrario la especie $\text{M}_2(\text{OH})_5^+$ ajusta mejor a un estado de transición para la hidrólisis de BNPP vía un mecanismo que involucra el ataque nucleofílico por un hidróxido unido al metal. También existe incertidumbre en el modo de coordinación del fosfodiéster a las especies polinucleares activas. La coordinación del fosfodiéster como puente (Fig. 62A) provee un enlace más fuerte con las especies activas y una mayor activación electrofílica (doble activación por ácido de Lewis), pero la observación de una cinética de primer orden en el caso del complejo mononuclear $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$ muestra una coordinación sencilla (Fig. 62C) pero eficiente para la hidrólisis de BNPP. Si comparamos el límite inferior de la constante

de segundo orden calculada en el caso de $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ la cual es $k_2 \geq 2.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ encontramos que la reacción que incluye al complejo binuclear procede más rápido por al menos un orden de magnitud que en el caso en el que la especie activa es mononuclear $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$ con una $k_2 = 22.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 15). Evidentemente se observa una mejor eficiencia catalítica por parte de las especies polinucleares pero no se han caracterizado las posibles estructuras de los hidroxocomplejos binucleares solvatos con DMSO.

Una medida de la eficiencia catalítica que frecuentemente se discute en la literatura es el llamado "efecto catalítico" que se calcula a partir de la relación $k_{\text{obs}} / k_{\text{un}}$ en donde k_{obs} es la constante de velocidad medida en presencia del catalizador y k_{un} es la constante de velocidad de la hidrólisis sin catalizador en las mismas condiciones de pH y temperatura. Para calcular este efecto catalítico utilizaremos las condiciones óptimas para la hidrólisis de BNPP esto es con Me_4NOH en concentración de 2.5mM y metal en concentración de 1mM de por lo cual el valor de pH será de 10.7 para La(III), 9.8 para Nd(III) y 8.8 para Eu(III). Asumiendo que la reacción en ausencia de catalizador procede con aniones hidróxido libres uno puede obtener por medio de las ecuaciones de la (Tabla 15), los valores de k_{OH} y con el valor de $\text{p}K_{\text{w}} = 18.5$ en DMSO al 80% podemos calcular la k_{un} para la hidrólisis de BNPP, dichas constantes calculadas se encuentran en el intervalo de $1 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ para la solución que contiene Eu(III) a $1.3 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ en el caso de La(III). Para el sustrato HPNPP la k_{un} calculada se sitúa en el intervalo de 1.7×10^{-11} a $2.2 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ para Eu(III) y La(III) respectivamente.

Si comparamos la k_{obs} medida para ambos sustratos en presencia de Ln(III) en concentración de 1mM y Me_4NOH en concentración de 2.5mM (Fig. 54 y 58) se observa que los valores de $k_{\text{obs}} / k_{\text{un}}$ varían desde 5.4×10^{11} hasta 2×10^{13} en el caso de BNPP y de 2.7×10^9 hasta 4.4×10^{10} para HPNPP. Debemos notar que el pH de neutralidad en DMSO al 80% es de 9.2 por lo cual la estimación de la eficiencia catalítica se hace prácticamente en soluciones neutras. Estas eficiencias catalíticas sobrepasan por varios órdenes de magnitud a los mejores catalizadores para la hidrólisis de fosfodíesteres modelo en agua y se encuentran muy próximas a las eficiencias medidas en metanol. [14,33] Incluso este es el nivel de eficiencia de la catálisis por enzimas, es decir la k_{cat} informada en la saturación para una fosfodiesterasa binuclear con BNPP como sustrato es de 10 s^{-1} , lo cual corresponde a una eficiencia catalítica de 10^{12} . [90] Si analizamos la hidrólisis de paraoxón bajo esta perspectiva al utilizar $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 3mM en DMSO al 80% en presencia de OH^- en concentración de 3mM con un pH de 9.8, la

k_{obs} medida fue de $1.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 61) y al calcular la $k_{\text{un}} = 4.6 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ en las mismas condiciones obtenemos un efecto catalítico aceptable de 3×10^5 , el cual posiblemente se observaría al estudiar la hidrólisis de paraoxón en estos medios con bajo contenido de agua pero en presencia de amortiguadores para fijar el pH en vez de hidróxido.

Se ha planteado a lo largo de todo el trabajo que la alta actividad catalítica ante la hidrólisis de los diferentes diésteres de fosfato encontrada para los hidroxocomplejos de lantánidos en DMSO al 80% se debe a la preferencia de los iones de lantánidos a ser solvatados por el DMSO. [71] Lo cual previene la formación de agregados en disolución y la precipitación de los hidróxidos en comparación con soluciones acuosas, sin embargo la técnica de potenciometría no permitió la elucidación de las especies activas propuestas y parece ser muy sensible a las condiciones de reacción empleadas como el uso de electrolito soporte, por estas razones se decidió realizar un estudio con la técnica de luminiscencia inducida con láser para comprobar el esquema de especiación propuesto o la existencia de dímeros en solución que puedan funcionar como hidroxocomplejos activos.

5.11. Caracterización de especies presentes en la mezcla DMSO al 80% v/v: luminiscencia de Eu(III) inducida por láser

En el 2003, Plancque y Moulin por medio de luminiscencia inducida por láser con resolución temporal caracterizaron los hidroxocomplejos de Eu(III) en agua, por excitación directa del ión Eu(III) a 266nm. [80] Al elevar el pH de 2 a 8.5 las intensidades de los picos de emisión en 593nm y 617nm se volvieron iguales, con un valor grande para el full width at half maximum (FWHM), y el incremento en el pH hasta 13 no da cambios significativos en el espectro. El espectro de emisión de los hidroxocomplejos individuales se generó al adquirirlo en condiciones en donde una sola especie es predominante, en acuerdo con el diagrama de distribución de especies que obtuvieron. Sólo se consideró la formación de complejos mononucleares y utilizaron las constantes encontradas en la literatura. Para todos los hidroxocomplejos las intensidades del pico de emisión en 617nm fueron mayores que para los iones sólo solvatados por agua y con valores de FWHM grandes. Los tiempos de vida del estado excitado que se midieron en dicho trabajo disminuyen de 110 μs para el Eu(III) totalmente solvatado por agua a 50 μs para la especie $\text{Eu}(\text{OH})_4^-$. Este resultado muestra un comportamiento inusual del ión metálico al tener unidos ligantes hidróxido, dado que el decremento en los

tiempos de vida de una especie generalmente va acompañado de un apagamiento eficiente en la luminiscencia, pero en este caso las intensidades en el espectro de luminiscencia se incrementan. Aunado a esto, los tiempos de vida tan cortos de las especies de Eu(III) hidroxiladas presentan un comportamiento anómalo ya que generalmente el ión totalmente hidratado por agua es la especie que presenta mayor apagamiento en la luminiscencia, dado los que los osciladores O-H de los ligantes acua son los más eficientes para desactivar al Eu(III) en el estado excitado. [70,91] Estas observaciones indican que los factores mediante los cuales se da el apagamiento en la luminiscencia por los ligantes como hidróxidos no han sido bien determinados. En contraste, al estudiar los complejos con macrociclos de Eu(III) y gracias al uso de espectroscopia de fotoluminiscencia por excitación directa del ión Eu(III) han sido caracterizados con éxito las especies en disolución y los parámetros por los que se da el apagamiento en medios acuosos. [61,92] Estudios previos [71] de especiación del ión Eu(III) en agua o en mezclas DMSO / agua utilizan los cambios en la intensidad del pico de emisión o en los tiempos de vida del estado excitado para monitorear la formación de especies como función del pH o como función de la composición del medio. Una herramienta adicional es el uso de la espectroscopia de luminiscencia de excitación para monitorear la especiación ya que el Eu(III) presenta la transición ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$, por ende el estado basal y el estado excitado no son degenerados y no se desdoblan por el campo de los ligantes, esto hace que el pico de excitación se utilice ampliamente para caracterizar a las especies de Eu(III) ya que por cada especie presente en solución encontraremos un pico de excitación a menos que se traslapen los picos.

Nuestro interés en el uso de espectroscopia de fluorescencia inducida por láser es el de estudiar la especiación de los catalizadores de Eu(III) activos ante la hidrólisis de ésteres de fosfato en la mezcla DMSO al 80% v/v a 25 °C formados a pH básico en presencia de ligantes débiles como los contraniones de las sales utilizadas.

5.11.1. Titulación de $Eu(ClO_4)_3$ y $Eu(CF_3SO_3)_3$ con Me_4NOH por espectroscopia de fluorescencia inducida por láser en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Dado que los mejores catalizadores encontrados ante la hidrólisis de diésteres de fosfato modelo fueron los $Ln(ClO_4)_3$ se realizó la titulación de $Eu(ClO_4)_3$ en concentración de 1mM con Me_4NOH . Los resultados se muestran en la Fig. 64A en donde al agregar Me_4NOH en concentración de 1mM, se da un apagamiento inmediato en la intensidad de luminiscencia, lo

cual es inesperado, ya que en las titulaciones potenciométricas se observó que esta cantidad de hidróxido es apenas la necesaria para neutralizar el medio ácido en el que se inicia la titulación (Fig. 51) y no conlleva a la formación de hidroxocomplejos que abaten la luminiscencia. Por esta razón y por el comportamiento extraño del Eu(III) en trabajos anteriores al tener a percloratos como contra aniones [93] se decidió utilizar la sal $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en DMSO al 80% v/v y al realizar la titulación de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en concentración de 1mM con el hidróxido de tetrametilamonio en diferentes concentraciones (Fig. 64B) observamos que la banda de excitación decrece de manera regular y se ensancha el FWHM por la formación de los hidroxocomplejos. Es importante mencionar que el primer espectro, tanto de triflato como de percloratos en el medio DMSO al 80%, es el mismo a pesar de que en el último existe la presencia de 1mM de HClO_4 . Esto nos da una idea de cómo la presencia de percloratos podría favorecer la hidrólisis por Eu(III). En acuerdo con estas observaciones encontramos que las constantes de hidrólisis para $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ son un orden de magnitud mayores (Tabla 14) que en el caso del triflato de europio (Tabla 16). Además de que las constantes de equilibrio son sensibles a la naturaleza del contraión también lo son ante la presencia de percloratos en exceso pero dichas constantes no cambian en presencia de triflato de sodio en concentración de 10mM. Esto parece indicar que por alguna razón la formación de pares iónicos de Eu(III) con percloratos se facilita y estos actúan como apagadores eficientes de la luminiscencia de Eu(III) en 80% DMSO v/v.

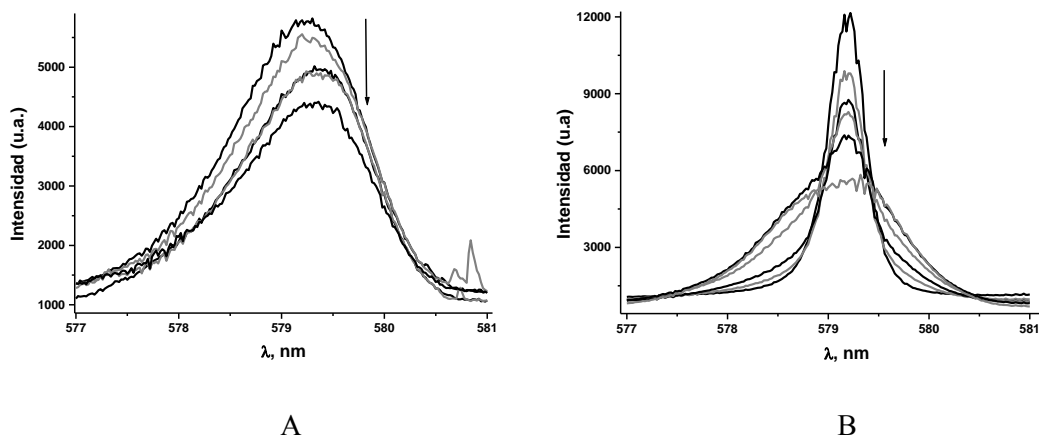


Fig. 64 Espectro de excitación ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_0$ (emisión ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ (1mM) (A) ó $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) (B) en DMSO al 80% v/v a 25 °C con concentraciones variables de Me_4NOH desde 0 hasta 2.5mM.

La conversión del acuaión de Eu(III) en hidróxidos en medio acuoso se vio acompañada de un incremento en la intensidad del pico de emisión. [80,94] En este estudio observamos una aparente desactivación del pico de emisión en la mezcla con DMSO. El decremento en la intensidad del pico de emisión se podría atribuir a un apagamiento más eficiente dado por la coordinación del ligante al metal en el medio ó por cambios en la esfera de solvatación del ión Eu(III). El cambio en la simetría del Eu(III) por la formación de un nuevo complejo se esperaría que viniera acompañada de cambio en la intensidad del pico de luminiscencia. Otra explicación es que la formación de varias especies de Eu(III) podría hacer que los picos de excitación se recorrieran fuera del intervalo que comprende de 577nm a 581nm dando la apariencia de que se han abatido.

5.11.2. Titulación de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ por potenciometría en DMSO al 80%

Se decidió realizar el estudio de especiación por potenciometría y comprobar el esquema propuesto para percloratos, ya que se encontró una menor actividad ante la hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos al utilizar como catalizador al $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ y por la ausencia de efecto salino (Tabla 12). En la Fig. 65 se muestra la curva de titulación obtenida para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en concentración de 1mM de en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Se pudo llegar en la titulación hasta 2.5 equivalentes de Me_4NOH .

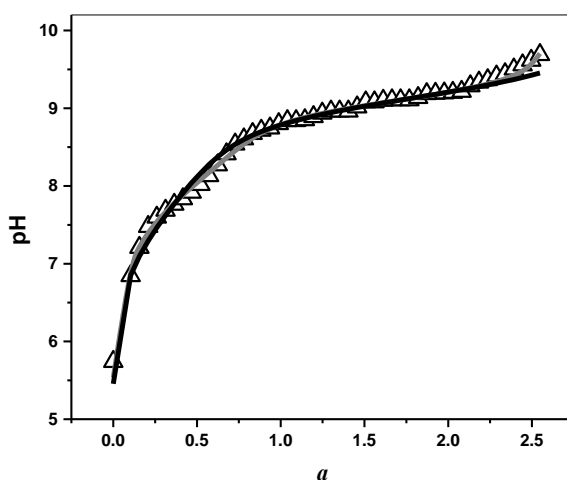
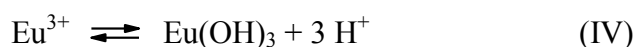
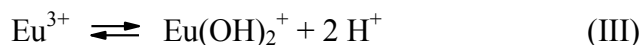
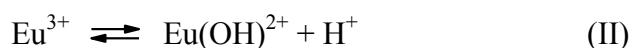
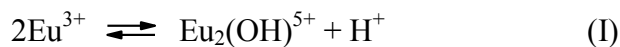


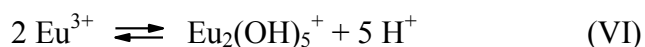
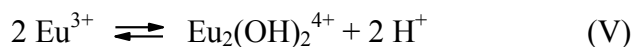
Fig. 65 Curvas de titulación potenciométricas para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Las líneas continuas son el ajuste generado por HYPERQUAD en acuerdo con las constantes de equilibrio; a) La línea negra ecuaciones I-IV, b) La línea gris ecuaciones V-VI.

Las titulaciones se realizaron en presencia y ausencia de electrolito soporte (0.01M $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$) arrojando los mismos resultados en contraste con los estudios con percloratos (Tabla 14). En un inicio se ajustó al modelo que se encontró para percloratos (Tabla 16), el cual presenta los equilibrios (I) – (IV).



No obstante, al probar otro modelo de especiación que incluye algunas especies binucleares (Tabla 16) se observa que el ajuste también es bueno (Fig. 65), los equilibrios en este caso son el (I) y el (IV) del primer modelo junto con el (V) y el (VI). El ajuste de todas las titulaciones para ambos modelos se muestra en los anexos (3a y 3b).



El parámetro estadístico sigma para el ajuste es mejor en el caso del primer modelo, pero la diferencia entre los valores es marginal, por otro lado la curva calculada mediante el segundo modelo visualmente sigue mejor los puntos experimentales (Fig. 65). No sería correcto el descartar un esquema sólo por los resultados en las titulaciones potenciométricas, lo importante es mencionar que ambos modelan bien la curva de titulación pero predicen diagramas de distribución de especies diferentes.

Tabla 16 Constantes de equilibrio obtenidas del ajuste a las titulaciones por los modelos que presentan la serie de reacciones (I)-(IV) ó (I), (IV), (V) y (VI).

$\log\beta_{pq}$			
$\text{Eu}_2(\text{OH})^{5+}$	$\text{Eu}(\text{OH})^{2+}$	$\text{Eu}(\text{OH})_2^+$	$\text{Eu}(\text{OH})_3$
-5.0±0.2	-8.4±0.2	-17.5±0.2	-26.3±0.3
$\text{Eu}_2(\text{OH})^{5+}$	$\text{Eu}_2(\text{OH})_2^{4+}$	$\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$	$\text{Eu}(\text{OH})_3$
-5.0±0.1	-13.2±0.2	-40.0±0.3	-26.6±0.3

La situación se ilustra en la Fig. 66A donde se emplea el modelo con mayor número de hidróxidos mononucleares ecuaciones (I) – (IV); la diferencia más notable es la contribución del complejo trihidroxo $\text{Eu}(\text{OH})_3$, el cual comienza a aparecer al adicionar tan sólo 0.5mM de OH^- por 1mM de $\text{Eu}(\text{III})$ y se torna predominante después de la adición de 1.7mM de OH^- , también y en acuerdo con el modelo (I) – (IV), los dos hidroxocomplejos mayores $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Eu}(\text{OH})_3$ se forman a un pH temprano y su concentración es comparable entre 1 y 2 mM de OH^- . Como se muestra en la Fig. 66B, las reacciones (V) y (VI) que incluyen la formación de dos complejos mayores $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ y $\text{Eu}(\text{OH})_3$ al contrario del modelo anterior se forman a mayor pH y la concentración del trihidroxo es siempre menor que la del $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$.

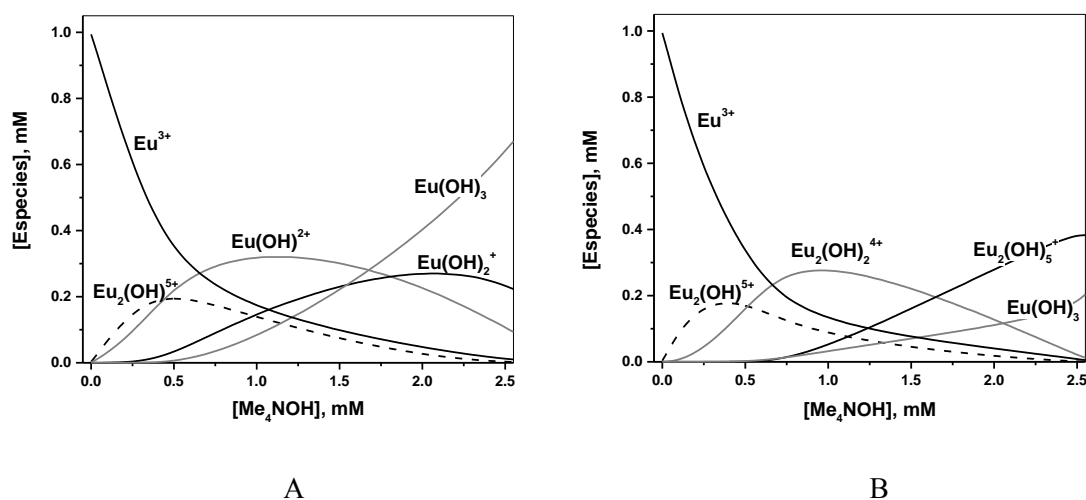
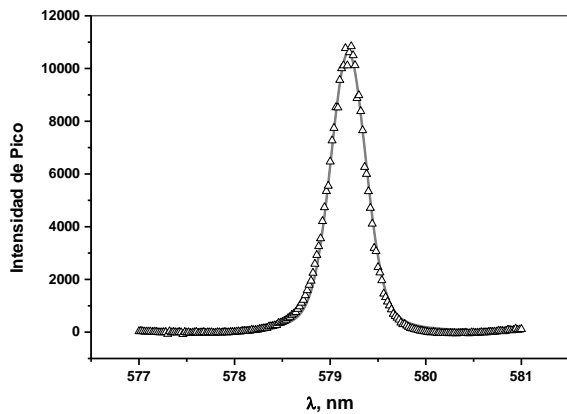


Fig. 66 Diagramas de distribución de especies para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) en DMSO al 80% obtenidos de los datos potenciométricos. A) Modelo con especies predominantemente mononucleares ec. I-IV. B) Modelo con especies binucleares ec. V-VI.

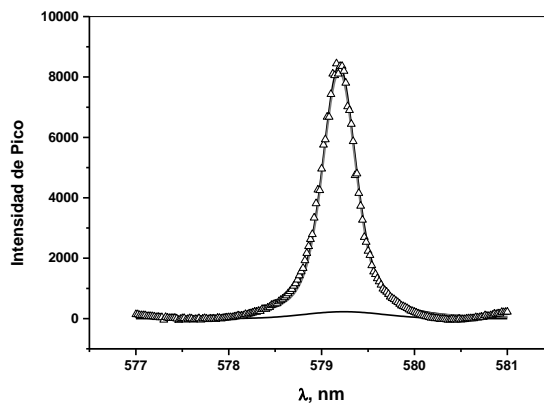
Se puede discriminar entre las diferencias en el diagrama de distribución de especies obtenido por ambos esquemas en base a sus propiedades espectrales, las cuales podrán ser correlacionadas con la concentración de cada especie presente en disolución en vez del consumo total de hidróxido como es el caso de potencimetría.

5.11.3. Desconvolución de los espectros obtenidos por fluorescencia de Eu(III) inducida por láser

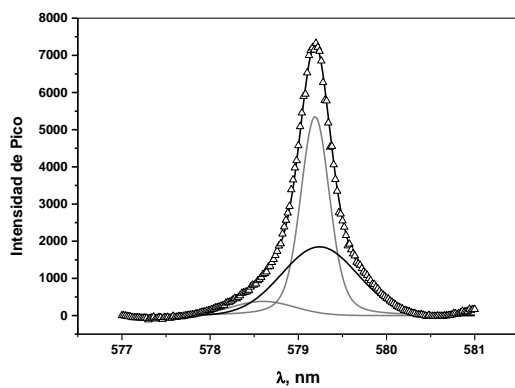
Como ya habíamos mencionado en la sección 5.11.1, la transición ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ no presenta desdoblamiento por el campo de los ligantes, dado que los cambios espectrales al titular $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en concentración de 1mM en DMSO al 80% v/v a 25 °C fueron: el ensanchamiento y abatimiento en la luminiscencia (Fig. 64), por lo cual podemos pensar que el incremento en el FWHM refleja la formación de especies adicionales con máximos de absorción desplazados. [95] Los espectros individuales de cada especie se pueden obtener por desconvolución y los resultados se muestran en la Fig. 67. En ausencia de base añadida (Fig. 67A) sólo observamos un pico con el máximo en 579.19nm con el valor de FWHM de $0.42 \pm 0.02\text{nm}$, el cual se puede atribuir al solvato de Eu(III). La adición de base en un inicio induce la aparición de una banda adicional en 579.24nm con FWHM de $1.03 \pm 0.02\text{nm}$ (Fig. 67B), la cual crece al adicionar mayor concentración de hidróxido y desaparece en presencia de 2.5 equivalentes de Me_4NOH . En la Fig. 67C se muestra un tercer pico que hace su aparición después de añadir una concentración de 1mM de base, su máximo está en 578.6nm, su ancho de banda es de $1.04 \pm 0.09\text{nm}$ y su intensidad crece conforme se adiciona mayor concentración de hidróxido. Finalmente el cuarto pico se ubica en 579.44nm con un FWHM de $0.99 \pm 0.02\text{nm}$ y surge en presencia de 2 equivalentes de base y crece conforme aumenta el pH (Fig. 67E). El pico que corresponde a la especie sólo con moléculas de disolvente es decir el solvato de Eu(III) en 579.19nm se observa en todos los espectros con un decremento gradual en su intensidad, en el último espectro Fig. 67F que es la máxima concentración de base en la titulación, este pico incrementa su ancho a FWHM a 0.84nm. Se trató de hacer las desconvoluciones fijando el ancho de pico para el valor encontrado del solvato sin hidróxidos FWHM de 0.42nm y un pico adicional sin éxito. En otro intento por mejorar el ajuste se intentó fijar el ancho FWHM para cada banda en todas las concentraciones de hidróxido sin mejores resultados. Una posible explicación del por qué varían tanto los valores de FWHM a lo largo de la titulación se atribuye a la falta de equilibración del sistema en soluciones básicas.



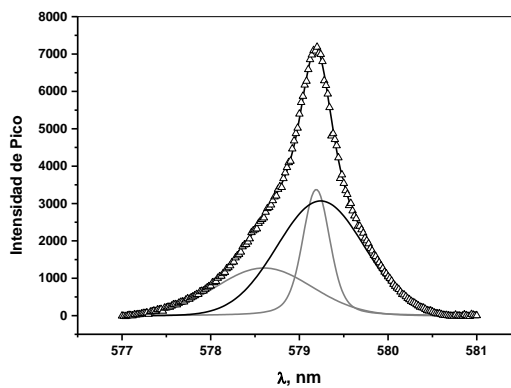
A



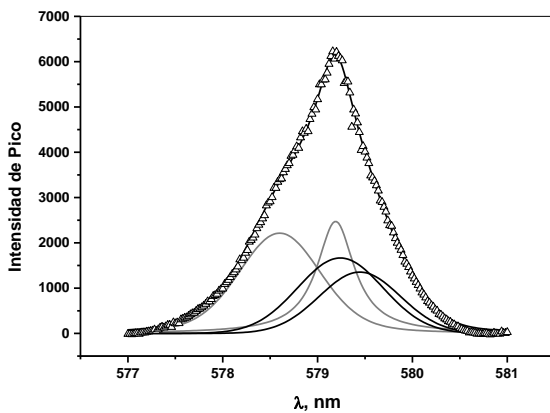
B



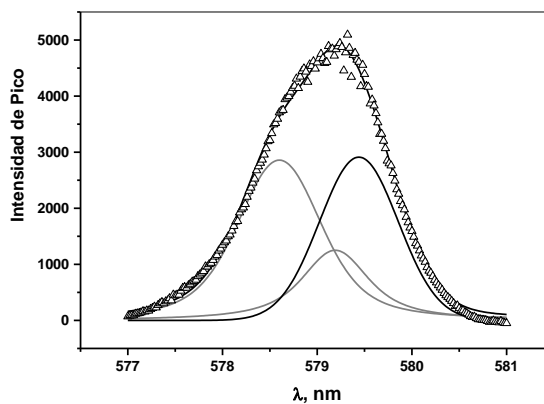
C



D



E



F

Fig. 67 Ajuste de pico por desconvolución del espectro de excitación ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) en presencia de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5mM de Me_4NOH (A – F) respectivamente en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Al hacer la gráfica de las intensidades de pico obtenidas en la desconvolución versus la concentración de Me_4NOH (Fig. 68) y compararla con el diagrama de distribución de especies obtenido por potenciometría (Fig. 66) observamos que la formación del primer hidroxocomplejo $\text{Eu}_2(\text{OH})^{5+}$ no está acompañado por la aparición de un nuevo pico. Esto indica que el pico de excitación que contiene un anión hidróxido que funge como puente se traslapa con el pico que corresponde al complejo solamente solvatado. El pico con máximo en 579.24nm sigue la curva de distribución para $\text{Eu}(\text{OH})^{2+}$ o para $\text{Eu}_2(\text{OH})_2^{4+}$. El siguiente máximo en 578.6nm sigue de cerca al complejo binuclear $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ más que a la especie mononuclear $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$ la cual pasa por un máximo a una concentración de 2 equivalentes de base y aparece en 0.5mM de hidróxido. El desplazamiento al rojo del pico en 579.44nm podría corresponder al mayor hidroxocomplejo $\text{Eu}(\text{OH})_3$ y sigue mejor la curva de distribución de éste calculada a partir del segundo modelo que involucra las ecuaciones (V)-(VI) (Fig. 66B).

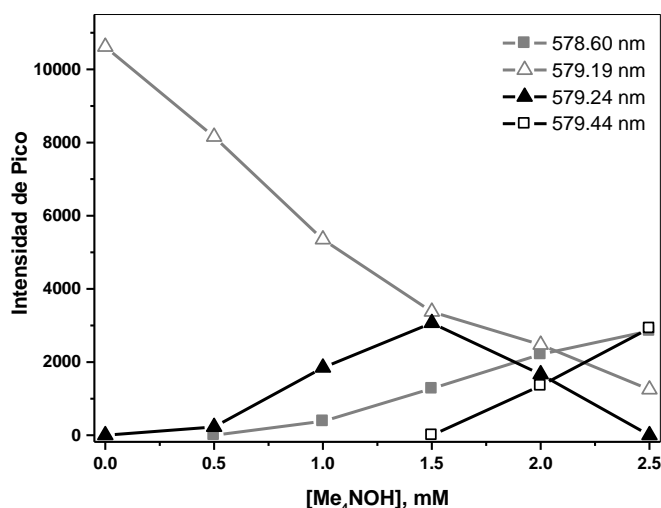


Fig. 68 Intensidades de los picos de excitación después de la adición de Me_4NOH al $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Con este análisis de desconvolución para encontrar los picos ocultos, podemos aseverar la existencia de al menos tres especies en solución básica y el diagrama de distribución encontrado en base en las intensidades de pico soporta el modelo de reacción que incluye predominantemente especies binucleares.

5.11.4. Titulación de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ con Me_4NOH en DMSO al 80% por luminiscencia con resolución temporal (TRES)

Los tiempos de vida del estado excitado se midieron en función de la concentración de base, al igual que en el espectro de excitación en los que se esperan diferentes picos para diferentes especies, éstas tendrían distintos tiempos de vida. En la Fig. 69 se muestra la curva de decaimiento para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) al variar la concentración de Me_4NOH . El perfil sin la adición de base ajusta a un solo exponente (ec. 4.5), con un tiempo de vida de $\tau_1 = 537 \pm 4 \mu\text{s}$. Los tiempos de vida en presencia de base dejan de ser monoexponenciales: como se muestra en la Fig. 69 el ajuste (línea continua) a dos exponente sigue el perfil para 1 y 2 equivalentes de hidróxido.

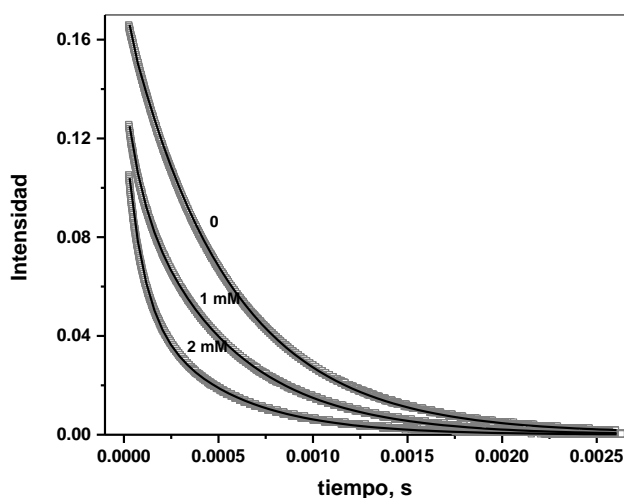


Fig. 69 Decaimientos de la intensidad de luminiscencia con resolución temporal tomados en 579.22nm para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) en presencia de 0, 1 y 2mM de Me_4NOH en DMSO al 80%. Los ajustes son las líneas continuas negras, monoexponencial sin hidróxido y biexponencial en presencia de hidróxido.

Mediante la ecuación 4.5 calculamos α_i que son los factores pre-exponenciales y τ_i que son los tiempos de vida. En todos los casos en presencia de hidróxido se obtiene un mejor ajuste a dos exponentes (Fig. 69), los parámetros del ajuste en todas las concentraciones de Me_4NOH y en 3 longitudes de onda se colectan en la Tabla 16. Los factores pre-exponenciales fueron

normalizados al aplicar la condición $\sum \alpha_i = 1$ y deberían reflejar la contribución de cada especie a la concentración total de Eu(III).

Tabla 16. Tiempos de vida de la luminiscencia (τ) en μs para $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) (errores relativos $\leq 2\%$) y factores pre- exponenciales obtenidos al ajustar los decaimientos a la ecuación 4.5 al incrementar la concentración de hidróxido en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

OH ⁻ , mM	578.86 nm				579.22 nm				579.48 nm			
	τ_1	α_1	τ_2	α_2	τ_1	α_1	τ_2	α_2	τ_1	α_1	τ_2	α_2
0	538	1.0			543	1.0			529	1.0		
0.5	524	0.75	80.2	0.25	530	0.84	111	0.16	522	0.71	80.2	0.29
1.0	481	0.60	80.4	0.4	530	0.74	98.0	0.26	477	0.56	80.9	0.44
1.5	381	0.46	79.9	0.54	499	0.60	93.9	0.4	400	0.41	79.0	0.59
2.0	292	0.47	65.2	0.53	437	0.46	83.4	0.54	287	0.39	63.1	0.61
2.5	255	0.43	60.8	0.57	273	0.37	62.7	0.63	207	0.37	48.4	0.63

Los tiempos de vida del estado excitado se colectaron en 3 longitudes de onda las cuales corresponden al máximo encontrado para el solvato de Eu(III) 579.22nm, y las otras dos longitudes una de cada lado del pico máximo. Como se muestra en la Tabla 16 en ausencia de base los tiempos de vida obtenidos son prácticamente independientes de la longitud de onda, pero en presencia de hidróxido se observa una notable variación en los valores de τ . Esto es reflejo de una contribución variable de los diferentes hidroxocomplejos a la intensidad de luminiscencia observada en las diferentes longitudes de onda, como se hace evidente en los espectros obtenidos por desconvolución. Los resultados de la Tabla 16 exhiben que hay dos grupos de hidroxocomplejos, unos con tiempo de vida en el intervalo de 200 – 500 μs en el que se incluye al solvato y los otros en el intervalo de 50 – 110 μs . Los tiempos de vida entre cada grupo no se pudieron obtener mediante este método de ajuste ya que existe una fuerte dependencia entre los coeficientes de la ec. 4.5 a medida que se ajusta a mayor número de exponentes.

En el caso de los hidróxidos con tiempos de vida más largos sus contribuciones disminuyen a mayor concentración de hidróxido y en el caso contrario las contribuciones de los complejos con tiempos de vida cortos aumentan a mayor pH, por lo cual sólo se pueden atribuir a dos grupos de hidroxocomplejos con menor contenido de grupos hidroxilo o con mayor contenido como el $\text{Eu}(\text{OH})_3$. Sin embargo parece imposible correlacionar las contribuciones obtenidas de los factores pre-exponenciales con los diagramas de distribución de especies. En

todos los casos observamos que las curvas de decaimiento no se pueden resolver con el número esperado de componentes. La dificultad para resolver los decaimientos de diferentes especies puede ser resultado del gran número de hidróxidos presentes al mismo tiempo. Además para cada hidróxido detectado por potenciometría debería existir un número distinto de solvatos, ya que trabajamos en una mezcla de disolventes, y si el intercambio de ligantes en los complejos binucleares es lento, cada solvato podría tener un tiempo de vida diferente y lo que observamos es un promedio del tiempo de vida de muchos componentes lo que finalmente hace que no se puedan resolver.

Recientemente se han observado decaimientos biexponenciales para los complejos de Eu(III) con ácido húmico en agua con tiempos de vida cortos de 40 y 60 μs . Estos valores encontrados para τ son significativamente menores que los reportados para el ión acuoso. [96] Los autores explican estos tiempos de vida cortos por efectos de apagamiento en la luminiscencia sin explicar su origen. Los electrolitos simples y neutros como los cloruros y percloratos de los metales alcalinos disminuyen el tiempo de vida del proceso radiativo de Eu(III) en agua, en este medio el efecto se observa tanto por la presencia de aniones como de cationes. [93] Como explicación sugieren interacciones de largo alcance entre el ión excitado y las moléculas de disolvente a las que contribuyen los aniones en la esfera externa del ión. Cabe mencionar que los aniones perclorato reducen el tiempo de vida de la luminiscencia de Eu(III) mucho mejor que los aniones cloruro.

Estudios en agua han encontrado tiempos de vida cortos para los hidroxocomplejos de Eu(III) en comparación con el ión acuoso, el tiempo de vida encontrado por TRES para el cristal de $\text{Eu}(\text{OH})_3$ es 88 μs . [97] Dado que tanto en disolución como en estado sólido los hidróxidos de Eu(III) no pueden tener un número mayor de grupos OH^- en la primera esfera de coordinación que los que presenta el ión acuoso (8 ó 9), estos resultados indican claramente una mejor eficiencia del ión OH^- que de la molécula de agua al apagamiento en la luminiscencia del ión Eu(III). En este trabajo los tiempos de vida más cortos encontrados fueron de 60 μs , los cuales se pueden atribuir a la mezcla de hidróxidos solvatados del tipo $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ y $\text{Eu}(\text{OH})_3$. Estos tiempos de vida son menores que los valores para el ión acuoso pero ligeramente mayores que los informados para los hidroxocomplejos de Eu(III) en agua. [80] Este comportamiento es el reflejo de la preferente solvatación de los hidroxocomplejos por el DMSO en la mezcla de disolventes, como ocurre en el caso catión de Eu(III) no hidrolizado en forma de solvato.

5.11.5. Transferencia de energía resonante entre lantánidos

Para probar la posible presencia de complejos binucleares se estudió por luminiscencia en DMSO al 80% v/v a 25 °C la transferencia de energía resonante (LRET) entre Tb(III) y Eu(III). Estos dos cationes se han utilizado como pares donador/aceptor en disoluciones con DMSO [72] y en enzimas para probar sitios múltiples de unión entre iones de Ln(III).

Primero se obtuvieron los espectros de emisión de Tb(CF₃SO₃)₃ excitándolo en 487nm (Fig. 70A) y el espectro de emisión de la formación de sus hidroxocomplejos agregando Me₄NOH en concentración de 2mM, también se adquirieron los espectros de emisión de Eu(CF₃SO₃)₃ excitándolo en 579nm y al agregar Me₄NOH en concentración de 2mM en DMSO al 80% v/v a 25°C haciendo un barrido de longitudes de onda de 500- 700nm (Fig. 70B).

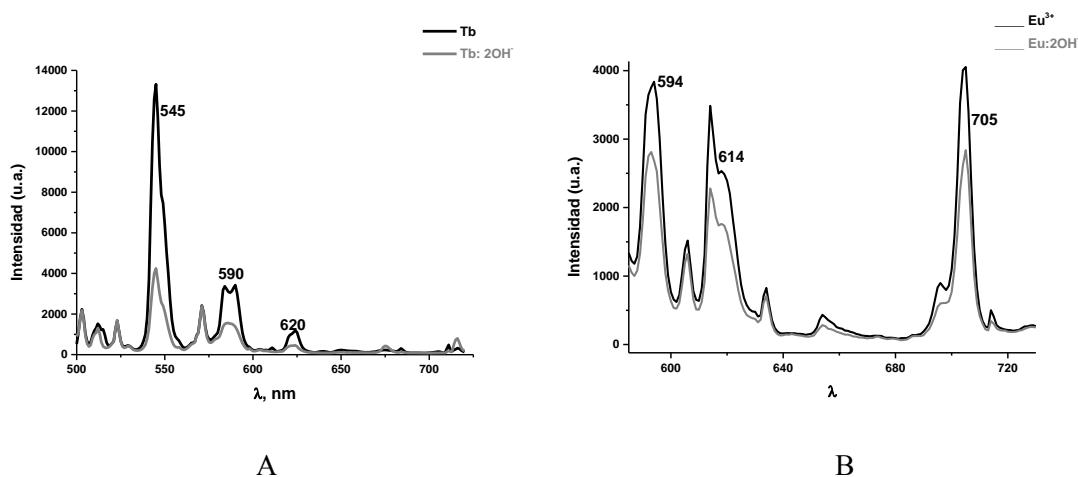


Fig. 70 A) Espectro de emisión para Tb(CF₃SO₃)₃ (1mM). B) Espectro de emisión para Eu(CF₃SO₃)₃ (1mM). En ambas gráficas la línea negra es en ausencia de base añadida y la línea gris con Me₄NOH (2mM) en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

En la Fig. 70A se muestra el espectro de emisión de Tb(III) en el medio de trabajo. Se observan tres bandas de emisión características de este catión una en 545nm, otra en 590nm y en 620nm. En presencia de hidróxido se observa un fuerte abatimiento en la luminiscencia por la presencia de los osciladores OH⁻. En el caso de Eu(III) la intensidad de luminiscencia es menor si la comparamos con la del catión Tb(III) en ausencia de hidróxido (Fig. 70B) y presenta tres bandas características en 594nm, 614nm y 705nm. Nuevamente se observa el abatimiento en la intensidad de luminiscencia por la formación de hidroxocomplejos lo que se atribuye a la presencia de osciladores OH⁻ en la esfera de coordinación del ión metálico (Fig. 38).

Posteriormente se utilizó LRET en el cuál se excita al ión $\text{Tb}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en 487nm, y se observa la emisión del ión $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en 614nm y 705nm si es que se da la transferencia de energía. El estudio se realizó en una concentración de 1×10^{-3} M de las cuales 19 veces era la concentración de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ y una de $\text{Tb}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Se tomaron los espectros de emisión excitando al ión Tb(III) sin hidróxido y después se agregaron 1, 2, 2.5mM de Me_4NOH y se midieron los espectros de emisión barriendo de 500nm- 700nm.

En la Fig. 71 se muestran los resultados obtenidos al hacer el estudio con la técnica LRTE, en donde se excitó selectivamente al catión Tb(III) en 487nm. Se observa que la adición de un equivalente de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ no afecta el espectro de Tb(III) en ausencia de base en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Pero al adicionar dos equivalentes de Me_4NOH el efecto de abatimiento se hace presente en el pico de emisión en 545nm.

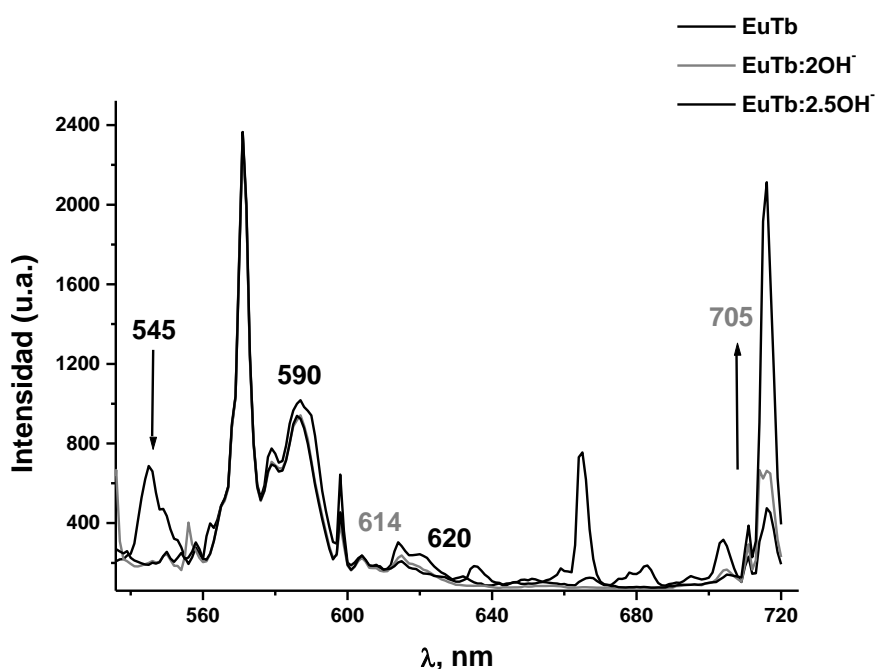


Fig. 71 Espectro de emisión de $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (λ de excitación en 487.00nm) en DMSO al 80% v/v . La línea negra corresponde a $[\text{Tb}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3 + \text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3]$ (1mM). La línea gris después de la adición de dos equivalentes de Me_4NOH . La línea negra en presencia de 2.5 equivalentes de Me_4NOH .

Como se demostró en la Fig. 70A la adición de 2 equivalentes de Me_4NOH al Tb(III) aumenta de manera significativa el efecto de abatimiento en el pico de emisión en 540nm, pero

cuando están presentes en la disolución tanto los hidróxidos como los iones Eu(III) la intensidad del pico de emisión de Tb en 540nm decrece rápidamente y los picos de emisión característicos para Eu(III) en 614nm y 705nm aparecen indicando una transferencia de energía de Tb(III) a Eu(III) en la mezcla de hidroxocomplejos binucleares.

5.12. Cinéticas de hidrólisis de BNPP y HPNPP por Eu(CF₃SO₃)₃ en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Se hicieron los estudios cinéticos de la ruptura de los diésteres de fosfato BNPP (Fig. 44) y HPNPP (Fig. 46) en presencia de Eu(CF₃SO₃)₃ en concentración de 1mM variando la concentración de Me₄NOH en DMSO al 80% v/v a 25°C. La actividad catalítica observada es aproximadamente 5 veces menor que al emplear Eu(ClO₄)₃ como catalizador con el sustrato BNPP. Con el análogo de ARN, el HPNPP, la velocidad decae alrededor de 2 veces por el empleo de triflato de europio(III) pero aún así la actividad fosfoestereolítica encontrada es mayor que la mostrada por complejos de lantánidos en agua. [33] La Fig. 72 muestra los resultados para la hidrólisis de BNPP en presencia de Eu(CF₃SO₃)₃ en concentración 1mM en función de la concentración de base añadidos y sobrepuesto con el diagrama de distribución de especies. La velocidad de reacción se incrementa al pasar de 0.5mM de hidróxido donde comienza la actividad catalítica hasta 2mM en donde sigue la curva de distribución del complejo Eu₂(OH)₅⁺ y se incrementa rápidamente siguiendo la formación de Eu(OH)₃.

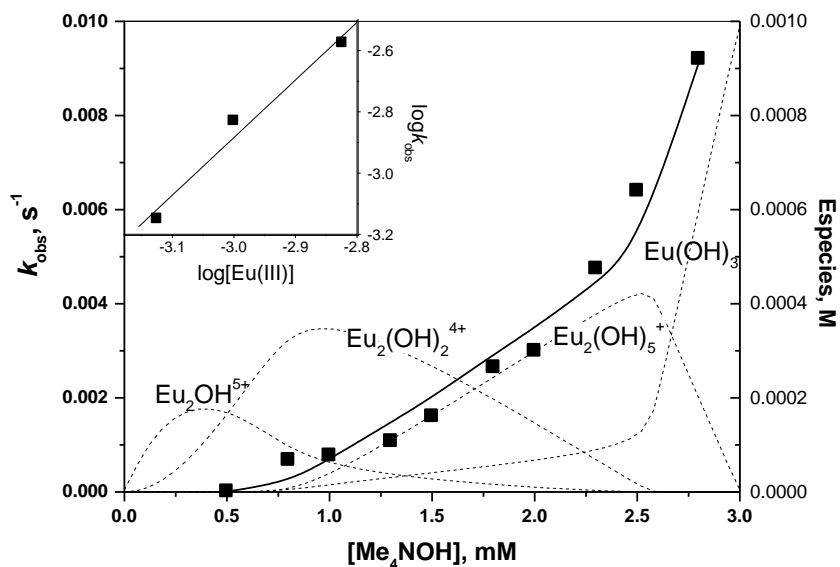


Fig. 72 Constantes observadas de primer orden para la hidrólisis de BNPP por $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) a concentración variable de Me_4NOH en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las curvas punteadas muestran el diagrama de distribución de especies cuya concentración se lee en el eje derecho. Las líneas continuas son el perfil teórico de k_{obs} calculado en acuerdo con la ley de velocidad 5.15. En el cuadro insertado se ejemplifica la dependencia de la k_{obs} con la concentración de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$.

La gráfica del $\log(k_{\text{obs}})$ vs el logaritmo de la concentración total de $\text{Eu}(\text{III})$ tiene una pendiente de 1.9 ± 0.2 , lo cual nos indica una contribución mayor a primer orden de las especies reactivas. La ecuación de velocidad 5.15 se deriva de analizar ambas dependencias e incluye las contribuciones de primer orden para la especie $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ y de segundo orden para la especie $\text{Eu}(\text{OH})_3$.

$$k_{\text{obs}} = (12 \pm 1)[\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+] + (1.7 \pm 0.3) \times 10^4 [\text{Eu}(\text{OH})_3]^2 \quad (5.15)$$

La hidrólisis de BNPP con percloratos de lantánidos sigue la ley de velocidad 5.6, la cual fue interpretada de modo que la especie activa propuesta es el complejo binuclear $[\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+]$, el cual se forma de manera reversible a partir de complejos mononucleares como se muestra en la ecuación 5.11. La constante de segundo orden $12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la hidrólisis de BNPP en DMSO por el complejo $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ que se puede comparar con la constante de velocidad $0.84 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

encontrada con anterioridad para el complejo binuclear $\text{Eu}_2(\text{OH})_5(\text{ICA})$, el cual se estabilizó con el ligante 4- imidazolcarboxilato y presenta una composición similar en agua. [48] Con estos valores podemos apreciar el efecto del disolvente al pasar de agua a DMSO al 80%, lo que incrementa la reactividad de los hidroxocomplejos de lantánidos por un orden de magnitud. Este efecto del medio se ve reflejado en una mayor asociación entre el sustrato aniónico y el catalizador, aunado a la preferencia de los cationes de lantánidos a ser solvatados por el DMSO.

Los resultados para la ruptura de la molécula de HPNPP se muestran en la Fig. 73, con este sustrato la actividad catalítica se hace apreciable a partir de una concentración de 1mM de base y la constante de velocidad de la reacción se incrementa bruscamente a partir de una concentración de 2mM de base.

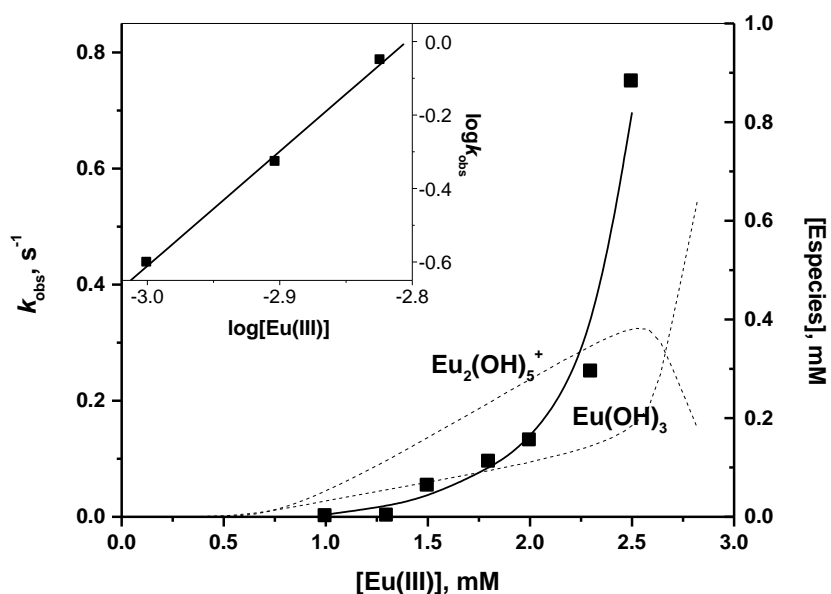


Fig. 73 Constantes observadas de primer orden para la hidrólisis de HPNPP por $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (1mM) a concentración variable de Me_4NOH en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Las curvas punteadas muestran el diagrama de distribución de especies cuya concentración se lee en el eje derecho. Las líneas continuas son el perfil teórico de k_{obs} calculado en acuerdo con la ley de velocidad 5.16. En el cuadro insertado se ejemplifica la dependencia de la k_{obs} con la concentración de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$.

La gráfica del $\log(k_{\text{obs}})$ vs. el logaritmo de la concentración total de $\text{Eu}(\text{III})$ arroja una pendiente de 3.1 ± 0.2 , nuevamente un orden mayor a uno y superior al encontrado para el sustrato BNPP. Estos resultados son consistentes con los encontrados anteriormente para percloratos de

lantánidos los cuales siguen la ley de velocidad 5.8. Aparentemente la especie activa en ambos sistemas es un complejo trinuclear y se forma por la auto asociación de las especies neutras $\text{Ln}(\text{OH})_3$, ecuación 5.16.

$$k_{\text{obs}} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{11} [\text{Eu}(\text{OH})_3]^3 \quad (5.16)$$

La ruptura de HPNPP es una reacción de transesterificación en contraste con el sustrato BNPP, con el cual se lleva a cabo una sustitución nucleofílica directa por los aniones hidróxido. Por ello la participación de diferentes especies activas para estos sustratos no es de sorprenderse. Sin embargo, en DMSO al 80% observamos para BNPP el mismo tipo de especies activas que en agua, pero con el sustrato HPNPP se observan especies diferentes. Esto podría ser consecuencia de un cambio en el mecanismo de reacción en el caso del sustrato hidroxilado al pasar de agua a DMSO al 80% como se discutió en la sección 5.10, y como consecuencia el anión hidróxido coordinado al metal puede funcionar como base general, un rol que no existe en agua, y por ello este mecanismo requiere la participación de especies activas diferentes.

6. CONCLUSIONES

El medio de DMSO acuoso es muy favorable para la actividad fosfodiesterolítica de lantánidos trivalentes, pero no para la de los cationes de metales de transición, entre los cuales la mayor actividad la muestra el complejo de Ni(II) con 1,5,9- triazaciclododecanona en DMSO al 90% v/v. En el caso del triéster paraoxón como sustrato, la actividad catalítica encontrada por los hidroxocomplejos de lantánidos en DMSO acuoso es menor a la del OH⁻ libre en el mismo medio.

Estudios con otros disolventes orgánicos mostraron que en MeCN se observa un incremento grande de la actividad catalítica de Zn(II) en la transesterificación de HPNPP en el medio neutro, pero la velocidad disminuye abruptamente aun en presencia de 1% de agua.

La composición óptima del DMSO acuoso para la actividad de lantánidos es 80% v/v (50% mol). En esta mezcla, al aumentar el pH de la disolución los cationes solvatados se transforman en una serie de hidroxocomplejos mononucleares (con perclorato como contraión) ó dinucleares (con triflato como contraión). La composición y constantes de formación de hidroxocomplejos fueron establecidas mediante titulaciones potenciométricas, espectrofotométricas y por estudio de espectros de fluorescencia inducida con láser.

Mediante correlaciones entre la actividad catalítica, para 5 iones de lantánidos, y la distribución de hidroxocomplejos como función de la concentración de metal y de hidróxido añadido se estableció que las especies catalíticamente activas son complejos binucleares para la hidrólisis de BNPP (un fosfodiéster modelo para ADN) y trinucleares para la transesterificación de HPNPP (sustrato modelo para ARN). En particular, para la hidrólisis de BNPP la especie activa es [Ln₂(OH)₅]⁺ y el mecanismo de reacción se puede interpretar como una doble activación del sustrato por ácido de Lewis, seguida del ataque nucleofílico al átomo de fósforo por un hidróxido coordinado al metal. Para la transesterificación de HPNPP las especies activas son complejos neutros Ln₂(OH)₆ ó Ln₃(OH)₉, los cuales se ensamblan reversiblemente a partir de Ln(OH)₃ y el mecanismo propuesto incluye asistencia básica general por parte de un hidróxido coordinado.

La eficiencia de la catálisis para BNPP es tal que en presencia de $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM la velocidad observada sobrepasa por un factor de 10^{12} - 10^{13} a la reacción no catalizada, y para HPNPP por un factor de 10^{10} en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Esta alta actividad catalítica se atribuye a la preferente solvatación de los iones de lantánidos por el DMSO, lo cual se comprobó por los estudios de luminiscencia de Eu(III) con resolución temporal en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Dicha preferencia permite la creación de un microambiente favorable para la reacción en la esfera de coordinación del catalizador ya que previene la precipitación de los hidróxidos a pH básicos y permite una mejor asociación por carga entre el catalizador y el sustrato aniónico como en el centro activo de las enzimas naturales.

REFERENCIAS

1. **Corbridge, D.E.C.** Phosphorous. *Studies in Inorganic Chemistry*. Amsterdam : Elsevier, 1990.
2. **Eichhorn, G.L., Marzilli, L.G.** *Advances in Inorganic Biochemistry*. Amsterdam : Elsevier, 1979.
3. **Moss, R., A., Kim, K., Y., Swarup, D.H.** J. Am. Chem. Soc., 1986, Vol. 108, pág. 788.
4. **Menger, F.M., Gan, L.H., Johnson, E., Durst, D.H.** J. Am. Chem. Soc., 1987, Vol. 109, pág. 2800.
5. **Williams, N., Takasaki, B., Wall, M., Chin, J.** Acc. Chem. Res., 1999, Vol. 32, pág. 485.
6. **Westheimer, F.H.** Science, 1987, Vol. 235, pág. 1173.
7. **Strobel, S.A., Dervan, P.B.** Nature, 1991, Vol. 350, pág. 172.
8. **Sigman, D.S., Mazumder, A., Perrin, D.M.** Chem. Rev., 1993, Vol. 93, pág. 2295.
9. **Magda, D.M., Miller, R.A., Sessler, J.L., Iverson, B.L.** J. Am. Chem. Soc., 1994, Vol. 116, pág. 7439.
10. **Strater, N., Lipscomb, W.N., Klabunde, T.K., Krebs, B.** Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 1996, Vol. 35, pág. 2024.
11. **Cowan, J.** Chem. Rev., 1998, Vol. 98, pág. 1067.
12. **Wilcox, D.** Chem. Rev., 1996, Vol. 96, pág. 2435.
13. **Schneider, H.J. & Yatsimirsky, A.K.** The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems. A. Sigel and H. Sigel. *Metal Ions in Biological Systems*. New York and Basel : Dekker, Inc., 2003, pág. 369.
14. **Neverov, A., Lu, Z., Maxwell, C., Mohamed, M., White, C., Tsang, J., Brown, S.** J. Am. Chem. Soc., 2006, Vol. 128, pág. 16398.
15. **Jagoda, M., Warzeska, H., Pritzkow, H., Wadepohl, H., Imhof, P., Smith, J.C., Kramer R.** J. Am. Chem. Soc., 2005, Vol. 127, pág. 15061.
16. **Taran, O., Medrano, F., Yatsimirsky, A.** Dalton Trans., 2008, pág. 6609.
17. **Kramer, R.** Coord. Chem. Rev., 1999, Vol. 182, pág. 243.
18. **Mancin, F., Tecilla, P.** New. J. Chem., 2007, Vol. 31, pág. 800.
19. **Hegg, E., Burstyn, J.** Coord. Chem. Rev., 1998, Vol. 173, pág. 133.
20. **McWhirter, C., Lund, E., Tanifum, E., Feng, G., Sheikh, Q., Hengge, A., Williams, N.** J. Am. Chem. Soc., 2008, Vol. 130, pág. 13673.
21. **Harris, M., Cassano, A.** Curr. Opin. Chem. Biol, 2008, Vol. 12, pág. 626.

22. **Wolfenden, R., Snider, M.** *Acc. Chem. Res.*, 2001, Vol. 34, pág. 938.
23. **Kirby, A.** *Acc. Chem. Res.*, 1997, Vol. 30, pág. 290.
24. **Yatsimirsky, A.** *Coord. Chem. Rev.*, 2005, Vol. 249, pág. 1997.
25. **Mader, M., Bartlett, P.** *Chem. Rev.*, 1997, Vol. 97, pág. 1281.
26. **Warshel, A.** *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, pág. 27035.
27. **Bruice, T., Benkovic, S.** *Biochemistry*, 2000, Vol. 39, pág. 6267.
28. **Franklin, S.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, Vol. 5, pág. 201.
29. **Hendry, P., Sargeson A.M.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, Vol. 111, pág. 2521.
30. **Hettich, R., Schneider, H.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, Vol. 119, pág. 5638.
31. **Wolfenden, R.** *Chem. Rev.*, 2006, Vol. 106, pág. 3379.
32. **Morrow, J. Buttrey, L., Shelton, V., Berback, K.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, Vol. 114, pág. 1903.
33. **Liu, C., Wang, Li.** *Dalton Trans.*, 2009, pág. 227.
34. **Schroeder, G., Lad, C., Wyman, P., Williams, N., Wolfenden, R.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, Vol. 103, pág. 4052.
35. **Deal, K., Hengge, A., Burstyn, J.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, Vol. 118, pág. 1713.
36. **De Rosch, M., Trogler, W.** *Inorg. Chem.*, 1990, Vol. 29, pág. 2409.
37. **Koike, T., Kimura, E.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, Vol. 113, pág. 8935.
38. **Kimura, E., Kodama, Y., Koike, T., Shiro, M.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, Vol. 117, pág. 8304.
39. **Jurek, P., Jurek, A., Martell, A.** *Inorg. Chem.*, 2000, Vol. 39, pág. 1016.
40. **Franklin, S.** *Curr. Op. Chem. Biol.*, 2001, Vol. 5, pág. 201.
41. **Lim, S., Franklin S.** *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, Vol. 61, pág. 2184.
42. **Schneider, H., Rammo, J.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, Vol. 32, pág. 1716.
43. **Roigk, A., Hettich, R., Schneider, J.** *Inorg. Chem.*, 1998, Vol. 37, pág. 751.
44. **Peluffo, F., Torres, J., Kremer, C., Dominguez, S., Mederos, A., Kremer, E.** *Inorg. Chim. Acta*, 2006, Vol. 359, pág. 2107.
45. **Bazzicalupi, C., Bencini, A., Bonaccini, C., Glorgi, C., Gratteri, P., Moro, S., Palumbo, M., Simionato, A., Sgrignani, J., Sissi, C., Valtancoli, B.** *Inorg. Chem.*, 2008, Vol. 47, pág. 5473.

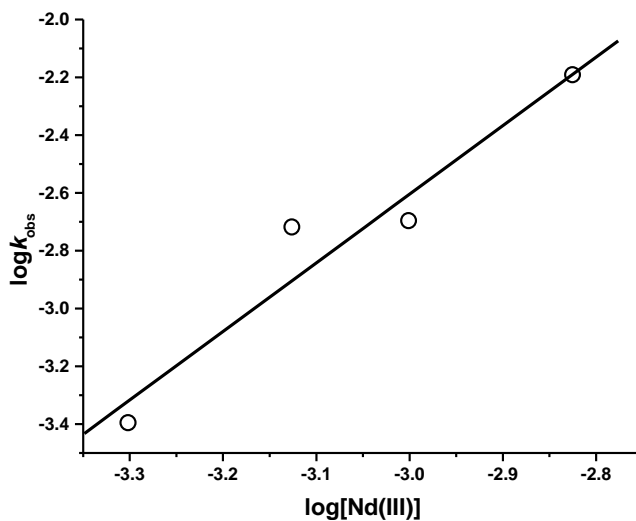
46. **Subat, M., Woinaroschy, K., Gerstl, C., Sarkar, B., Kaim, W., Konig, B.** Inorg. Chem., 2008, Vol. 47, pág. 4661.
47. **Chang, A., Hong, B., Yuan, B.** Inorg. Chem., 2005, Vol. 44, pág. 6646.
48. **Aguilar-Pérez, F., Gomez-Tagle, P., Collado-Fregoso, E., Yatsimirsky, A.** Inorg. Chem., 2006, Vol. 45, pág. 9502.
49. **Abell, K., Kirby, A.** Teth. Lett., 1986, Vol. 9, pág. 1085.
50. **Neverov, A., Brown, S.** Inorg. Chem., 2001, Vol. 40, pág. 3588.
51. **Brown, R., Neverov, A.** J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2002, pág. 1039.
52. **Gomez-Tagle, P., Vargas-Ziga, I., Taran, O., Yatsimirsky, A.** J. Org. Chem., 2006, Vol. 71, pág. 9713.
53. **Kalidas, C., Hefter, G., Marcus, Y.** Chem. Rev., 2000, Vol. 100, pág. 819.
54. **Kovari, E., Kramer R.** J. Am. Chem. Soc., 1996, Vol. 118, pág. 12704.
55. **Taran, O., Yatsimirsky, A.** Chem. Commun., 2004, pág. 1228.
56. **Sigel, R., Pyle, A. M.** Chem. Rev., 2007, Vol. 107, pág. 97.
57. **Yang, M.Y., Richard, J.P., Morrow, J.** J. Am. Chem. Soc., 2005, Vol. 127, pág. 1064.
58. **Bryan, C., Schowen, B., Schowen R.** Can. J. Chem., 1996, Vol. 74, pág. 931.
59. **Iranzo, O., Richard, J., Morrow, J.** Inorg. Chem., 2004, Vol. 43, pág. 1743.
60. **Farquhar, E., Richard, J., Morrow, J.** Inorg. Chem., 2007, Vol. 46, pág. 7169.
61. **Nwe, K., Andolina, C., Morrow, J.** J. Am. Chem. Soc., 2008, Vol. 130, pág. 14861.
62. **Tsang, J., Neverov, A., Brown, S.** J. Am. Chem. Soc., 2003, Vol. 125, pág. 1559.
63. **Lu, Z., Neverov, A., Brown, S.** J. Am. Chem. Soc., 2007, Vol. 129, pág. 11642.
64. **Liu, T., Neverov, A., Brown, S.** J. Am. Chem. Soc., 2008, Vol. 130, pág. 16711.
65. **Morales- Rojas, H., Moss, R.** Chem. Rev., 2002, pág. 2497.
66. **Tsang, J., Neverov, A., Brown, S.** J. Am. Chem. Soc., 2003, Vol. 125, pág. 7602.
67. **Brown D., Usher D.** J. Chem. Soc., 1965, pág. 6558.
68. **Lyle, S., J., Rahman, M.** Talanta, 1963, Vol. 10, pág. 1177.
69. **Baughman, E.H., Kreevoy, M.** J. Phys. Chem., 1974, Vol. 78, pág. 421.

70. **Supkowski, R., W.D. Horrocks, Jr.** Inorg. Chim. Acta, 2002, Vol. 340, pág. 44.
71. **Tanaka, F., Kawasaki, Y., Yamashita, S.** J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, 1988, Vol. 84, pág. 1083.
72. **Chrysochoos, J. J.** Luminescence, 1974, Vol. 9, pág. 79.
73. **Inada, Y., Hayashi, H., Sugimoto, K., Funahashi, S.** J. Phys. Chem. A., 1999, Vol. 103, pág. 1401.
74. **Kobayashi, K., Yokoi, M., Kuroda, S., Kubota, E.** Bull. Chem. Soc. Jpn., 1987, Vol. 60, pág. 2535.
75. **Hong, S.I., Suh J.** Org. Lett., 2000, Vol. 2, pág. 377.
76. **Kamienska- Piotrowicz, E., Stangret J.** J. Mol. Structure, 1995, Vol. 344, pág. 69.
77. **Edwards, D., Neverov, A., Brown, S.** J. Am. Chem. Soc., 2009, Vol. 131, pág. 368.
78. **Klungness, G.D., Byrne, R.H.** Polyhedron, 2000, Vol. 19, pág. 99.
79. **Kragten, J., Decnop-Weever, L.G.** Talanta, 1984, Vol. 9, pág. 731.
80. **Plancque, G., Moulin, V., Toulhoat, P., Moulin, C.** Anal. Chim. Acta, 2003, Vol. 478, pág. 11.
81. **Cox, B.G., Parker, A.J., Waghorne, W. E.** J. Phys. Chem., 1974, Vol. 78, pág. 1731.
82. **Buncel, E., Wilson, H.** Adv. Phys. Org. Chem., 1977, Vol. 4, pág. 133.
83. **Henrie, D.E., Fellows, R.L., Choppin, R. G.** Coord. Chem. Rev, 1976, Vol. 18, pág. 199.
84. **Ballinger, P., Long, F. A.** J. Am. Chem. Soc., 1960, Vol. 82, pág. 795.
85. **Izatt, R., M., rytting, J., H., Hansen, L., D., Christinsen, J.,** J. Am. Chem. Soc., 1966, Vol. 88, pág. 2641.
86. **Acharya, S., Foldesi, A., Chattopadhyaya, J.** J. Org. Chem., 2003, Vol. 68, pág. 1906.
87. **Folsch, G., Osterberg, R.** J. Biol. Chem., 1959, Vol. 234, pág. 2298.
88. **Jencks, W.P.** *Catalysis in Chemistry and Enzimology.* New York: Dover, 1987.
89. **Mejía-Radillo, Y., Yatsimirsky, A. K.** Inorg. Chim. Acta, 2003, Vol. 351, pág. 97.
90. **Keppetipola, N., Shuman, S.** J. Biol. Chem., 2006, Vol. 281, pág. 19251.
91. **Andolina, C.M., Holthoff, W.G., Page, P.M., Mathews R.A., Morrow J.R., Bright, F.B.** Appl. Spectrosc, 2009, Vol. 63, pág. 483.
92. **Wu, S.L., Franklin, S.J., Raymond K.N., Horrocks, W.D., Jr.** Inorg. Chem., 1996, Vol. 35, pág. 162.
93. **Nehlig, A., Elhabir, M., Billard, I., Albrecht-Gary, A., Lützenkirchen, K.** Radiochim. Acta, 2003, Vol. 91, pág. 37.

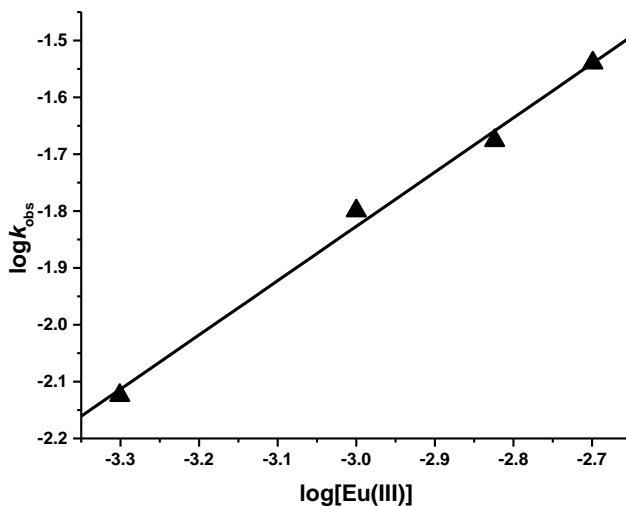
94. **Lee, B.H., Park, Y.J., Moon, H.** Bull. Korean Chem. Soc., 1995, Vol. 16, pág. 654.
95. **Horrocks, W.D.Jr., Sudnick, D.R.** Acc. Chem. Res., 1981, Vol. 14, pág. 384.
96. **Brevet, J., Claret F., Reiller P.** Spectrochim. ActaA, 2009, Vol. 74, pág. 446.
97. **Wang Z., Felmy A. R., Xia Y. X., Mason M.J.** Radiochim. Acta, 2003, Vol. 91, pág. 329.

1) Anexo 1

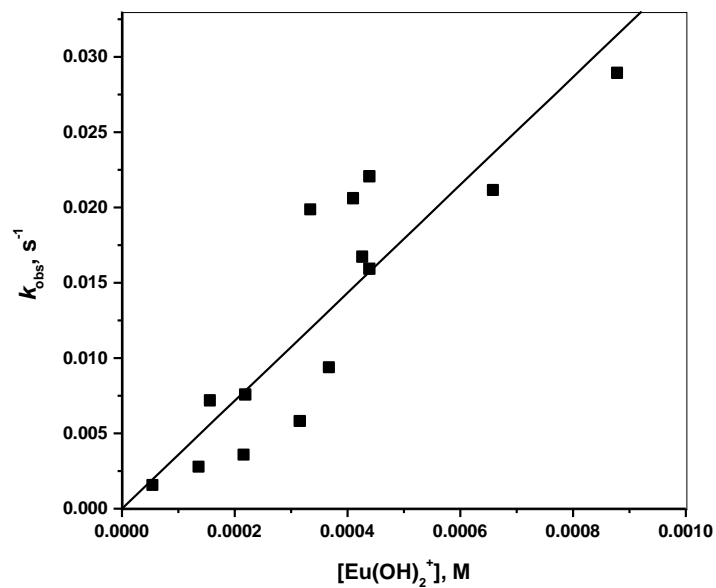
- a) Logaritmos de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs logaritmo de la concentración de $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$, en la relación $[\text{Nd}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Pendiente $B = 2.3 \pm 0.2$



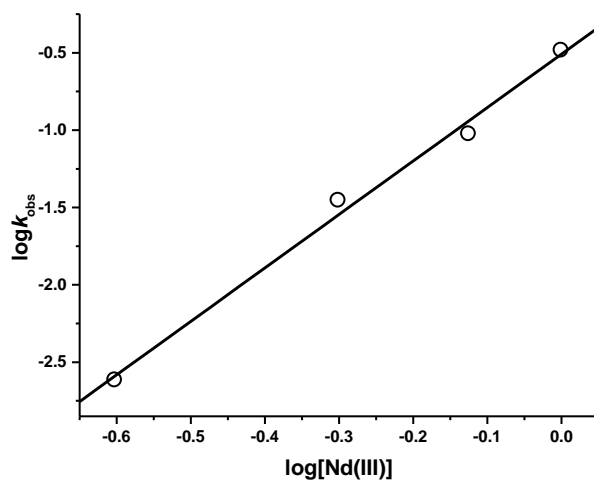
- b) Logaritmos de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs logaritmos de la concentración de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$, en la relación $[\text{Eu}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Pendiente $B = 1 \pm 0.05$



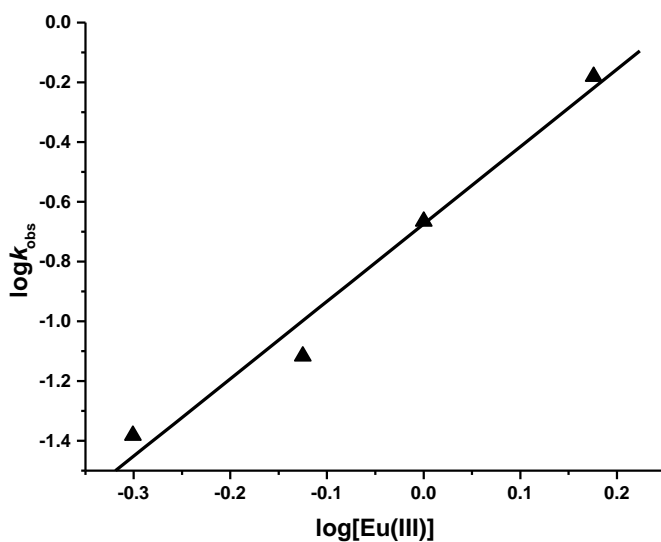
- c) Constantes de velocidad observadas para la hidrólisis de BNPP por $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C como función de las concentraciones calculada de $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$, en acuerdo con la ecuación 5.7, la pendiente es igual a k_2 .



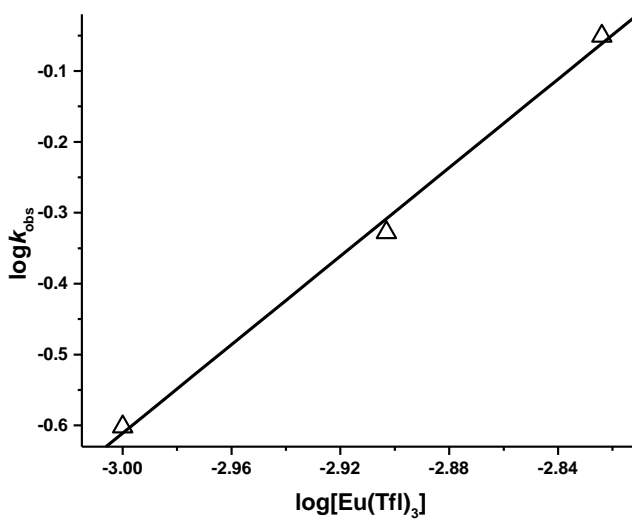
- d) Logaritmos de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs logaritmo de la concentración de $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$, en la relación $[\text{Nd}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Pendiente $B = 3.4 \pm 0.2$



- e) Logaritmos de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs logaritmo de la concentración de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$, en la relación $[\text{Eu}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Pendiente $B = 2.6 \pm 0.3$



- f) Logaritmos de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs logaritmo de la concentración de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$, en la relación $[\text{Eu}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ en DMSO al 80% v/v a 25 °C. Pendiente $B = 3.1 \pm 0.2$



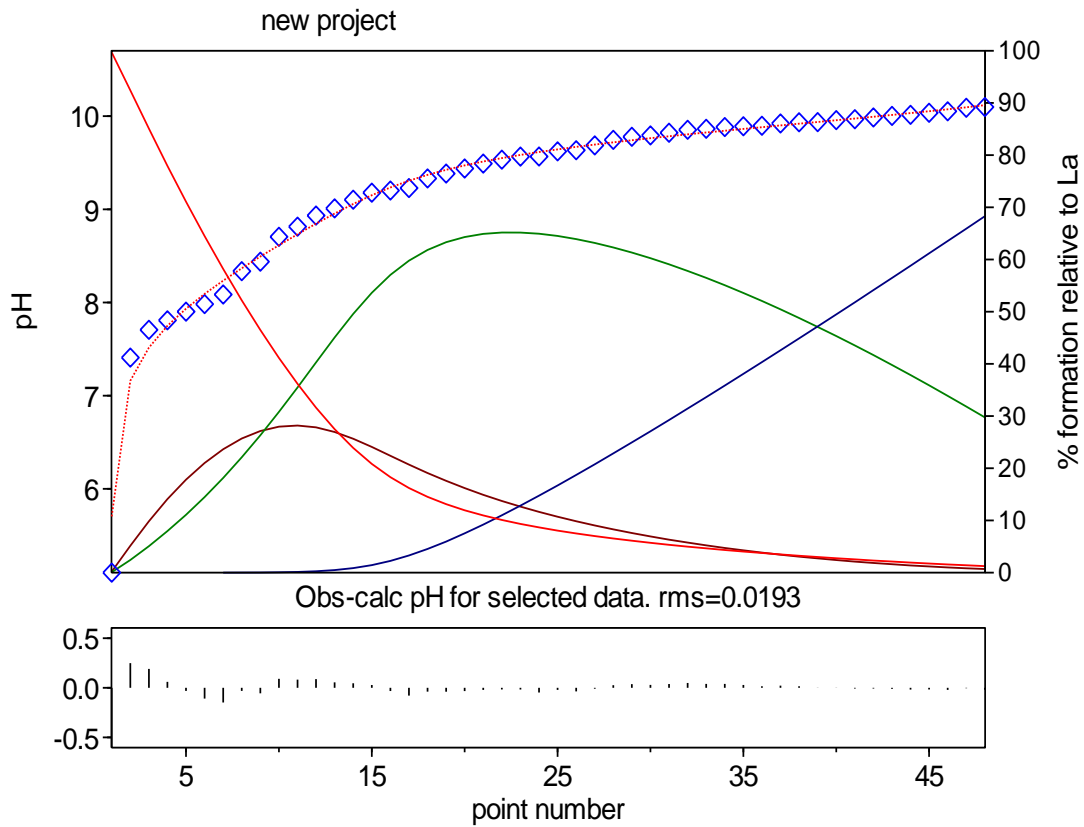
2) Anexo 2. Titraciones Potenciométricas

a) Ajuste por HYPERQUAD a la titulación de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM con 10mM de NaClO_4 en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Refinement successful

Not enough data for meaningful chi-squared
sigma = 3.5809

			Value	relative	log	standard	
				std devn	beta	deviation	
Beta	0	-1	constant	3.1623E-19			
Beta	2	-1	refined	2.0955E-06	0.1299	-5.6787	0.0564
Beta	1	-1	refined	1.8173E-09	0.0357	-8.7406	0.0155
Beta	1	-3	refined	2.4303E-29	0.0434	-28.6143	0.0189

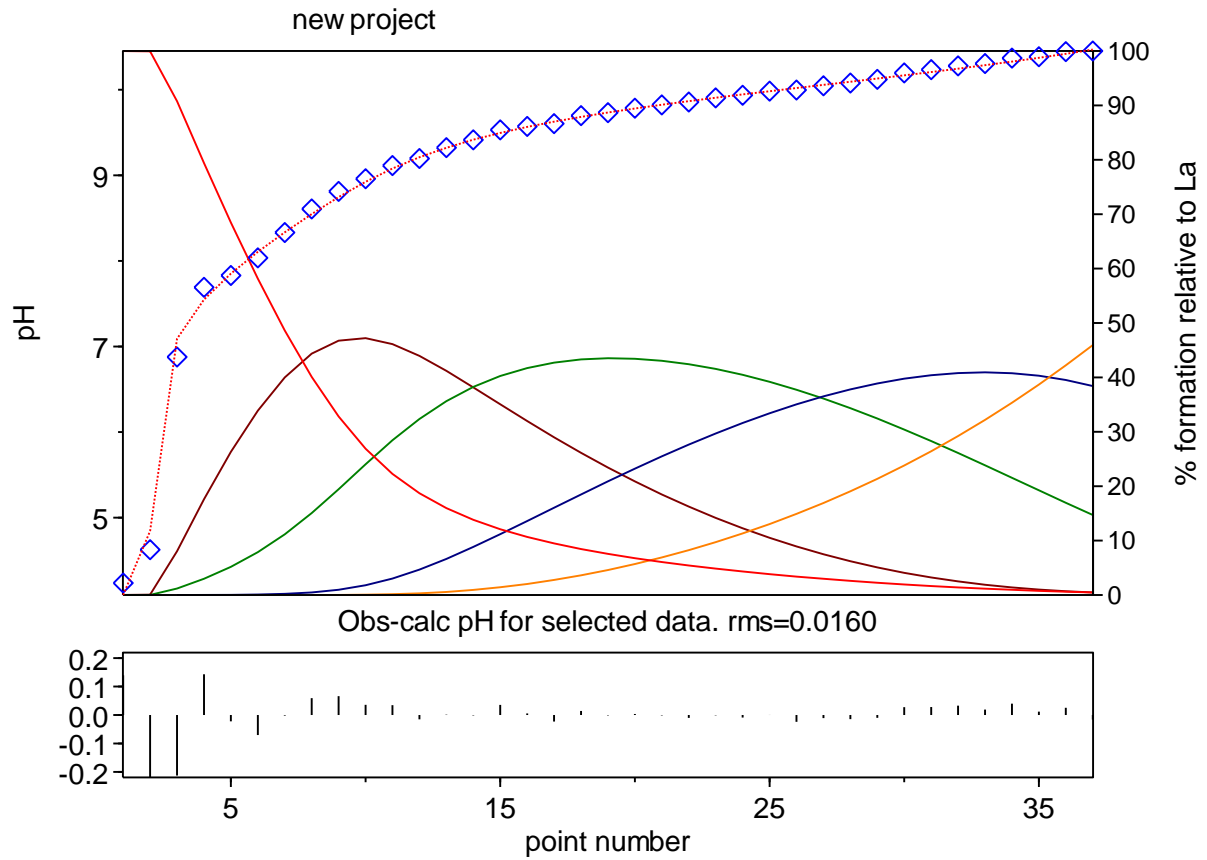


b) Ajuste por HYPERQUAD a la titulación de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en concentración de 1mM sin fuerza iónica en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

Refinement successful
 Not enough data for meaningful chi-squared

sigma = 6.6539

Beta	0	-1	constant	3.9811E-19		-18.4000	
Beta	2	-1	refined	3.9897E-06	0.1416	-5.3991	0.0615
Beta	1	-1	refined	1.0636E-09	0.0669	-8.9732	0.0291
Beta	1	-2	refined	9.4316E-20	0.0671	-19.0254	0.0291
Beta	1	-3	refined	3.8318E-30	0.0508	-29.4166	0.0221



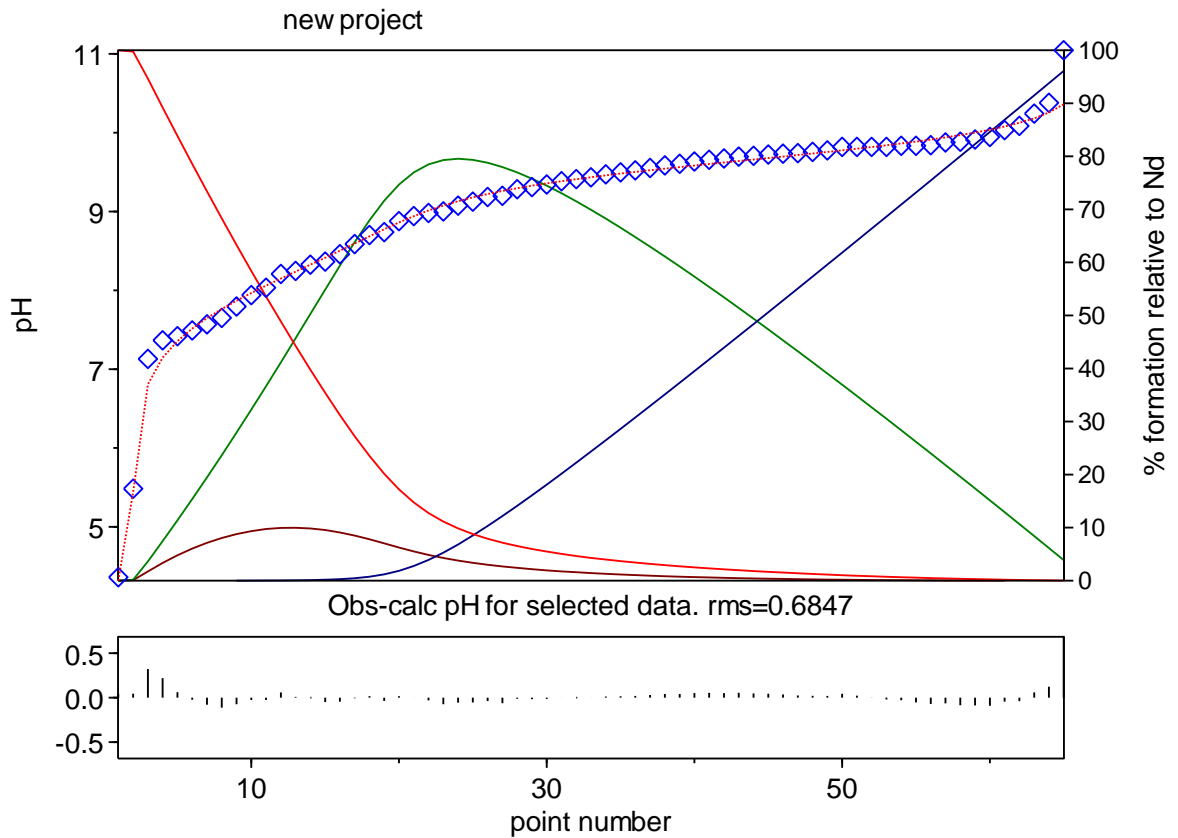
c) Ajuste por HYPERQUAD a la titulación de 1mM de $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ sin fuerza iónica en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

```

Refinement successful
Chi-squared = 17.09
Chi-squared should be less than 12.60 at the 95% confidence level

sigma = 21.1066
Beta  0 -1  constant  3.9811E-19          -18.4000
Beta  2 -1  refined   1.5078D-06   0.8127   -5.8217  excessive
Beta  1 -1  refined   5.9700E-09   0.0889   -8.2240   0.0386
Beta  1 -3  refined   2.8020E-28   0.0846  -27.5525   0.0368
Beta  1 -2  ignored

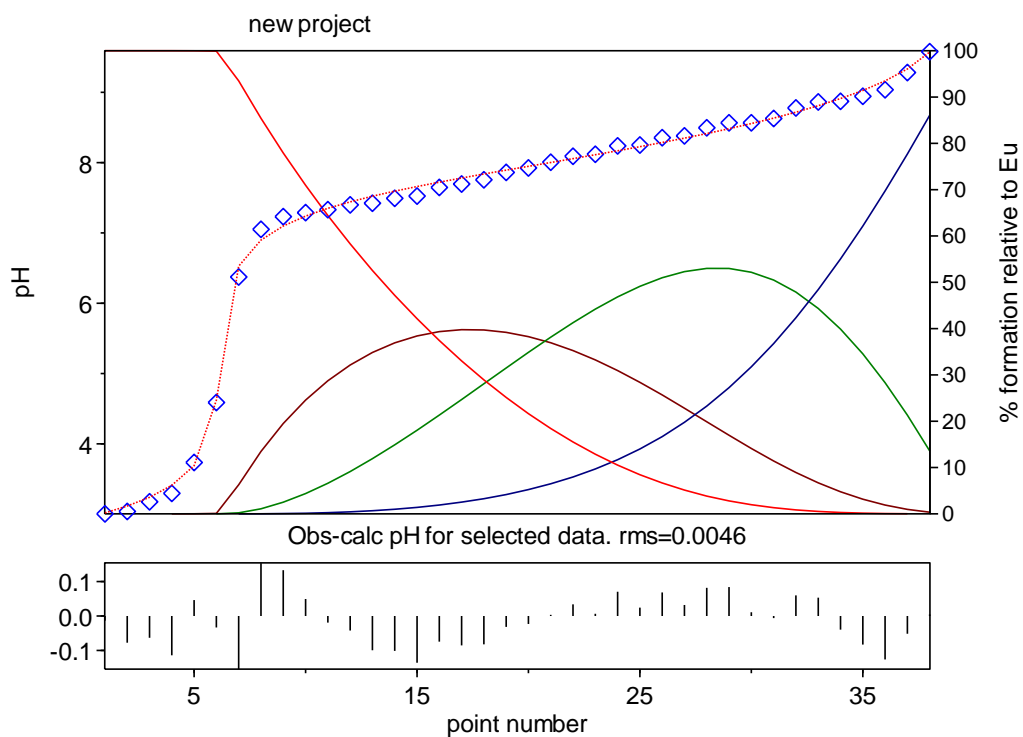
```



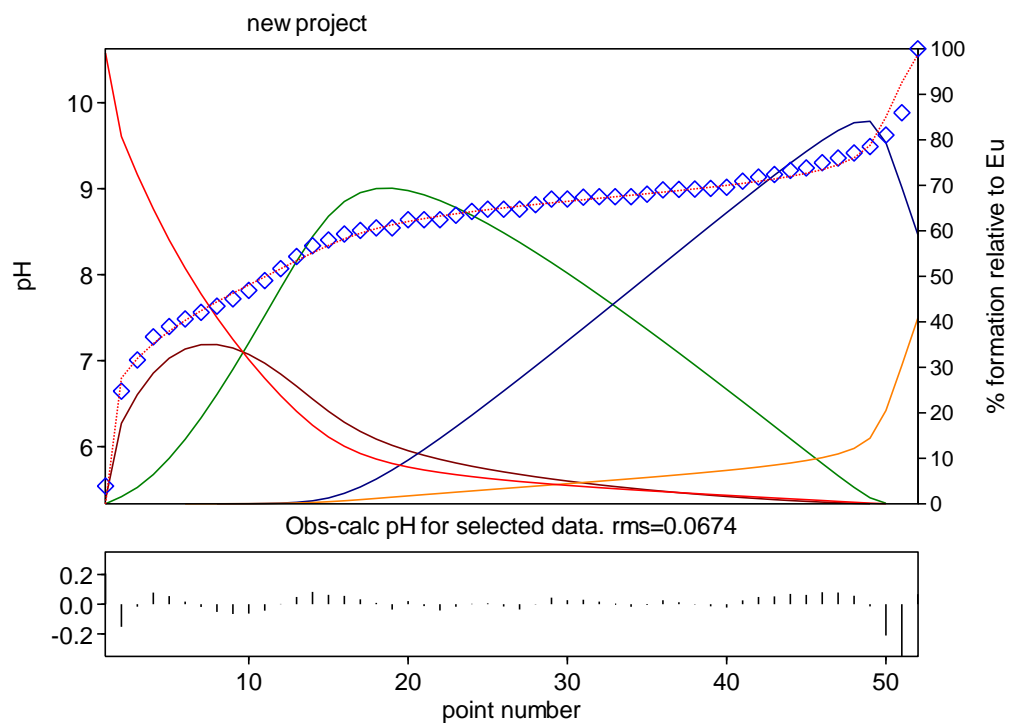
d) Ajuste por HYPERQUAD a la titulación de 1mM de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ sin fuerza iónica en DMSO al 80% v/v a 25 °C.

sigma = 12.3842

Beta	0	-1	constant	3.1623E-19		-18.5000	
Beta	1	-1	refined	1.9924E-08	0.1024	-7.7006	0.0445
Beta	1	-2	refined	2.0454E-16	0.1085	-15.6892	0.0471
Beta	1	-3	refined	3.4595E-25	0.0911	-24.4610	0.0396



e) Ajuste por HYPERQUAD a la titulación de 1mM de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ sin fuerza iónica en DMSO al 80% v/v a 25 °C.



3) Anexo 3. Ajustes de las titulaciones potenciométricas de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ en presencia de Me_4NOH en DMSO al 80 % v/v a 25 °C.

Tabla A) Parámetros de ajuste obtenidos por Hyperquad mediante el modelo que envuelve las reacciones (I)-(IV).

	[Eu], mM	sigma	chi2	$\log\beta_{\text{pa}}$			
				2-1	1-1	1-2	1-3
1	0.5	12.76		- ^b	-8.08	-16.99	-25.97
2	0.75	17.26	19.38	-5.19	-8.20	-17.83	-27.20
3	1.0	15.25		-4.03	-8.53	-17.27	-26.83
4	1.0	10.98	10.51	-4.99	-9.03	- ^b	-26.70
5	1.0	22.55		-4.80	- ^b	-18.02	-27.40
6 ^a	1.0	11.59	10.15	-4.69	-7.95	-17.74	-25.84
7 ^a	1.0	25.94	22.82	-6.08	-7.95	-17.10	-26.00
8 ^a	1.0	103.8	118.46	- ^b	-8.22	- ^b	-26.14
9	1.25	106.6	111.34	-5.0	-8.5	- ^b	-26.03
10	1.5	68.78	12.4	-5.06	-9.42	- ^b	-24.66
Promedio				-5.0±0.2	-8.4±0.2	-17.5±0.2	-26.3±0.3

^a Titulaciones en presencia de 0.01M $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$.

^b Constantes de equilibrio negativas se obtuvieron durante las iteraciones.

Tabla B. Parámetros de ajuste obtenidos por Hyperquad mediante el modelo que envuelve las reacciones (I), (V), (VI) y (VIII).

	[Eu], mM	sigma	chi2	$\log\beta_{\text{pa}}$			
				2-1	2-2	2-5	1-3
1	0.5	14.55		- ^b	-12.50	-38.75	- ^b
2	0.75	21.52	25.23	-5.53	-12.89	-40.99	-27.84
3	1.0	24.16		-4.51	-12.81	-40.63	-27.09
4	1.0	22.27		-4.86	-13.91	-41.64	- ^b
5	1.0	9.79	18.5	-4.66	-12.51	-39.22	-26.52
6 ^a	1.0	10.09	19.21	-5.03	-14.25	- ^b	-26.70
7 ^a	1.0	29.26	21.07	-5.00	-12.28	-39.33	-27.00
8 ^a	1.0	91.08	100.2	-5.14	-13.02	-40.90	-26.01
9	1.25	156.3	79.86	-5.3	-13.40	-40.07	-26.70
10	1.5	69.2	12.4	-5.06	-14.19	-38.94	-24.70
Promedio				-5.0±0.1	-13.2±0.2	-40.0±0.3	-26.6±0.3

^a Titulaciones en presencia de 0.01M $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$.

^b Constantes de equilibrio negativas se obtuvieron durante las iteraciones.

Simplified Speciation and Improved Phosphodiesterolytic Activity of Hydroxo Complexes of Trivalent Lanthanides in Aqueous DMSO

Irma Sánchez-Lombardo and Anatoly K. Yatsimirsky*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Received September 18, 2007

Potentiometric titrations of La(III), Nd(III), and Eu(III) perchlorates by $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% vol aq DMSO revealed formation of predominantly mononuclear complexes $\text{M}(\text{OH})_n^{3-n}$ ($n = 1, 2, \text{ or } 3$) and a single binuclear complex $\text{M}_2(\text{OH})^{5+}$. Kinetics of the cleavage of two phosphate diesters, bis (4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) and 2-hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate (HPNPP), and a triester, 4-nitrophenyl diethyl phosphate (paraoxon), were studied as a function of metal and $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ concentrations in the same medium. Rate of BNPP cleavage is second-order in metal and is proportional to the product of concentrations of $\text{M}(\text{OH})_2^+$ and $\text{M}(\text{OH})_3$ species. Rate of HPNPP cleavage is proportional to $[\text{M}(\text{OH})_3]^3$ for La(III) and Nd(III) and to $[\text{M}(\text{OH})_3]^2$ for Eu(III). Proposed mechanism for BNPP hydrolysis involves formation of $\text{M}_2(\text{OH})_5(\text{diester})$ intermediate followed by intramolecular nucleophilic attack of hydroxide anion on the phosphoryl group of the substrate. Proposed mechanism for HPNPP cleavage involves formation of $\text{M}_3(\text{OH})_9(\text{diester})^-$ or $\text{M}_2(\text{OH})_6(\text{diester})^-$ intermediates followed by the general base-assisted intramolecular cyclization of HPNPP. The latter mechanism is supported by observation of the solvent kinetic isotope effect $k_H/k_D = 2.9$ for Eu(III) catalyzed HPNPP cleavage. The efficiency of catalysis in 80% DMSO is much higher than in water. The reaction rate observed in the presence of 1 mM metal in neutral solution surpasses the rate of background hydrolysis by a factor of 10^{12} – 10^{13} for BNPP and 10^{10} for HPNPP. The increased catalytic activity is attributed principally to the preferable solvation of lanthanide ions by DMSO, which creates an anhydrous microenvironment favorable for reaction in the coordination sphere of the catalyst. The catalytic activity of lanthanides in paraoxon hydrolysis is much lower with the estimated efficiency of catalysis about 10^5 for 1 mM La(III).

Introduction

There is much current interest in the development of more efficient catalysts for the cleavage of phosphate esters of different types.¹ Recently significant attention has been attracted to study of phosphodiesterolytic activity of metal ions in nonaqueous media, mainly anhydrous methanol, as a way to improve the catalytic performance. Greatly enhanced catalytic activity in this solvent, as compared to that observed in water, was reported for trivalent lanthanides² and Zn(II)

ions and complexes.³ Also, alkali metal ions lacking catalytic activity in water show significant catalytic effects in anhydrous methanol.⁴ A binuclear Cu(II) complex was reported to have sufficient reactivity even for the cleavage of nonactivated dimethyl phosphate substrate in this solvent.⁵ In addition, strongly enhanced reactivity was reported in some aprotic solvents: in acetonitrile with Zn(II) and Cu(II) ions⁶ and in DMF with a macrocyclic Zn(II) complex bearing an alcohol pendant.⁷

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: anatoli@servidor.unam.mx. Phone: 55 5622 3813. Fax: 55 5616 2010.

(1) (a) Recent reviews: Mancin, F.; Tecilla, P. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 800. (b) Yatsimirsky, A. K. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1997. (c) Morrow, J. R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 192. (d) Morales-Rojas, H.; Moss, R. A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2497. (e) Liu, C. L.; Wang, M.; Zhang, T. L.; Sun, H. Z. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 147. (f) Williams, N. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *279*, 1697. (g) Molenveld, P.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *75*, 29. (h) Kramer, R. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *182*, 243. (i) Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485.

(2) (a) Neverov, A. V.; Brown, R. S. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3588. (b) Tsang, J. S. W.; Neverov, A. V.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1559. (c) Tsang, J. S. W.; Neverov, A. V.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7602. (3) Neverov, A. A.; Lu, Z.-L.; Maxwell, C. I.; Mohamed, M. F.; White, C. J.; Tsang, J. S. W.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16398. (4) (a) Pregel, M. J.; Dunn, E. J.; Nagelkerke, R.; Thatcher, G. R. J.; Buncel, E. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 449. (b) Buncel, E.; Albright, K.; Onyido, I. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 601. (c) Onyido, I.; Albright, K.; Buncel, E. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1468. (5) Jagoda, M.; Warzeska, S.; Pritzkow, H.; Wadepohl, H.; Imhof, P.; Smith, J. C.; Kršmer, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15061.

The results for most thoroughly studied lanthanide and Zn(II) based systems for catalytic methanolysis of phosphate esters and related substrates in anhydrous methanol clearly show the advantages of this solvent.⁸ First, metal methoxides are soluble in methanol, in contrast to hydroxides, which are insoluble in water. This resolves the problem of concomitant metal precipitation in sufficiently basic solutions required for formation of active species. Second, reduced polarity of this solvent promotes much stronger association of the substrates with metal ions and so enhances the catalytic activity. Third, one may obtain detailed speciation for metal alkoxides in methanol by using precise potentiometric pH titrations with an appropriately calibrated glass electrode and so to identify the reactive species.

We are focusing on the use of mixed aqueous–organic solvents, in particular water–DMSO mixtures, as media for catalytic phosphate ester hydrolysis. At first glance, addition of DMSO should not be favorable for catalysis because this solvent stabilizes metal ions even stronger than water.⁹ However, we found that phosphodiesterolytic activity of alkali¹⁰ and alkaline earth¹¹ cations strongly increased in mixtures containing more than 80% vol DMSO. The development of improved catalytic systems in aqueous–organic mixtures is of interest because these media may be more suitable for practical applications than anhydrous organic solvents. In addition, these systems still use the hydroxide nucleophile bringing about hydrolysis rather than transesterification of the substrate. Therefore, we extended this study to trivalent lanthanides, which are among the most active catalysts for the hydrolysis of phosphate esters in water.¹²

The positive effect of DMSO can be attributed to several factors. The reactivity of anionic nucleophiles, including hydroxide, is strongly enhanced in dipolar aprotic solvents.¹³ This effect is due to the removal of hydrogen-bound water molecules from anionic species, which increases their free energies and the availability of lone electron pairs. Apparently this effect can also increase the association of negatively charged phosphodiester with metal ions. It seems that the preferable solvation of metal ions by DMSO in the mixed solvent also contributes to improved catalytic activity because metal-bound hydroxide and phosphodiester anions appear surrounded by only DMSO molecules in a medium, which still contains a significant amount of water.

There are only rather limited data on metal ion hydrolysis in DMSO–water mixtures. The results of a detailed study of Be(II) hydrolysis in 80% DMSO point however to some interesting features of the system.¹⁴ While the hydrolysis in water leads to predominantly polynuclear species, in the presence of DMSO, the abundance of mononuclear complexes increase greatly because of stronger solvating power of DMSO molecules. Thus one may expect that addition of DMSO may significantly simplify an extremely complicated pattern of lanthanides hydrolysis in water.¹⁵ Another interesting result is that the first $pK_a = 5.25$ of Be(II) in 80% DMSO essentially coincides with that in water, $pK_a = 5.4$. This means that the formation of hydroxo complexes starts in the same pH range both in pure water and 80% DMSO, but because the autoprotolysis constant in this solvent is strongly reduced ($pK_w = 18.4$ in 80% DMSO),¹⁶ the concentration of free hydroxide ions at the same pH will be much smaller and the precipitation of metal hydroxide will occur at a higher metal concentration. This may solve the mentioned above problem of metal precipitation although in a different way than in methanol. The results of this paper show that the behavior of lanthanides in DMSO–water indeed meets these expectations and, in addition, using this medium allows one to increase greatly the observed catalytic activity.

Experimental Section

Materials. Bis(4-nitrophenyl) phosphate (Aldrich) was recrystallized from ethanol–water. Paraoxon (Aldrich) was used as supplied. 2-Hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate was prepared according to the literature procedure.¹⁷ Sodium perchlorate, reagent grade lanthanide(III) perchlorates as 40 wt % aqueous solutions, and $Me_4N(OH) \cdot 5H_2O$, all from Aldrich, were used as supplied. The concentration of metal ions in stock solutions was determined by titration with EDTA with Xylenol Orange as indicator. Distilled and deionized water (Barnstead Nanopure system) was used. DMSO (Baker) was purified by distillation over CaO.

Potentiometry. Potentiometric titrations were performed in a 30-mL thermostatted cell kept under nitrogen at 25 ± 0.1 °C. Measurements of pH were carried out using an Orion model 710-A research digital pH meter while the titrant (Me_4NOH) solution was added to the system in small increments. The electrode was calibrated in terms of $p[H^+]$ by titrations of 1E8 mM $HClO_4$ as described in ref 18. From these data, the autoprotolysis constant $pK_w = 18.5 \pm 0.1$ was determined in good agreement with published values.¹⁶ The program HYPERQUAD 2003, version 3.0.51,¹⁹ was used to calculate all equilibrium constants. Species distribution diagrams were calculated by using HYSS 2003 software.^{19b}

- (6) Kondo, S.; Yoshida, K.; Yano, Y. *J. Chem. Res. Synop.* **1999**, 106.
- (7) Kimura, E.; Kodama, Y.; Koike, T.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8304.
- (8) Brown, R. S.; Neverov, A. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 1039.
- (9) Kalidas, C.; Hefter, G.; Marcus, Y. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 819.
- (10) G-mež-Tagle, P.; Vargas-Zoeiga, I.; Taran, O.; Yatsimirsky, A. K. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9713.
- (11) Taran, O.; Yatsimirsky, A. K. *Chem. Commun.* **2004**, 1228.
- (12) (a) Reviews on lanthanide catalysis: Lim, S.; Franklin, S. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2184. (b) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 40: The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems*; Sigel, A., Sigel, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2003; Vol. 40, p 369. (c) Franklin, S. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 201. (d) Komiyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H. *Chem. Commun.* **1999**, 1443. (e) Blasko, A.; Bruce, T. C. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 475.
- (13) (a) Parker, A. J. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 1. (b) Buncel, E.; Wilson, H. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1977**, *4*, 133.

- (14) China, E.; Dominguez, S.; Mederos, A.; Brito, F.; Sanchez, A.; Ienco, A.; Vacca, A. *Main Group Met. Chem.* **1997**, *20*, 11.
- (15) (a) Baes, C. F. Jr.; Mesmer, R.E. *The Hydrolysis of Cations*; Wiley: New York, 1976. (b) Rizkalla, E. N.; Choppin, G. R. In *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*; Gschneider, K. A., Jr., Eyring, L., Eds.; Elsevier Science: New York, 1991; Vol. 15, 393.
- (16) (a) Baughman, E. H.; Kreevoy, M. M. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 421. (b) Georgieva, M.; Velinov, G.; Budevsky, O. *Anal. Chim. Acta* **1977**, *90*, 83.
- (17) Brown, D. M.; Usher, D. A. *J. Chem. Soc.* **1965**, 6558.
- (18) G-mež-Tagle, P.; Yatsimirsky, A. K. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3786.
- (19) (a) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739. (b) Alderlghi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311.

With each cation, at least three independent titrations were performed with 0.5–2.0 mM $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ solutions. In more concentrated solutions, the metal hydroxide precipitated in the course of titration. The time required to obtain a stable pH reading increased from 20 to 30 s in acid medium to ca. 5 min at pH above 7. Equal reproducibility and stability of pH readings was observed in titration experiments with background electrolyte (10 mM NaClO_4) and without it. The calibration plots of experimental pH readings vs $\text{p}[\text{H}^+]$ were linear in both media in the range 2.5–11.6, with the only difference that the plot obtained in the presence of 10 mM NaClO_4 was shifted by 0.14 units to lower pH values. Equations for calibration plots were $\text{pH} = a + b\text{p}[\text{H}^+]$ with parameters $a = (1.054 \pm 0.021)$, $b = (0.994 \pm 0.002)$, $R = 0.99994$ in the presence of 10 mM NaClO_4 and $a = (0.903 \pm 0.016)$, $b = (0.999 \pm 0.002)$, $R = 0.99997$ in the absence of added electrolyte. The $\text{p}K_{\text{w}}$ values determined in both media coincided in limits of experimental errors. A possible variation in activity coefficients of hydrogen ions during titration in the absence of the background electrolyte should be insignificant because the total concentration of anions is kept constant during the titration. Because stock solutions of $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% DMSO turned yellow after several hours, the aqueous stock solutions of the base were employed and the corresponding amounts of pure DMSO were added to the titration cell after each addition of the titrant to keep the content of DMSO constant.

Spectrophotometry. Spectrophotometric titrations of Nd(III) by $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ were performed with 1–1.5 mM solutions of $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ in 80% DMSO containing 0.1 mM HClO_4 . Spectra were recorded on a Unicam UV500 spectrometer, and the cuvette path length was 5 cm.

Kinetics. Kinetic measurements were performed on a Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer equipped with a thermostatted cell compartment (recirculating water bath at 25 ± 0.1 °C). Reaction solutions were prepared by combining appropriate amounts of metal and tetramethylammonium hydroxide stock solutions to the desired volume. Reactions were initiated by adding an aliquot of the substrate solution.

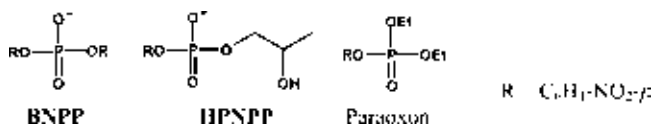
The course of hydrolysis for all substrates was monitored spectrophotometrically by the appearance of 4-nitrophenolate anion at 420 nm. Stock solutions of BNPP and HPNPP were freshly prepared in water. Stock solutions of paraoxon were prepared in DMSO. First-order conditions with base concentrations (0.5–5 mM) at least 50 times greater than the substrate concentration (0.01 mM) were used. Because deprotonation of 4-nitrophenol at lower base concentrations was incomplete, a standard addition of 0.01 mM 4-nitrophenol was applied to each sample after the end of the reaction run to determine the apparent molar absorptivity under given conditions. The observed first-order rate constants (k_{obs}) were calculated by the integral method from at least 90% conversion or, for slow reactions, from initial rates. Rate constants larger than 0.1 s^{-1} (mainly with HPNPP as a substrate) were determined using an Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow reaction analyzer thermostatted at 25.0 °C.

NMR Spectroscopy. ^{31}P NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 300 NMR spectrometer.

Results and Discussion

Model substrates employed for kinetic studies in this paper are two diesters, bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP, a model for DNA hydrolysis), 2-hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate (HPNPP, a model for RNA hydrolysis), and a triester, 4-nitrophenyl diethyl phosphate (Paraoxon), Chart 1.

Chart 1



In preliminary experiments, the rate of BNPP hydrolysis was measured in the presence of 1 mM $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ and 1.5–2.5 mM $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in water–DMSO mixtures of different compositions. The observed rate constants gradually increased on increase in the DMSO content up to 80% vol but became lower again in 90% DMSO. Rate constants in 80% DMSO were ca. 2 orders of magnitude higher than those in pure water. The system stability was sufficiently high. Thus, the incubation of 1 mM $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ with 2.0 mM $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% DMSO during 90 min did not cause any change in the catalytic activity. On basis of these experiments, 80% vol DMSO was chosen as an optimum medium for further studies.

Composition and Stability of Hydroxo Complexes. The speciation of hydroxo complexes was determined by pH-potentiometric titrations. The 80% of DMSO is sometimes considered as a maximum amount of the organic cosolvent that allows one to obtain reliable pH readings,²⁰ although reproducible measurements with commercial electrodes were reported in nearly pure and even pure DMSO.²¹ In our case, calibration plots were stable and linear in a wide range of pH (defined as $-\log[\text{H}^+]$) and $\text{p}K_{\text{w}}$ calculated from the results of titration of a strong acid coincided with the reported $\text{p}K_{\text{w}}$ values in the same medium (see the Experimental Section). To ensure a complete absence of metal hydroxo species at the beginning of titration, a small exact amount of HClO_4 (0.3–1 mM) was added before titration in each experiment. Titration of this excess of the strong acid served also to check the stability of the electrode calibration.

Typical titration curves for 1 mM lanthanides are shown in Figure 1 (points corresponding to titration of the excess HClO_4 below pH 5 are eliminated). For smaller and more acid Eu(III) and Nd(III) cations, titrations were possible up to the molar ratio metal ion:hydroxide = 1:3, but for La(III), which was titrated at higher pH values, the maximum attainable ratio was 1:2.5, after which the metal hydroxide started to precipitate. The results of titration experiments were fitted to the set of eq 1 for the formation of hydroxo complexes (the standard p,q,r notation with negative q values for deprotonation equilibria was employed), and the best fit was obtained for a reaction model involving successive formation of mononuclear species $\text{Ln}(\text{OH})_n^{3-n}$ with n ranging from 1 to 3 plus one binuclear complex of the composition $\text{Ln}_2(\text{OH})^{5+}$. Fitting to a reaction model involving only binuclear complexes $\text{Ln}_2(\text{OH})_n^{6-n}$ was statistically poorer

(20) Khoo, K. H. *J. Chem. Soc. A* **1971**, 2932.

(21) (a) Ballash, N. M.; Robertson, E. B.; Sokolowski, M. D. *Trans. Faraday Soc.* **1970**, *66*, 2622. (b) Fiordiponti, P.; Rallo, F.; Rodante, F. *Z. Phys. Chem.* **1974**, *88*, 149. (c) Ritchie, C. D.; Uschold, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1721.

(22) Klungness, G. D.; Byrne, R. H. *Polyhedron* **2000**, *19*, 99.

(23) Kragten, J.; Decnop-Weever, L. G. *Talanta*, **1984**, *9*, 731.

(24) Plancque, G.; Moulin, V.; Toulhoat, P.; Moulin, C. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478*, 11.

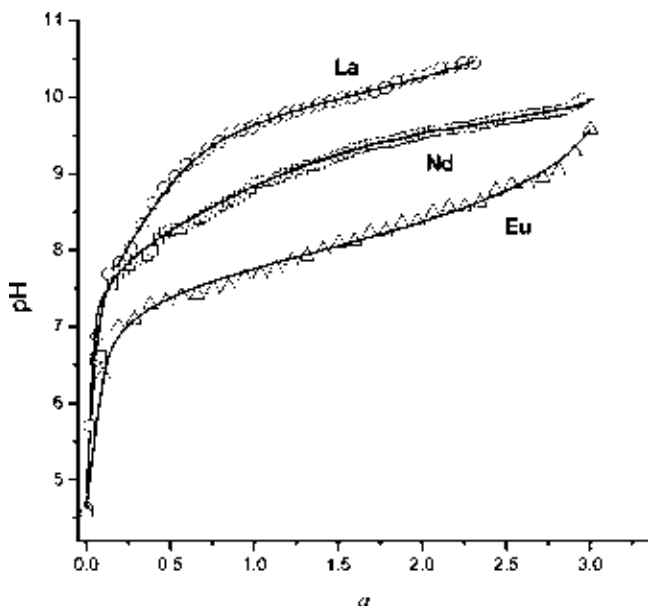


Figure 1. Titration curves for 1 mM lanthanide perchlorates with 0.1 M $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% vol DMSO; α is the number of moles of the base added per 1 mol of the metal ion. Solid lines are the fitting curves generated by HYPERQUAD in accordance with equilibrium constants given in Table 1.

than that for a model with mononuclear complexes (see Table 1S in Supporting Information), and with models involving both mono- and binuclear species only, inclusion of the complex $\text{Ln}_2(\text{OH})^{5+}$ led to a statistically significant improvement of the fitting quality. It should be noted, however, that just a statistical criterion is obviously insufficient for a definite discrimination between reaction schemes with mono- or binuclear species in a system with three or more species with overlapping distribution ranges and, in fact, coexistence of species of different nuclearities cannot be excluded. Unfortunately, our attempts to prove the chosen speciation scheme by alternative techniques were unsuccessful (see below).

Because addition of NaClO_4 caused unexpectedly strong inhibitory effect on the catalytic hydrolysis (see below), two sets of titration experiments were performed: one in the presence of 10 mM NaClO_4 and another one in the absence of added electrolyte (see Experimental Section for details of both procedures). The respective hydrolysis constants defined as in eq 2 are given in Table 1. The results of all titration experiments are given in Table 1S (Supporting Information). In addition, Table 2S in the Supporting Information provides mean values of the hydrolysis constants obtained by joint fitting of all titration plots for each cation and respective sigma values calculated by Hyperquad.



$$\beta_{pq} = [\text{Ln}_p(\text{OH})_q^{3p-q}] / [\text{Ln}^{3+}]^p [\text{H}^+]^q \quad (2)$$

We attempted to support the speciation scheme derived from potentiometric results by conductometric titrations and FAB experiments, but both techniques gave inconclusive results. More informative were results of the spectrophotometric titration of Nd(III). We chose Nd(III) for spectroscopic studies because this cation possesses a so-called hypersensi-

tive absorption band in the range 570–595 nm, which undergoes relatively strong changes on coordination with different donor atoms.^{25,27} Figure 2A shows the spectral course of titration in the hypersensitive region. The absorbance in the maximum at 582 nm initially increases, but then monotonically goes down, Figure 2B. The maximum in absorbance corresponds to the molar ratio $[\text{OH}^-]/[\text{Nd}(\text{III})] = 1:2$, and its observation is indicative of formation of $\text{Nd}_2(\text{OH})^{5+}$ complex. A smaller and opposite change in absorbance is observed at 575 nm. The concentration profile of the absorbance at this wavelength, Figure 2B, shows an inflection above the molar ratio 0.5, again in agreement with formation of $\text{Nd}_2(\text{OH})^{5+}$ complex. Both profiles generally agree with the speciation scheme derived from potentiometric data. The solid lines in Figure 2B are the theoretical profiles calculated by summation of contributions of all $\text{Nd}_p(\text{OH})_q^{3p-q}$ species to the observed molar absorptivity as $\epsilon_{\text{obs}} = \sum \epsilon_i f_i$ where f_i are the molar fractions of the complexes calculated with hydrolysis constants given in Table 1 and ϵ_i are the respective molar absorptivities. The molar absorptivities of Nd^{3+} and $\text{Nd}(\text{OH})_3$ were taken from initial and final spectra, respectively, and molar absorptivities of intermediate hydroxo complexes were estimated by a multiple regression of the polynomial expression for ϵ_{obs} .

In aqueous solutions, the substitution of coordinated water molecules by different donor atoms usually leads to increase in the oscillator strength (f) of the hypersensitive band calculated by integration of the absorption band.^{25,26,28} This effect is not observed in 80% DMSO, where hydroxide ions substitute coordinated DMSO molecules: spectral changes shown in Figure 2A are accompanied by a very small and irregular changes in f in limits of 5%.

The principal effect of added NaClO_4 is the disappearance of dihydroxo species $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$, apparently because of the shift in the disproportionation equilibrium (eq 3) toward the mixture of mono and trihydroxo complexes.



In fact, these species hardly disappear completely. The equilibrium constant K_{disp} for the reaction (3) can be estimated from β_{pq} values given in Table 1 as $K_{\text{disp}} = \beta_{1E}\beta_{1E} / (\beta_{1E})^2 = 0.5$ for La(III) and 4 for Eu(III) in the absence of added sodium perchlorate. Under these conditions, the fraction of $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ species reaches as a maximum 30–40% of total metal. An increase in K_{disp} by, e.g., 1 order of magnitude, which may result from a stronger ion pairing of the dicationic species than the monocationic species with perchlorate, may reduce the fraction of dihydroxo complexes

(25) Henrie, D. E.; Fellows, R. L.; Choppin, R. G. *Coord. Chem. Rev.* **1976**, *18*, 199.

(26) (a) Stephens, E. M.; Schoene, K.; Richardson, F. S. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1641. (b) Stephens, E. M.; Davis, S.; Reid, M. F.; Richardson, F. S. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4607.

(27) (a) Hancock, R. D.; Jackson, G.; Evers, A. J. *Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, 1384. (b) Birnbaum, E. R.; Darnall, D. W. *Bioinorg. Chem.* **1973**, *3*, 15.

(28) Yang, W.; Gao, J.; Kang, J.; Yang, W. *J. Solution Chem.* **1997**, *26*, 105.

Table 1. Hydrolysis Constants of Trivalent Lanthanides in 80% vol DMSO at 25 °C^a

species	log β_{pq}							
	[NaClO ₄] = 0			[NaClO ₄] = 10 mM		in water		
	La(III)	Nd(III)	Eu(III)	La(III)	Eu(III)	La(III)	Nd(III)	Eu(III)
Ln₂(OH)⁵⁺	-5.7 ± 0.2	-5.5 ± 0.1		-5.65 ± 0.09	-4.9 ± 0.1			
Ln(OH)²⁺	-9.1 ± 0.1	-8.5 ± 0.1	-7.6 ± 0.1	-8.59 ± 0.09	-8.21 ± 0.03	-8.81 ^b	-8.18 ^b	-7.76 ^b
Ln(OH)₂⁺	-19.18 ± 0.09	-17.9 ± 0.3	-15.8 ± 0.2				-16.2 ^c	-14.9 ^d
Ln(OH)₃	-29.55 ± 0.07	-27.64 ± 0.06	-24.2 ± 0.2	-28.4 ± 0.2	-25.1 ± 0.3		-24.3 ^c	-24.1 ^d

^a The mean values of log β_{pq} are given with standard errors calculated by averaging of β values obtained in at least three independent titration experiments. Errors in log β_{pq} values as fitting parameters in each titration experiment were less than 0.05. ^b Ref 22 at $I = 0$. ^c Ref 23 at $I = 1$. ^d Ref 24 at $I = 0$.

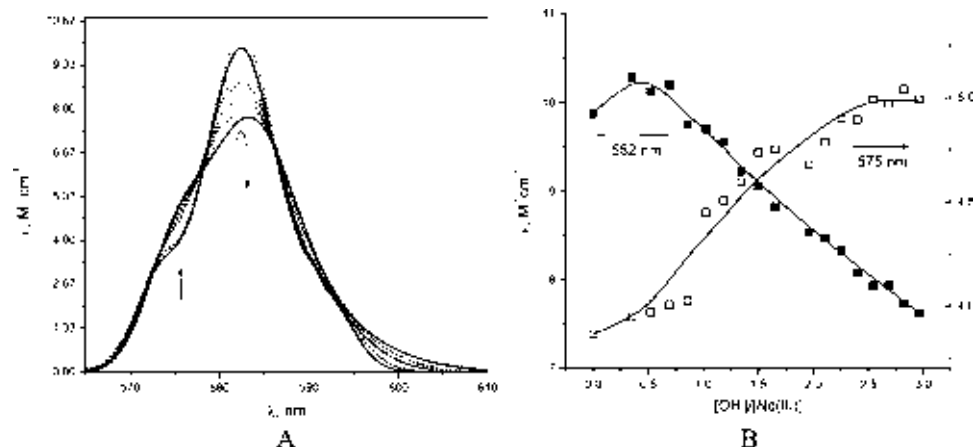


Figure 2. (A) Absorption spectra of 1.5 mM Nd(III) perchlorate in the hypersensitive region at increased amounts of added Me₄N(OH) in 80% vol DMSO. Arrows show the direction of spectral changes on increased concentration of hydroxide. Solid lines are the initial and final spectra. (B) Plots of molar absorptance at 582 nm (solid squares, left scale) and at 575 nm (open squares, right scale) vs molar ratio of added hydroxide to metal ion. Solid lines are simulated profiles calculated with potentiometrically determined hydrolysis constants (see the text).

below 3% of total metal, and so these species may be easily overlooked in the titration experiment.

For comparison, Table 1 lists also the available β_{pq} values in water, which are remarkably close to those in 80% DMSO. On the other hand, considering formation of hydroxo complexes as an association process, reaction 4, one observes a very strong difference between formation constants in water and in 80% DMSO. The K_{OH} constants are related to β_{1H1} in accordance with eq 5, where K_W is the autoprotolysis constant.



$$\log K_{OH} = \text{p}K_W - \text{p}K_a = \text{p}K_W + \log \beta_{1H1} \quad (5)$$

Obviously, if $\text{p}K_W$ increases from 14 in water to 18.5 in 80% DMSO, but log β_{1H1} values remain practically the same, this means that log K_{OH} will increase by 4.5 units on going from water to the mixed solvent. Thus, if in water log K_{OH} values are in the range 5.2–6.2, in 80% DMSO, they are in the range 9.3–10.9, and this allows formation of significant amounts of hydroxo complexes already in neutral solutions (pH of neutrality in 80% DMSO is 9.25). This effect can be attributed to the well-known phenomenon of destabilization of anions in dipolar aprotic solvents, the same as that responsible for increased reactivity of anionic nucleophiles.¹³

In contrast to hydrolysis of lanthanide cations in water, dominated by formation of polynuclear hydroxo species of irreproducible and practically unidentifiable composition followed by precipitation of metal hydroxides from milli-

molar metal solutions already at pH close to 8, hydrolysis in 80% DMSO is a much more simple process dominated by formation of mononuclear complexes. The reason for this is stronger solvation of cations by DMSO than by water, reflected in large negative transfer free energies of cations from water to DMSO⁹ and strong preferable solvation of lanthanides by DMSO in mixtures with water.³³ Apparently, this strong solvation induces depolymerization of polynuclear species. At the same time, transfer free energies of anions to DMSO are also large but positive,²⁹ reflecting more weak solvation of anions in DMSO, and these weakly solvated anions successfully compete with DMSO molecules for the coordination spheres of metal ions forming complexes of even higher stability than that in water.

Kinetics of Phosphate Ester Hydrolyses. The alkaline hydrolysis of both phosphodiester and phosphotriester is accelerated by addition of DMSO to water, but in 80% vol of DMSO, which is still a rather aqueous medium (molar fraction of water is 50%), the effect is very modest.¹⁰ We found the second-order rate constant for the alkaline hydrolysis of BNPP in this medium to be practically the same as in water, see Table 3. The rate constants for HPNPP and paraoxon (see Table 3) are, respectively, 3.5 and 10 times larger than those in water.

The rate of catalytic hydrolysis appeared to be very sensitive to the presence of neutral electrolytes, Table 2. Already, addition of 1 mM NaClO₄ reduces the rate by 50%

(29) Cox, B. G.; Parker, A. J.; Waghorne, W. E. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 1731.

Table 2. Salt Effects on the Rate of BNPP Hydrolysis in the Presence of 1 mM La(III) and 2 mM Me₄NOH in 80% DMSO

La(III) salt	added salt	k_{obs} , s ⁻¹
La(ClO ₄) ₃	none	0.058
	1 mM NaClO ₄	0.027
	5 mM NaClO ₄	0.018
	10 mM NaClO ₄	0.012
	10 mM NaNO ₃	0.0050
	10 mM NaCl	0.0040
La(Tb) ₃	none	0.037

and 10 mM salt causes a 5-fold inhibition. Nitrate and chloride salts cause a 10-fold rate reduction. The catalytic activity of La(III) triβate (last line in Table 2) is a little bit lower than that of perchlorate.

A possible reason for these effects is the ion pairing of anions with cationic species, which may change the distribution of active species and/or block the interaction with anionic substrate. In the case of NaClO₄, we observed a significant decrease in the fraction of Ln(OH)₂⁺ complexes (see above), which, as will be shown below, are the active species in BNPP hydrolysis.

In line with these observations, buffer components also caused a significant inhibitory effect. Figure 4 shows the observed first-order rate constants for BNPP hydrolysis in the presence of 1 mM Eu(ClO₄)₃ in 80% DMSO measured at increasing concentrations of TRIS added as a free base to the solution containing also 1 mM HClO₄. Like in unbuffered solutions (see below), the reaction rate passes through a maximum on increase in the base concentration, but the k_{obs} value at the optimum base concentration is 5 times smaller than the maximum k_{obs} value observed with Me₄N(OH) as a base (see Figure 3).

On the basis of these preliminary results, we chose for the kinetic studies unbuffered solutions containing 0.50 mM metal perchlorate and up to 5 mM tetramethylammonium hydroxide as a base, for which the speciation of metal hydroxo complexes was established by potentiometric titrations in the same concentration range of components.

Parts A and B of Figure 4 show the observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP and HPNPP in the presence of 1 mM La(ClO₄)₃ at variable concentration of added Me₄N(OH) superimposed with the species distribution diagram.

An inspection of these profiles shows that both of them do not follow exactly the distribution curve for any single hydroxo complex. Obviously lower hydroxo complexes La₂(OH)⁵⁺ and La(OH)₂⁺ do not contribute to the reactivity. The BNPP hydrolysis apparently can be attributed to the catalysis by a combination of La(OH)₂⁺ and La(OH)₃ species, and the cleavage of HPNPP proceeds with participation of the highest hydroxo complex only.

Additional information was obtained by studying the effect of variable metal ion concentration under conditions of a constant [La(III)]:[OH⁻] ratio. Figure 5 illustrates in logarithmic coordinates such dependence obtained at the constant ratio [La(III)]:[OH⁻] = 1:2. Species distribution calculations show that although La(OH)₂⁺, La(OH)₂⁺, and La(OH)₃ all coexist under these conditions contributing 24%, 39%, and

32% to total La(III), respectively, their relative abundances remain practically constant on variation in total concentrations in employed limits. Therefore, the concentration of each species is a linear function of total concentration and the slope of such plot gives one the reaction order in the active species. Slopes of the lines in Figure 5 equal 4.2 ± 0.2 for HPNPP and 2.5 ± 0.4 for BNPP.

Combining results of both series of experiments, one concludes that for BNPP hydrolysis, the most probable rate law involves the product of concentrations of La(OH)₂⁺ and La(OH)₃ in the form of eq 6. This explains why a maximum is observed in Figure 4A and is consistent with the second-order kinetics in La(III), which follows from results in Figure 5. For HPNPP, the only active species is La(OH)₃ and the rate law involves its concentration in a high degree, probably up to 4. In parts A and B of Figure 6, results from both series of experiments for each substrate are analyzed in terms of these suppositions. For BNPP, one observes in agreement with eq 6 a satisfactory linear correlation between k_{obs} and the product [La(OH)₂⁺][La(OH)₃] (Figure 6A) with the slope $k_3 = (4.3 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$. For HPNPP, correlation between k_{obs} and [La(OH)₃] taken from all data, Figure 6B, shows the third-order in metal kinetics, eq 7, with $k_4 = (2.5 \pm 0.6) \times 10^{10} \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{Ln}(\text{OH})_2][\text{Ln}(\text{OH})_3] \quad (6)$$

$$k_{\text{obs}} = k_4[\text{Ln}(\text{OH})_3]^3 \quad (7)$$

Similar kinetics was observed with Nd(III). Parts A and B of Figure 7 show the profiles of k_{obs} vs concentration of added Me₄N(OH), which have the same characteristics as those with La(III). Slopes of the plots of log k_{obs} vs log[Nd(III)], obtained at the constant ratio [Nd(III)]:[OH⁻] = 1:2 (Figure S1, Supporting Information), equal 2.3 ± 0.2 for BNPP and 3.4 ± 0.2 for HPNPP. Analysis of all data (see Figure S2A,B, Supporting Information) confirms the validity of eqs 6 and 7 also for Nd(III) with rate constants given in Table 3.

Behavior of Eu(III) was qualitatively similar, but the reaction kinetics was of a lower order. As one can see from Figure 8A, the rate constants for BNPP hydrolysis roughly follow the concentration of a single species Eu(OH)₂⁺. The slope of the plot of log k_{obs} vs log[Eu(III)] obtained at the constant ratio [Eu(III)]:[OH⁻] = 1:2 (Figure S3, Supporting Information) equals 1.00 ± 0.05 for BNPP, and when we analyze together all data, both from variation in hydroxide and in metal, k_{obs} values show somewhat scattered, but generally acceptable linear correlation with [Eu(OH)₂⁺] (Figure S4A, Supporting Information). A better fit can be obtained if an additional term proportional to the product [Eu(OH)₂⁺][Eu(OH)₃] is included so that the final rate equation takes the form of eq 8, with rate constants given in Table 3. The solid line in Figure 8A is drawn in accordance with eq 8:

$$k_{\text{obs}} = k_2[\text{Eu}(\text{OH})_2] + k_3[\text{Eu}(\text{OH})_2][\text{Eu}(\text{OH})_3] \quad (8)$$

The profile observed for HPNPP, Figure 8B, also resembles those observed with La(III) and Nd(III), but the rate

Table 3. Summary of Rate Constants for Phosphate Ester Hydrolysis by Lanthanide Cations in 80% DMSO at 25 °C

phosphate ester	$k_{\text{OH}}^a \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	rate law	rate constant ^b		
			La(III)	Nd(III)	Eu(III)
BNPP	2×10^{-5}	$k_3[\text{Ln}(\text{OH})_2^+][\text{Ln}(\text{OH})_3]$ $k_2[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]$	$(4.3 \pm 0.1) \times 10^5$	$(6.3 \pm 0.3) \times 10^5$	$(6.5 \pm 0.1) \times 10^4$ 21.2 ± 0.6
HPNPP	0.34	$k_4[\text{Ln}(\text{OH})_3]^3$ $k_3[\text{Ln}(\text{OH})_3]^2$	$(2.5 \pm 0.6) \times 10^{10}$	$(5.8 \pm 0.5) \times 10^9$	$(1.93 \pm 0.06) \times 10^6$
paraoxon	0.19	$k_2[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]$ $k_2'[\text{Ln}(\text{OH})_2^+]$	0.105 ± 0.005 0.086 ± 0.005		

^a Rate constant for alkaline hydrolysis. ^b k_2 in $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_3 in $\text{M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, k_4 in $\text{M}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

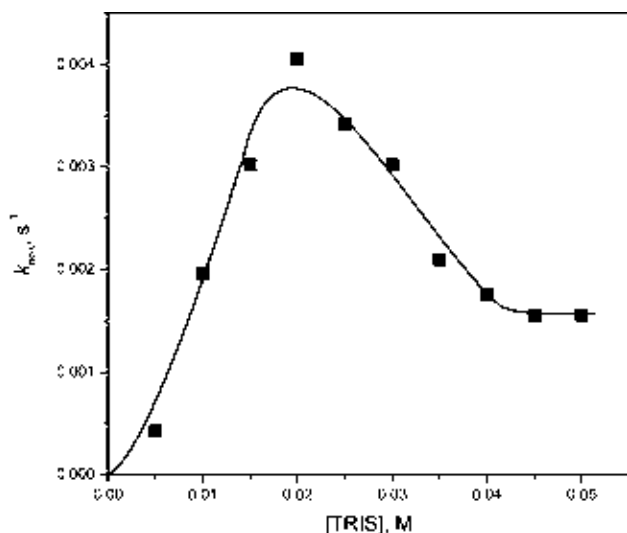


Figure 3. Observed rate constants for BNPP hydrolysis in the presence of 1 mM $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ in 80% DMSO vs concentration of TRIS. The reaction mixture contains 1 mM of HClO_4 .

increases less sharply. The slope of the plot of $\log k_{\text{obs}}$ vs $\log[\text{Eu}(\text{III})]$ obtained at the constant ratio $[\text{Eu}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ (Figure S3, Supporting Information) equals 2.6 ± 0.3 for HPNPP, and k_{obs} values from all data show good linear correlation with $[\text{Eu}(\text{OH})_3]^2$ (Figure S4B, Supporting Information). Thus, the rate law for HPNPP hydrolysis by Eu(III) takes the form of eq 9, with k_3 values given in Table 3.

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{Eu}(\text{OH})_3]^2 \quad (9)$$

With both phosphodiester substrates and all three lanthanides, the rate of hydrolysis observed in presence of the mixture of metal ion and tetramethylammonium hydroxide is much higher than that observed in the presence of tetramethylammonium hydroxide alone at the same total concentration. For example, in the presence of 2 mM tetramethylammonium hydroxide alone, k_{obs} for BNPP hydrolysis is $4 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ and k_{obs} for HPNPP hydrolysis is $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, but addition of 1 mM $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ raises k_{obs} for BNPP to 0.06 s^{-1} and k_{obs} for HPNPP to 1 s^{-1} (see Figure 4A,B), that is, by factors of 10^6 and 10^3 , respectively. The catalytic effect is discussed in the next section in terms of the acceleration factor over the rate of hydrolysis in the presence and in the absence of metal at the same pH value is even higher. In contrast to this, we observed that with a triester paraoxon addition of lanthanides to tetramethylammonium hydroxide caused a significant retardation of the

hydrolysis. The inhibitory effect of metal ions increased in the series of lanthanides on going from La(III) to Eu(III). Kinetics of the hydrolysis of paraoxon was studied in some detail only with La(III).

Figure 9 shows the effect of $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ on the rate of alkaline hydrolysis of paraoxon in the presence of 3 mM tetramethylammonium hydroxide superimposed with the species distribution diagram. Evidently, at the beginning, k_{obs} drops following a decrease in the concentration of free hydroxide ions, but then it starts to increase again following distribution curves for lower hydroxo complexes $\text{La}(\text{OH})_2^+$ and $\text{La}(\text{OH})_2^+$. The results were fitted to the rate eq 10a, and the respective rate constants are given in Table 3. Rate constants for both complexes are lower than the rate constant of alkaline hydrolysis.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_2[\text{La}(\text{OH})_2^+] + k_2'[\text{La}(\text{OH})_2] \quad (10a)$$

Efficiency and Mechanism of Catalysis. The observed rates of phosphodiester cleavage by lanthanides in 80% DMSO are much higher than those in water. Different rate laws observed in water and in DMSO do not allow us to compare the individual rate constants in both media, but a comparison of k_{obs} at the same, e.g., 1 mM total concentration of metal ion under optimum conditions of pH shows that the reactivity in 80% DMSO (k_{obs} in the range 0.02 – 1 s^{-1} for BNPP and in the range 1 – 10 s^{-1} for HPNPP) is at least 10^2 -fold higher than for most active lanthanide catalysts in water with both substrates.

Second- and third-order in metal ion kinetics of the catalytic hydrolysis of phosphodiesters most probably reflects the fact that actual active species are binuclear or trinuclear hydroxocomplexes reversibly formed at low concentrations from the predominantly existing mononuclear complexes. Binuclear lanthanide complexes stabilized by appropriate organic ligands were identified previously as the catalytically active forms in phosphodiester hydrolysis in water, where the aggregation is more favorable than in DMSO.^{18,30,31} Also binuclear lanthanide complexes bridged by methoxide anion are the active forms in transesterification of phosphodiesters in methanol.² The reactivity of hydroxo species in water is bigger for higher hydroxo complexes, with OH:M ratio 2 or larger like, e.g., $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$ or $\text{M}_2\text{L}(\text{OH})_5$, and a similar tendency is observed in 80% DMSO. Another similarity is

(30) Medrano, F.; Calderon, A.; Yatsimirsky, A. K. *Chem. Commun.* **2003**, 1968.

(31) Aguilar-Pérez, F.; Gómez-Tagle, P.; Collado-Fregoso, E.; Yatsimirsky, A. K. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9502.

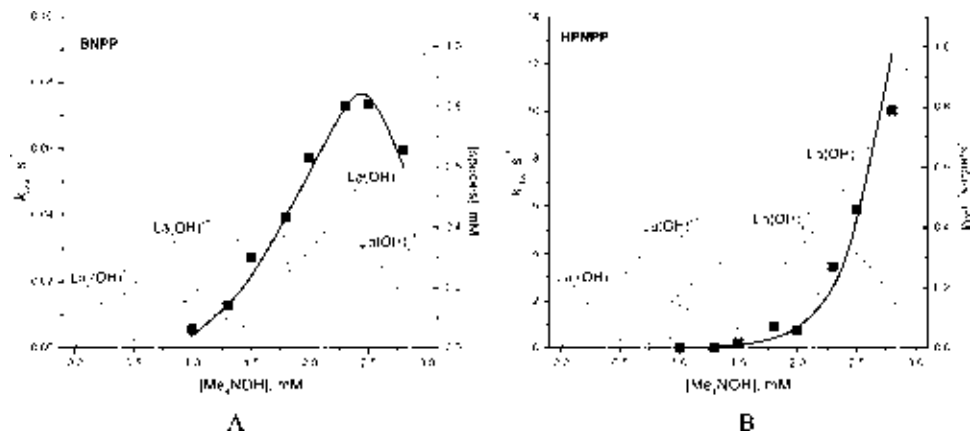


Figure 4. Observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP (A) and HPNPP (B) by $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ at variable concentration of added $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% vol DMSO at 25 °C. Dash curves show the species concentrations given on the right axis. Solid lines are theoretical profiles for k_{obs} calculated in accordance with rate eqs 6 and 7 for BNPP and HPNPP, respectively.

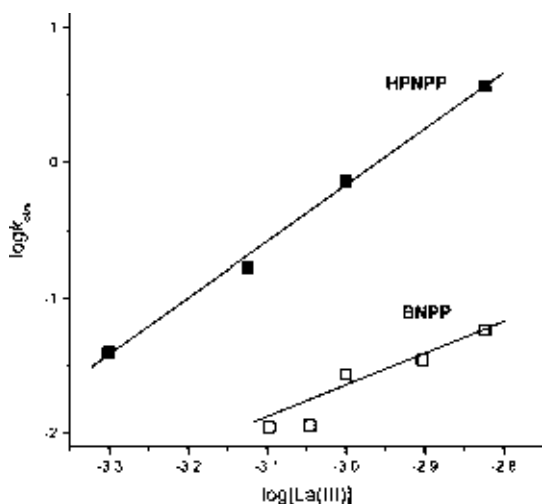
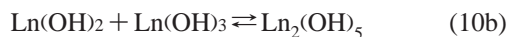


Figure 5. Observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP (open squares) and HPNPP (solid squares) by $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ at variable concentrations of $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ and Me_4NOH taken at the constant ratio $[\text{La}(\text{III})]:[\text{OH}^-] = 1:2$ in 80% vol DMSO at 25 °C.

low catalytic activity of lanthanides in triester hydrolysis in both media. However, in contrast to the present system, in water, the same species are active toward hydrolysis of both BNPP and HPNPP,³¹ while in 80% DMSO, hydrolysis of HPNPP involves complexes with higher OH:M ratio and of higher nuclearity than BNPP hydrolysis.

We shall discuss first the mechanism of BNPP hydrolysis. For all three lanthanides, there is a contribution proportional to the product of concentrations of $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ and $\text{Ln}(\text{OH})_3$ species, most probably reflecting the reaction involving the binuclear complex $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$ as the active species, which is formed via reaction 10b



with the association constant $K_{\text{assoc}} = [\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+]/[\text{Ln}(\text{OH})_2^+][\text{Ln}(\text{OH})_3]$. From this point of view, eq 6 may be rearranged as follows.

$$k_{\text{obs}} = k_3[\text{Ln}(\text{OH})_2 + \text{Ln}(\text{OH})_3] = (k_3 K_{\text{assoc}})[\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+] = k_2[\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+] \quad (11)$$

In eq 11, the second-order rate constant $k_2 = (k_3/K_{\text{assoc}})$ corresponds to the reaction between BNPP and $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$.

We can estimate only the upper limit of K_{assoc} and consequently only the lower limit of k_2 . Because potentiometric titrations do not detect $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$, its contribution to the total metal concentration should be less than ca. 5%. With total metal concentration about 1 mM and with abundances of $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$ and $\text{Ln}(\text{OH})_3$ complexes ca. 30% in basic solutions, this is possible if K_{assoc} is less than ca. 300 M^{-1} . With this estimate and given above k_3 values, the respective k_2 values should be larger or equal to $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for La(III), $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Nd(III), and $2.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Eu(III). Comparison with second-order rate constants for BNPP cleavage by $\text{Ln}_2(\text{OH})_5\text{L}$ ($L = 4$ -imidazolecarboxylate) in water, which equals 1.5 and $0.84 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Nd(III) and Eu(III), respectively (for La(III), the active species has a different composition),³¹ shows that the reactivity of $\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+$ in 80% DMSO is at least 10^2 – 10^3 times higher.

A stronger association of the anionic phosphodiester substrate with lanthanide cations in 80% DMSO as compared to water may contribute to this effect. To estimate this contribution, we determined the binding constants of diphenylphosphate with La^{3+} by ^{31}P NMR titration in water and in 80% DMSO. Addition of $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ in both solvents induced shifts of ^{31}P NMR signals to more negative δ values, as it was observed with different phosphodiesters including diphenylphosphate in methanol.² Figure 10 shows the change in δ values as a function of La(III) concentration in 80% DMSO and in water (inset).

Fitting of the results in Figure 10 to the theoretical equation for the formation of a 1:1 complex under conditions of fast exchange,³² which takes in this particular case the form of eq 12, gives the binding constant $K = 65 \pm 8 \text{ M}^{-1}$ in water and $170 \pm 40 \text{ M}^{-1}$ in 80% DMSO. Thus, binding of the phosphodiester to La(III) in 80% DMSO is stronger than in water, but the effect is less than 1 order of magnitude.

$$\Delta\delta = (\delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}})K[\text{La}(\text{III})]/(1 + K[\text{La}(\text{III})]) \quad (12)$$

It seems that the principle effect of DMSO is due to preferable solvation of lanthanide complexes by the organic cosolvent in aqueous–DMSO mixtures. It has been shown by measurements of the luminescence lifetimes of Eu(III) that in 50% mol DMSO–water (80% DMSO by volume),

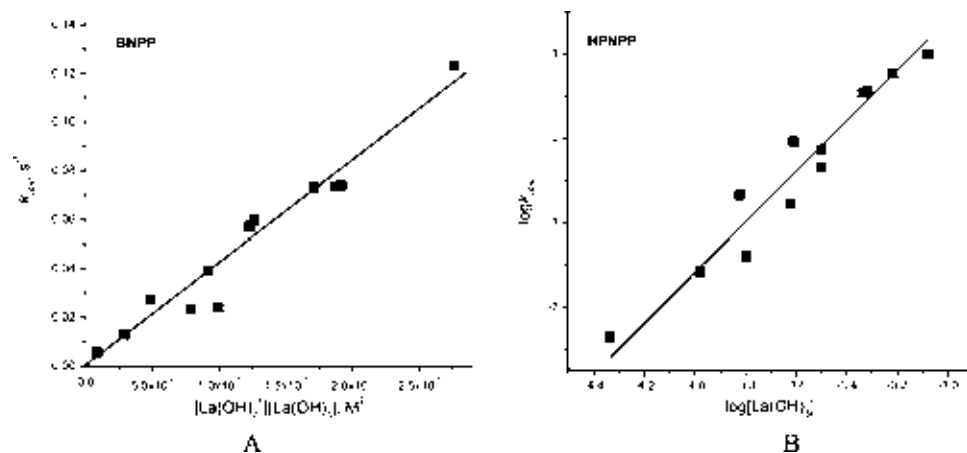


Figure 6. Observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP (A) and HPNPP (B) by $La(ClO_4)_3$ in 80% vol DMSO at 25 °C as a function of calculated concentrations of $La(OH)_2^+$ and $La(OH)_3$ in accordance with kinetic eqs 6 and 7, respectively. The slope of the line in (A) equals k_2 and the slope of the line in (B) equals 3.

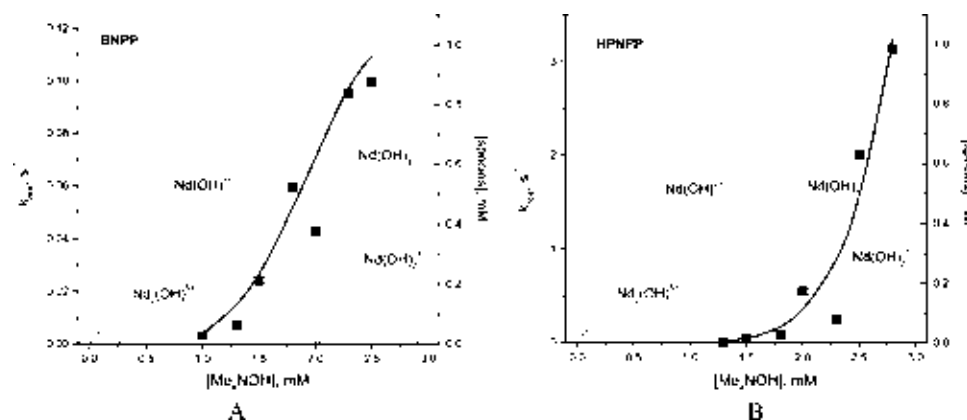


Figure 7. Observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP (A) and HPNPP (B) by $Nd(ClO_4)_3$ at variable concentration of added $Me_4N(OH)$ in 80% vol DMSO at 25 °C. Dash curves show the species concentrations given on the right axis. Solid lines are theoretical profiles for k_{obs} calculated in accordance with rate eqs 6 and 7 for BNPP and HPNPP, respectively.

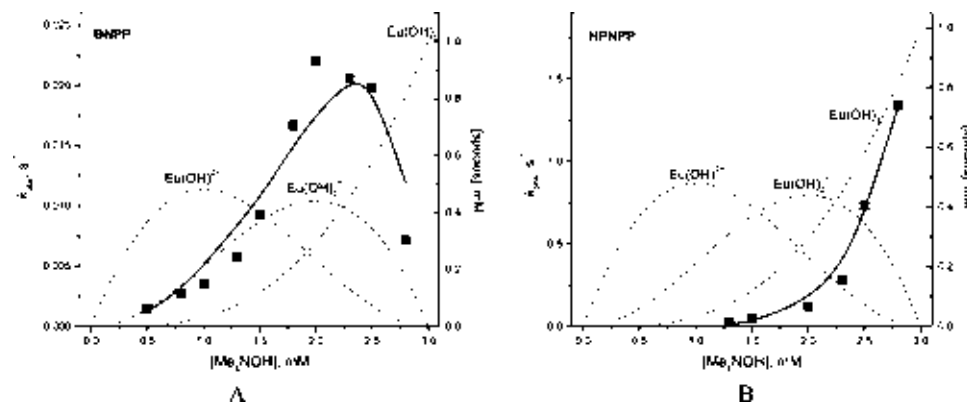


Figure 8. Observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP (A) and HPNPP (B) by $Eu(ClO_4)_3$ at variable concentration of added $Me_4N(OH)$ in 80% vol DMSO at 25 °C. Dash curves show the species concentrations given on the right axis. Solid lines are theoretical profiles for k_{obs} calculated in accordance with rate eqs 8 and 9 for BNPP and HPNPP, respectively.

the coordination sphere of the metal ion contains just one water molecule.³³ Therefore the metal-bound hydroxo anion should be surrounded by only rather voluminous DMSO molecules and should attack the metal-bound substrate in a practically nonaqueous microscopic environment where its reactivity is greatly increased due to dehydration. In other words, the simultaneous coordination of the phosphodiester and hydroxo anions to the metal ion transfers them from the medium of 80% DMSO, where the rate of alkaline hydrolysis

is still very close to that in pure water, to the medium of nearly pure DMSO, where the rate of alkaline hydrolysis increases by 2E3 orders of magnitude.¹⁰ The situation is illustrated by structures 1 and 2 for second-order reactions with $La(III)$ and $Nd(III)$ and 3 for the first-order reaction with $Eu(OH)_2^+$, respectively (charges on all noninteracting atoms and groups are omitted).

In line with this interpretation is the fact that addition of DMSO does not improve the efficiency of catalysis by

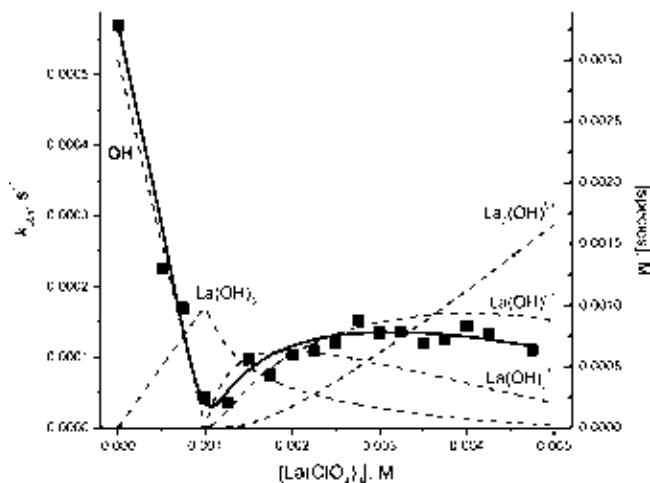


Figure 9. Observed first-order rate constants for the hydrolysis of paraoxon by 3 mM Me₄N(OH) at variable concentration of added La(ClO₄)₃ in 80% vol DMSO at 25 °C. Dashed curves show the species concentrations given on the right axis. The solid line is the theoretical profile for k_{obs} calculated in accordance with the rate eq 10a.

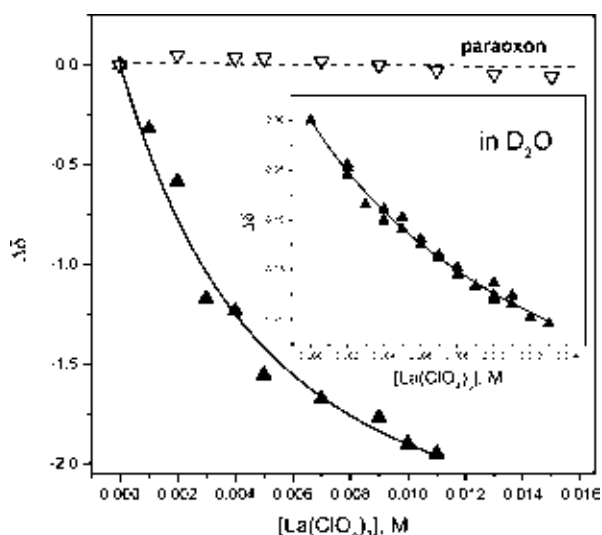
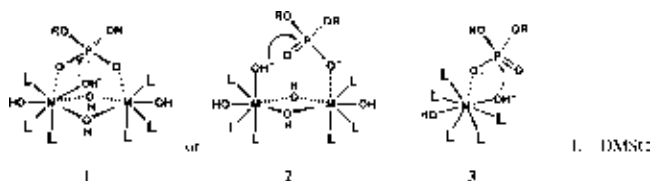


Figure 10. ³¹P NMR titrations of diphenylphosphate (solid triangles) and paraoxon (open triangles) in 80% d₆-DMSO, 20% D₂O, and in pure D₂O (inset). Solid lines are the fitting curves to eq 12.



Scheme 1

with DMSO solvated hydroxo complexes either intermolecularly or via unfavorable ligand substitution,³⁴ which costs a significant energy compensating a possible gain from the discussed above microenvironment effect. Interestingly, in less donor methanol solvent, lanthanides are highly efficient catalysts for methanolysis of both BNPP and paraoxon.^{2a,c}

Kinetics of HPNPP cleavage, which proceeds as an intramolecular transesterification, is more complicated. The reaction mechanism established for aqueous solutions is outlined in Scheme 1.³⁵ It involves fast reversible deprotonation of the β-hydroxyl and subsequent cyclization catalyzed by a metal complex in its aquo rather than hydroxo form. This leads to the same rate-pH sigmoid profile as in a case of BNPP hydrolysis, where it corresponds to kinetically indistinguishable mechanism with participation of hydroxo complexes as the active species providing metal-bound internal hydroxo anion as the nucleophile. However, in 80% DMSO rate vs [Me₄N(OH)] profiles, equivalent to rate-pH profiles, are shifted to more basic solutions in the case of HPNPP as a substrate (see Figures 4, 7, and 8). In addition, cleavage of HPNPP proceeds via kinetics of higher order in metal. Thus, in this case, instead of typical ambiguity of kinetically equivalent mechanisms with external or internal hydroxide we clearly see the participation of different reactive species for two substrates.

An important question is whether or not the mechanism outlined in Scheme 1 can still operate in 80% DMSO. The problem is that, in this medium, pK_a of the HPNPP hydroxyl group should be strongly increased as compared to that in water and the concentration of the deprotonated form may be too low to allow the reaction to proceed with the observed rate. The value of pK_a of HPNPP is unknown, but it can be estimated as follows. One can start from the known statistically corrected pK_a 15.1 of a hydroxyl group of ethylene glycol in water³⁶ and correct it for the effect of substitution of ROP(=O)(O⁻)-group for hydrogen atom at the second hydroxyl group. In this way, one obtains pK_a of the hydroxyl group of ROP(=O)(O⁻)-OCH₂CH₂OH, which should be very close to pK_a of HPNPP (the nature of group R is rather insignificant because it is separated from OH by 5 bonds

lanthanides in the hydrolysis of a neutral triester paraoxon. In water with a similar substrate, 4-nitrophenyl diphenylphosphate, the catalytic second-order rate constant for a binuclear La(III) hydroxo complex is 2-fold larger than k_{OH} ,³¹ but in 80% DMSO, rate constants k_2 and k_2' for the hydrolysis of paraoxon by hydroxo complexes of La(III) are 2-fold smaller than k_{OH} (see Table 3). Paraoxon is a neutral ligand and in contrast to what happens with anionic phosphodiester, addition of DMSO does not make it a better ligand. The results of ³¹P NMR titrations of paraoxon with La(ClO₄)₃ shown in Figure 9 indicate very weak if any complex formation in 80% DMSO. Therefore, paraoxon should react

(32) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2000; Chapter D.

(33) (a) Tanaka, F.; Kawasaki, Y.; Yamashita, S. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1988**, *84*, 1083. (b) Kimura, T.; Nagaishi, R.; Kato, Y.; Yoshida, Z. *J. Alloys Compd.* **2001**, *323–324*, 164.

(34) On basis of known donor numbers (DN), DMSO (DN = 30) should be a better ligand for any metal ion than a phosphate triester (DN = 23) for trimethyl phosphate.

(35) (a) Yang, M.-Y.; Iranzo, O.; Richard, J. P.; Morrow, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1064. (b) Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Torres Martín de Rosales, R.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13470.

(36) Ballinger, P.; Long, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 795.

and the methyl group has only a small inductive effect). An estimate of the effect of the phosphoryl group can be done by comparison of pK_a values of, e.g., adenosine (12.5)³⁷ and adenosine 3'-ethyl phosphate (12.51)³⁸ or a series of compounds of the structure $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3)^+-\text{X}$ ($\text{X} = \text{Gly}$, pK_a 7.33, or Leu , pK_a 7.45) and compounds $\text{PhOP}(=\text{O})-(\text{O}^-)-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3)^+-\text{X}$ ($\text{X} = \text{Gly}$, pK_a 6.95, or Leu , pK_a 7.12).³⁹ Obviously, the effect is small, and on average, one may expect a reduction in pK_a by ca. 0.2 units, which leads to the expected pK_a 14.9 for HPNPP in water. Next, one needs to take into account the effect of DMSO. It has been shown that pK_a values of ROH acids in 80% DMSO correlate linearly with their pK_a in water with the slope 1.4.¹⁶ The complete regression equation through the data given in ref 16 has the form $pK_a(80\% \text{ DMSO}) = 1.42 pK_a(\text{water}) - 1.37$. Therefore, the expected pK_a for HPNPP in 80% DMSO is 19.8.

For the mechanism in Scheme 1, the observed second-order rate constant for the catalytic reaction is given by the eq 13 where k_2 is the second-order rate constant for the reaction between deprotonated HPNPP and the active form of the metal complex catalyst.

$$k_{2\text{obs}} = k_2 K_a [\text{H}^+] \quad (13)$$

Let us consider the results for Eu(III), which shows the simplest kinetics and the lowest reaction rate. In the presence of 1 mM $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ under conditions of complete transformation of Eu(III) into $\text{Eu}(\text{OH})_3$, the observed first-order rate constant equals 1.9 s^{-1} in accordance with the k_3 value given in Table 3. The second kinetic order in respect of $\text{Eu}(\text{OH})_3$ most probably reflects the participation of a binuclear complex $\text{Eu}_2(\text{OH})_6$ as the active species. Although the association constant for the formation of $\text{Eu}_2(\text{OH})_6$ is unknown, one may estimate the lower limit of $k_{2\text{obs}}$, which is sufficient for the purpose of this analysis, by assuming the complete transformation of $\text{Eu}(\text{OH})_3$ into the binuclear active complex. Therefore $k_{2\text{obs}} = k_{\text{obs}}/[\text{Eu}_2(\text{OH})_6] \geq 1.9/0.0005 \approx 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in the solution containing 1 mM Eu(III) and 3 mM $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$. In this solution, $\text{pH} = 10.2$, and one obtains by using eq 13 an estimate for the lower limit of k_2 as follows.

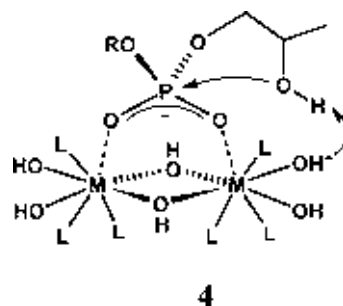
$$k_2 = k_{2\text{obs}} [\text{H}^+] K_a \geq 4 \times 10^3 \times 10^{-10.2} \times 10^{-19.8} \\ = 1.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (14)$$

Obviously, the second-order rate constant for the catalytic reaction required to explain the observed reaction rate surpasses by several orders of magnitude the diffusion-controlled limit even for the less active catalyst and therefore the mechanism in Scheme 1 cannot be valid in this case. Recently, a similar conclusion was reached for the HPNPP

cleavage in methanol in the presence of binuclear Zn(II) and Cu(II) complexes.⁴⁰

An alternative mechanism involves the transition-state proton transfer from the β -hydroxyl group of HPNPP to a metal-bound hydroxide anion acting as a general base. A characteristic feature of such a mechanism is the observation of a significant solvent H/D kinetic isotope effect.⁴¹ Because the isotope effect may also exist in β_{pq} values defined by eq 2, substitution of D_2O for H_2O may also affect the distribution of hydroxo complexes and in this way affect indirectly the reaction rate. To exclude this effect, the rates of HPNPP hydrolysis were measured in D_2O and H_2O at a given fixed metal concentration but at variable metal:hydroxide molar ratios close to 1:3 in order to extrapolate the observed isotope effect to a condition of complete conversion of the metal ion into $\text{M}(\text{OH})_3$ form. The experiments were performed with 0.5 mM $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ in the presence of 1.3, 1.4, and 1.5 mM Me_4NOH (molar ratios 1:2.6, 1:2.8, and 1:3) in DMSO containing 20% vol H_2O or D_2O . The observed $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ratios were 0.8, 1.6, and 2.9, respectively. We conclude therefore that there is an isotope effect in β_{pq} values that opposes the kinetic isotope effect and that the latter is close to 3. This value of the solvent isotope effect is in the range typically observed for the general base catalysis.⁴¹ It should be noted that the solvent isotope effect in β values most probably is indirect and reflects the isotope effect in water autoprotolysis.

On basis of the above discussion, we propose that the cleavage of HPNPP involves trinuclear (La and Nd) or binuclear (Eu) active complexes, reversibly assembled from $\text{Ln}(\text{OH})_3$ species, and proceeds via a mechanism with the general base assistance by the metal-bound hydroxo anion, as shown schematically in structure 4 for the $\text{M}_2(\text{OH})_6$ species. It is difficult to propose a possible arrangement of $\text{Ln}(\text{OH})_3$ units into a trinuclear complex; however, it is worth noting that the third-order in metal kinetics is not unprecedented and was observed earlier in the BNPP hydrolysis by a macrocyclic La(III) complex in 75% ethanol⁴² as well as in the BNPP⁴³ and ribonucleotide⁴⁴ hydrolyses by peroxide complexes of lanthanides in water.



(37) Izatt, R. M.; Rytting, J. H.; Hansen, L. D.; Christensen, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2641.

(38) Acharya, S.; Fšlidesi, A.; Chattopadhyaya, J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1906.

(39) Fšlsch, G.; ..sterberg, R. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2298.

(40) Lu, Z.; Liu, C. T.; Neverov, A. A.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11642.

(41) Jencks W. P. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*; Dover: New York, 1987.

(42) Jurek, P. E.; Jurek, A. M.; Martell, A. E. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1016.

(43) Mej'a-Radillo, Y.; Yatsimirsky, A. K. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *351*, 97.

(44) Kamitani, J.; Sumaoka, J.; Asanuma, H.; Komiyama, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 523.

The reason why the reaction with HPNPP involves a complex containing a larger number of bound hydroxo ligands than in the case of reaction with BNPP is not clear. Apparently, the coordinated hydroxo anion may act as a stronger base in neutral $M_2(OH)_6$ than in cationic $M_2(OH)_5^+$, but the difference hardly is very significant. It seems more probable that neutral $M_n(OH)_{3n}$ species have a better geometrical fit to the transition state of a general base catalyzed transesterification reaction, while $M_2(OH)_5^+$ species fit better to the transition state for BNPP hydrolysis via nucleophilic attack by a metal-bound hydroxo anion. There is also an uncertainty in the mode of phosphodiester coordination to polynuclear active species. The bridging coordination as in **1** or **4** can provide a stronger binding and electrophilic activation of the substrate, but the observation of the first-order reaction with mononuclear $Eu(OH)_2^+$ shows that nonbridging coordination as in the complex **2** also can be efficient at least for BNPP hydrolysis. Given the above estimate of the lower limit of $k_2 \geq 2.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for $Eu_2(OH)_5^+$ shows that the reaction involving a binuclear complex (**1** or **2**) proceeds at least 1 order of magnitude faster than the reaction involving the mononuclear complex $Eu(OH)_2^+$ (**3**), for which $k_2 = 22.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 3). Therefore, a higher efficiency of catalysis by polynuclear species is quite evident but still cannot be clearly interpreted. Currently, we are attempting to get more information on these aspects by theoretical calculations of possible structures of DMSO-solvated binuclear hydroxo complexes.

A measure of the catalytic efficiency often discussed in the literature is the so-called catalytic effect calculated as the ratio of the observed rate constant measured in the presence of catalyst to the rate constant of the background hydrolysis (k_{un}) measured or estimated at the same pH in the absence of catalyst. For such an analysis, we shall take the optimum conditions for BNPP hydrolysis, which correspond to the mixture of lanthanide perchlorate with 2.5 mol equiv of $Me_4N(OH)$. These conditions are also close to optimum for HPNPP cleavage. In solutions containing 1 mM metal and 2.5 mM $Me_4N(OH)$, the values of pH equal 10.7 for La(III), 9.8 for Nd(III), and 8.8 for Eu(III). Assuming that the background hydrolysis proceeds as a reaction with free hydroxo anions, one obtains with (given in Table 3) values of k_{OH} and $pK_w = 18.5$ in 80% DMSO the values of k_{un} for BNPP hydrolysis, which range from $1 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ for the solution containing Eu(III) to $1.3 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ for the solution containing La(III), and k_{un} for HPNPP transesterification, which range from 1.7×10^{-11} to $2.2 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ in the same solutions. Comparison with k_{obs} measured for these substrates at 1 mM metal and 2.5 mM hydroxide (Figures 4, 7, and 8) shows that the k_{obs}/k_{un} values are between 5.4×10^{11} and 2×10^{13} for BNPP and between 2.7×10^9 and 4.4×10^{10} for HPNPP. Note that pH of neutrality in 80% DMSO is 9.2 and therefore estimated catalytic efficiencies refer to

essentially neutral solutions. These catalytic efficiencies surpass by far those reported for the best phosphodiesterase catalysts in water with model substrates and are close to those measured in anhydrous methanol.^{2,3} Actually, this is the level of efficiency of the enzyme catalysis. Indeed, k_{cat} reported for bimetallic phosphodiesterases with BNPP as a substrate are about 10 s^{-1} ,⁴⁵ which corresponds to the catalytic efficiency of 10^{12} at saturation.

It is worth noting that in terms of this approach, there is also a significant catalysis by $La(ClO_4)_4$ in the paraoxon hydrolysis in 80% DMSO in spite of the fact that addition of the salt to $Me_4N(OH)$ solutions leads to an inhibitory effect, see Figure 9. Indeed, after addition of 3 mM La(III) to 3 mM $Me_4N(OH)$, the solution pH is 9.8 and estimated k_{un} equals $4.6 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, while $k_{obs} = 1.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. This corresponds to a decent catalytic effect of 3×10^5 , which could be really observed if the reaction kinetics would be studied in buffered solutions.

In conclusion, using 80% vol. DMSO as a reaction medium allowed us to greatly simplify the speciation of lanthanide hydroxo complexes thanks to elimination of polymeric aggregates of indefinite and irreproducible composition dominating in aqueous solutions. This made possible a kinetic study of phosphoesterolytic activity of simple mononuclear hydroxo complexes without stabilizing ligands. Results for phosphodiester substrates BNPP and HPNPP showed participation of bi- and even trinuclear active complexes reversibly assembled from $Ln(OH)_2^+$ and $Ln(OH)_3$. The efficiency of catalysis is much higher than in water and approaches that reported in anhydrous methanol although the reaction medium is still fairly aqueous with 50% mol of water. It is proposed that the increased reactivity is due to the preferable solvation of lanthanide ions by DMSO, which creates an anhydrous microenvironment favorable for reaction in the coordination sphere of the catalyst. A similar effect can contribute to increased reactivity typical for the active sites of natural hydrolytic metalloenzymes.

Acknowledgment. The financial support of DGAPA-UNAM (project IN 204805) is gratefully acknowledged.

Supporting Information Available: Summary of results of all potentiometric titrations, plots of k_{obs} for hydrolysis of BNPP and HPNPP by $Nd(ClO_4)_3$ and $Eu(ClO_4)_3$ at variable concentrations of $Ln(ClO_4)_3$ and $Me_4N(OH)$ taken at the constant ratio $[Ln(III)]:[OH^-] = 1:2$; plots of k_{obs} for hydrolysis of BNPP and HPNPP by $Nd(ClO_4)_3$ at $Eu(ClO_4)_3$ vs calculated concentrations of hydroxo complexes in accordance with kinetics eqs (6–9). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

IC701846E

(45) (a) Vogel, A.; Schilling, O.; Niecke, M.; Bettmer, J.; Meyer-Klaucke, W. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 29078. (b) Keppetipola, N.; Shuman, S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19251.

Speciation of Eu(III) hydroxo complexes in aqueous DMSO studied by direct excitation luminescence spectroscopy and their catalytic activity in phosphodiester cleavage†

Irma Sánchez-Lombardo,^a Christopher M. Andolina,^b Janet R. Morrow^{*b} and Anatoly K. Yatsimirsky^{*a}

Received 9th September 2009, Accepted 6th October 2009

First published as an Advance Article on the web 13th November 2009

DOI: 10.1039/b918722g

Data from potentiometric titrations of $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ by Me_4NOH in 80% v/v DMSO/water agree equally well with formation of two sets of hydroxo complexes: either $\text{Eu}_2\text{OH}^{5+}$ and $\text{Eu}(\text{OH})_n^{3-n}$ ($n = 1-3$) or $\text{Eu}_2\text{OH}^{5+}$, $\text{Eu}_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{Eu}_2(\text{OH})_3^+$ and $\text{Eu}(\text{OH})_3$. Studies using direct excitation luminescence spectroscopy and time-resolved decay measurements of Eu(III) solutions containing increasing amounts of hydroxide as well as luminescence resonance energy transfer studies between Tb(III) and Eu(III) in the presence of added hydroxide support the second model with predominantly binuclear hydroxo complexes. The luminescence lifetimes of hydroxo complexes are much shorter than those of Eu(III) complexes solvated by DMSO–water mixtures and even shorter than for Eu(III) aqua complexes, but are larger than those reported for hydroxo complexes in water. This indicates possible preferential solvation by DMSO of both free Eu(III) cation and its hydroxo complexes. Kinetic studies of the cleavage of two model phosphodiester by Eu(III) triflate in the same medium shows that reactive species are higher order hydroxo complexes $\text{Eu}_2(\text{OH})_3^+$ and $\text{Eu}(\text{OH})_3$. Reactions with $\text{Eu}(\text{OH})_3$ are second or third order in the complex indicating involvement of bi or trinuclear species as the reactive forms.

Introduction

Catalytic cleavage of DNA and RNA model phosphodiester in the presence of metal ions, in particular, lanthanide cations and complexes continues to be an area of active research.^{1,2} In search of possible ways of improvement of the catalytic activity, attention was turned to using non-aqueous solvents as a reaction medium. Greatly improved reactivity mostly with Zn(II) complexes was observed in anhydrous methanol.³ For alkaline, alkaline earth and lanthanide cations a large improvement was reported in somewhat more practical aqueous–organic mixtures such as aqueous DMSO containing 10 to 20% water by volume.⁴ Speciation of hydroxo complexes of La(III), Nd(III) and Eu(III) perchlorates in 80% by volume DMSO was established by potentiometric titrations, which demonstrated that donor DMSO molecules served as stabilizing ligands, protecting metal ions from precipitation as hydroxides and inducing formation of predominantly mononuclear hydroxo complexes.^{4c} However, the speciation was not confirmed by any other technique and appeared to be a very sensitive function of reaction conditions, such as the concentration of supporting electrolyte (NaClO_4). In this paper we report the results of direct excitation luminescence studies of speciation of Eu(III) triflate in 80% DMSO, which in combination with potentiometric data

provide a more reliable picture of lanthanide hydrolysis under these conditions.

Previously, time-resolved laser-induced luminescence emission spectroscopy with excitation at 266 nm was applied for study of the speciation of Eu(III) hydroxo complexes in water.⁵ Very dilute (6.6×10^{-6} M) solutions of Eu(III) over a wide pH range of 2–13 were employed. Emission spectra of individual hydroxo complexes were obtained by recording spectra under conditions where a single species is predominant in accordance with a calculated species distribution diagram. Only mononuclear complexes $\text{Eu}(\text{OH})_n^{3-n}$ ($n = 0-4$) were considered with formation constants taken from the literature. For all hydroxo complexes the intensities of the emission peak at 617 nm were larger than that for the aqua-ion with larger full widths at half maxima (FWHM). The recovered lifetimes decreased from 110 μs for the aqua-ion to 50 μs for $\text{Eu}(\text{OH})_2^{2+}$ and further to 30 μs for $\text{Eu}(\text{OH})_4^-$. These results point to rather unusual behavior of the hydroxo ligand since decreased lifetime usually implies more efficient quenching by the ligand, but the luminescence intensity actually increases. The short luminescence lifetimes for the hydroxide complexes are also unusual because the fully hydrated Eu(III) ion is generally the most highly quenched species due to the effective quenching of OH oscillators of the water ligands.^{6,7} This shows that ligand quenching parameters for ligand groups such as hydroxide are not fully determined. In contrast, quenching parameters for Eu(III) macrocyclic complexes are well characterized so that direct excitation photoluminescence spectroscopy can be successfully applied for characterization of Eu(III) macrocyclic complexes in aqueous solution.^{8,9}

Recovered lifetimes of laser-induced luminescence of Eu(III) were measured in DMSO/ H_2O and DMSO/ D_2O mixtures in

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F., México. E-mail: anatoli@servidor.unam.mx

^bDepartment of Chemistry, University at Buffalo, State University of New York, Amherst, NY 14260-3000. E-mail: jmorrows@buffalo.edu

† Electronic supplementary information (ESI) available: HYPERQUAD fitting and statistical parameters for repetitive potentiometric titrations of Eu(III) triflate by Me_4NOH in 80% v/v DMSO/water.

order to determine the number of water molecules coordinated to Eu(III) in mixed solvent.¹⁰ These results demonstrated the preferential solvation of Eu(III) by DMSO, in particular, in 80% vol. (50% mole fraction) DMSO the molar fraction of DMSO in the coordination sphere of Eu(III) is 85%.

Previous studies on Eu(III) speciation in water or in DMSO/water mixtures used changes in luminescence emission or luminescence lifetime data to monitor species formation as a function of pH or solvent composition. An additional powerful tool is the use of excitation luminescence spectroscopy to monitor speciation. In this regard, the ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ excitation peak of Eu(III) is highly useful because both ground and excited state are non-degenerate and not split by ligand fields. This leads to one excitation peak for each species, barring overlap of excitation peaks. Our interest in the speciation of the active catalysts formed in DMSO/water solutions of Eu(III) at basic pH values in the presence of different weakly coordinating counter ions led us to use excitation luminescence spectroscopy for probing speciation. An additional tool, luminescence resonance energy transfer (LRET) between different lanthanide ions was used to elucidate species that potentially contain multinuclear lanthanide complexes.

In preliminary experiments we observed an unexpectedly strong decrease of Eu(III) perchlorate luminescence intensity in neutral and basic 80% DMSO solutions, which was absent when triflate was the counterion. For this reason the luminescent studies were performed with $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ instead of $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$, which was previously employed in potentiometric and kinetic studies. We also repeated the potentiometric titrations with $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ instead of $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$, which indeed showed quite different speciation. Finally the kinetics of cleavage of two model phosphodiester substrates, BNPP and HPNPP (Chart 1), was studied with $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in 80% DMSO in order to correlate the reactivity with the type of hydroxo complexes.

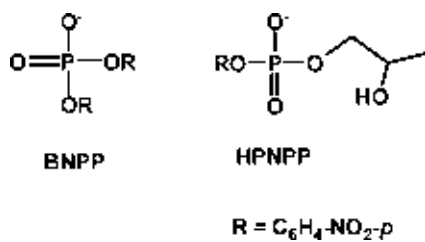


Chart 1

Results and discussion

Potentiometric titrations were possible up to the addition of 2.5 mole equivalents of Me_4NOH to 0.50–1.50 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$. At higher base and metal ion concentrations the precipitation of the metal hydroxide was observed. Titrations performed in the absence and in the presence of supporting electrolyte (0.010 M $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$) gave similar results in contrast to the previously observed strong influence of 0.010 M NaClO_4 .^{4c} A typical titration plot is illustrated in Fig. 1.

Initially the results were fitted to the reaction model previously established for perchlorates, which involved equilibria (1)–(4). The fitting parameters for 10 independent titrations are collected in

Table 1 Equilibrium constants obtained by fitting the titration results to models involving either set of reactions (1)–(4) or (1), (5), (6) and (4). Errors are the standard errors of mean values of equilibrium constants from 10 independent titrations

$\log\beta_{\text{pq}}$			
$\text{Eu}_2(\text{OH})^{5+}$	$\text{Eu}(\text{OH})^{2+}$	$\text{Eu}(\text{OH})_2^+$	$\text{Eu}(\text{OH})_3$
-5.0 ± 0.2	-8.4 ± 0.2	-17.5 ± 0.2	-26.3 ± 0.3
$\text{Eu}_2(\text{OH})^{5+}$	$\text{Eu}_2(\text{OH})_2^{4+}$	$\text{Eu}_2(\text{OH})_3^+$	$\text{Eu}(\text{OH})_3$
-5.0 ± 0.1	-13.2 ± 0.2	-40.0 ± 0.3	-26.6 ± 0.3

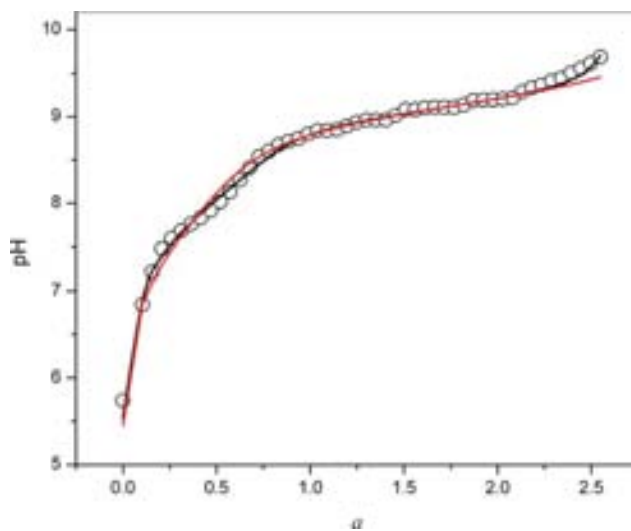
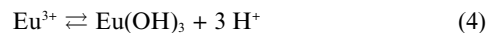
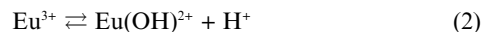
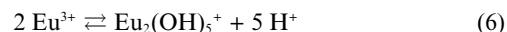
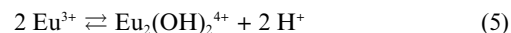


Fig. 1 Titration plot for 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in 80% DMSO where α is the number of moles of base added per mole of metal ion. The red line demonstrates fitting to the model involving predominantly mononuclear species (reactions (1)–(4)) and the black line shows fitting to the model involving predominantly binuclear species (reactions (5) and (6) instead of (2) and (3)).

Table S1 (ESI[†]) and the mean values of the equilibrium constants are shown in Table 1.



Testing other models with all complexes binuclear or partly binuclear and partly mononuclear we found an equally good fit to the model, which involves reactions (1) and (4) together with (5) and (6) instead of (2) and (3) with parameters given in Table 1 (Table S2[†] collects the fitting parameters for individual titrations).



The statistical parameters (sigma) are somewhat better for fitting to the first model, but the difference is marginal. On the other

hand, the fitting curves for the second model visually better follow the experimental points (see Fig. 1). Obviously one cannot choose a preferable model on the basis of titration results only. The important point is, however, that although both models fit nearly equally well to the titration data, they predict a rather different distribution of hydroxo complexes as illustrated in Fig. 2A and 2B. The major difference is that the model with predominantly mononuclear species, eqn ((1)–(4)), predicts a much higher contribution of trihydroxo complex $\text{Eu}(\text{OH})_3$, which already starts to emerge after addition of just 0.50 mM OH^- to 1.00 mM $\text{Eu}(\text{III})$ and becomes a predominant species after addition of 1.70 mM OH^- . Also, in accordance with the model (1)–(4), two higher hydroxo complexes, $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$ and $\text{Eu}(\text{OH})_3$, are formed earlier and coexist in comparable to each other at concentrations from 1.00 to 2.00 mM OH^- , while in accordance with the model involving reactions (5) and (6) two higher complexes $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ and $\text{Eu}(\text{OH})_3$ are formed later and the concentration of the latter is always smaller than that of the former. These differences may

allow one to discriminate the models on the basis of spectral properties, which are correlated with concentrations of individual species rather than with the total consumption of hydroxide as is the case with potentiometry.

The excitation spectra of 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in 80% DMSO at variable amounts of added Me_4NOH are shown in Fig. 3A. For comparison Fig. 3B shows the respective spectra for $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$. In the case of triflate, one observes a regular trend of decreasing intensity in the maximum and increasing FWHM attributable to the formation of hydroxo complexes. With perchlorate, the spectrum is less intense and very wide from the very beginning and only a small decrease in intensity is observed upon addition of Me_4NOH . The excitation spectrum of $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ obtained in the presence of 1 mole equivalent of HClO_4 was similar to that of $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ without added acid. This suggests that there may be more significant hydrolysis of $\text{Eu}(\text{III})$ in the form of perchlorate. In line with this we observed approximately one order of magnitude larger hydrolysis constants for $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3^{4c}$ than those in Table 1

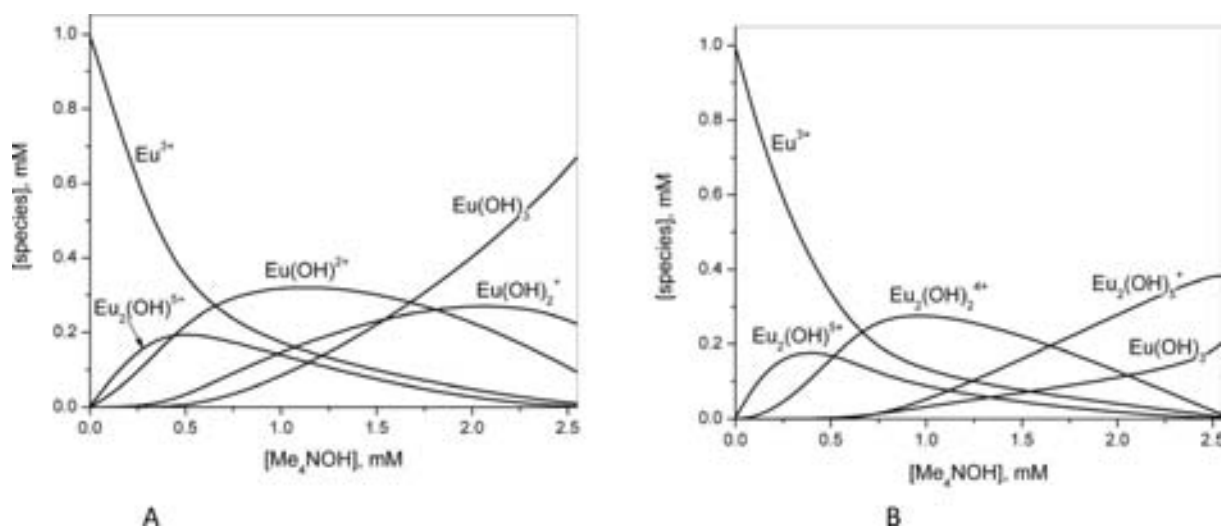


Fig. 2 Species distribution diagrams for 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in 80% DMSO from potentiometric titration data. (A) Model with predominantly mononuclear species, equations (1)–(4). (B) Model with predominantly binuclear species with eqn ((5) and (6) instead of (2) and (3).

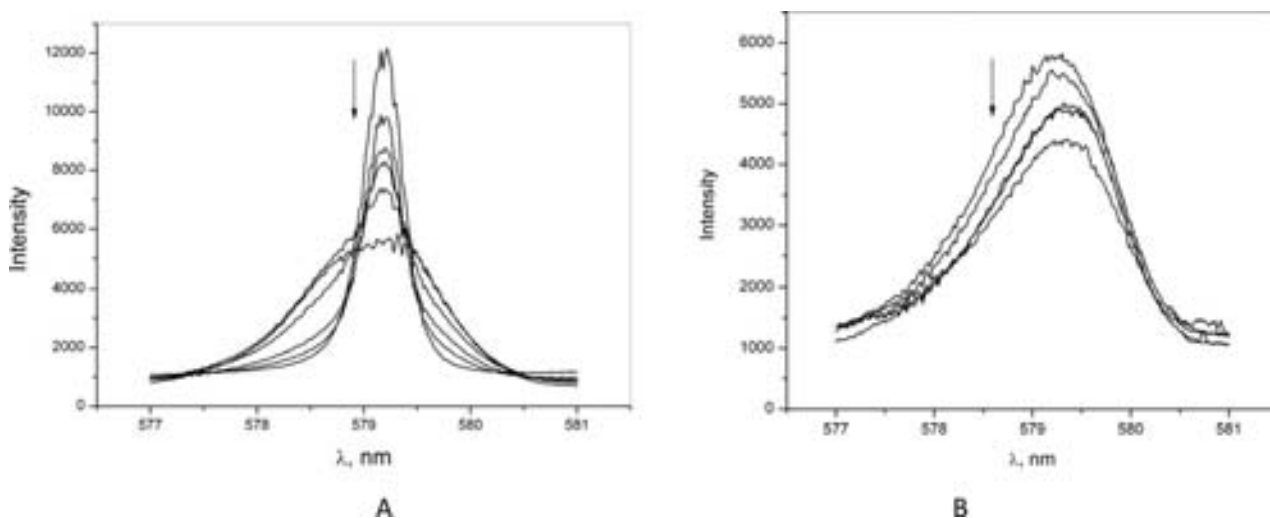


Fig. 3 ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_0$ excitation spectra (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ emission) of 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (A) or $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ (B) in 80% DMSO at variable amounts of added Me_4NOH from 0 to 2.50 mM.

for $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$. In addition not only the equilibrium constants, but even the type of hydrolytic equilibria were very sensitive to the presence of added sodium perchlorate, but are insensitive to the presence of excess sodium triflate. It seems therefore, that for some reason which is unclear the ion pairing with perchlorate in aqueous DMSO is more extensive than with triflate and this leads to the apparent quenching effect in the excitation luminescence spectra.

Conversion of $\text{Eu}(\text{III})$ aqua-ions into hydroxocomplexes in water was found to increase the luminescence intensity of the $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ emission band upon UV excitation.^{5,11} Here we observe an apparent quenching of the $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_0$ excitation peak ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ emission) in aqueous DMSO mixture. The decreasing intensity of the excitation peak may be due to more effective quenching involving the Ln–ligand coordination sphere, or other changes in the organization of the solvation sphere. A change in the symmetry of the $\text{Eu}(\text{III})$ ion by formation of a new complex is also expected to lead to differences in the intensity of the luminescence.⁶ Alternately, the formation of several distinct $\text{Eu}(\text{III})$ species with excitation peaks spread out over the 577–581 nm range would give the appearance of quenching.

The $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_0$ transition of $\text{Eu}(\text{III})$ is not split by ligand fields and therefore the increase in the FWHM reflects formation of additional species with shifted absorption maxima.⁶ The individual spectra of species can be obtained by deconvolution of these spectra shown in Fig. 4. In the absence of added base (Fig. 4A) only one peak at 579.19 nm with the FWHM 0.42 ± 0.02 nm is observed, which can be attributed to the solvato complex of $\text{Eu}(\text{III})$. Addition of base initially induces appearance of a weak additional band at 579.24 nm (FWHM 1.03 ± 0.02 nm), which grows on further addition of base and disappears in the presence of 2.5 equivalents of the base. Starting from 1 equivalent of the base (Fig. 4C) a third peak at 578.6 nm (bandwidth 1.04 ± 0.09 nm) appears, which grows in intensity up to the maximum concentration of the base. Finally, the fourth peak at 579.44 nm (FWHM 0.99 ± 0.02 nm) appears in the presence of 2 equivalents of the base and grows more in the presence of 2.5 equivalents. The peak of the solvato complex at 579.19 nm is observed in all spectra with gradually decreased intensity. In the last spectrum (Fig. 4F) at maximum base concentration this peak is observed with strongly increased FWHM of 0.84 nm, but attempts to deconvolute it to “normal” peak of the solvato complex with the FWHM 0.42 nm and an additional peak failed. Also failed was an attempt to deconvolute spectra keeping fixed FWHMs for each band at all hydroxide concentrations. A possible reason for the variability in FWHMs may be incomplete equilibration of the system in

basic solutions. Alternatively, as described below, speciation may be further complicated by the presence of $\text{Eu}(\text{III})$ hydroxo species that differ by solvation in the water/DMSO mixture.

Fig. 5 shows the plots of peak intensities vs. concentration of Me_4NOH . A comparison with species distribution diagrams (Fig. 2) given above shows that formation of the first hydroxo complex $\text{Eu}_2(\text{OH})^{5+}$ is not accompanied by the appearance of a new peak. This suggests the excitation peak for the species containing one bridged hydroxo anion may overlap that of the solvato complex. The peak at 579.24 nm approximately follows the distribution curve for either $\text{Eu}(\text{OH})_2^{2+}$ or $\text{Eu}_2(\text{OH})_2^{4+}$, but closer to the latter. The next peak at 578.60 nm obviously follows much closer to the binuclear $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ species than to the mononuclear $\text{Eu}(\text{OH})_2^+$ which passes through a maximum at 2.0 mM base and begins to appear already at 0.50 mM base. The red-shifted peak at 579.44 nm should correspond to the highest hydroxo complex $\text{Eu}(\text{OH})_3$ and it obviously better follows the distribution curve of this complex calculated for the model (4)–(8), Fig. 2B. Thus the peak fitting analysis supports the formation of at least three species in basic solutions and the distribution of peak intensities supports the reaction model with predominantly binuclear species.

Luminescence lifetimes were measured as a function of added base. Similar to different peaks in the excitation spectra, different lifetimes can be attributed to different species generated by addition of hydroxo anions. Fig. 6A illustrates typical intensity decays at 579.22 nm for 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ obtained at increased concentrations of Me_4NOH . The profile without added base fits to a single exponent with the decay time $\tau_1 = 537 \pm 4 \mu\text{s}$. Decays in the presence of added base are not mono-exponential anymore. This is more clearly seen in semilogarithmic plots shown in Fig. 6B: the plot in the absence of added base is linear, but those in the presence of added base show progressively more significant contribution of an additional more rapid process. The results were fitted to eqn ((7)), where $I(t)$ is the time-dependent intensity, α_i are the pre-exponential factors and τ_i are the decay times.

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (7)$$

In all cases a satisfactory fit could be obtained with only two exponents, as illustrated in Fig. 6. The fitting parameters are collected in Table 2. The pre-exponential factors were normalized by applying the condition $\sum \alpha_i = 1$ and in principle should reflect the contributions of corresponding species to the total $\text{Eu}(\text{III})$ concentration.

Time-resolved luminescence decays were registered at three wavelengths: at the maximum of the solvato complex (579.22 nm) and at two other wavelengths, on either side of the maximum peak

Table 2 Recovered luminescence lifetimes (relative errors $\leq 2\%$) and pre-exponential factors obtained by fitting of luminescence decay traces of 1.0 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in 80% DMSO to equation (9) at increased concentrations of added Me_4NOH

OH^- , mM	578.86 nm				579.22 nm				579.48 nm			
	τ_1	α_1	τ_2	α_2	τ_1	α_1	τ_2	α_2	τ_1	α_1	τ_2	α_2
0	538	1.0			543	1.0			529	1.0		
0.5	524	0.75	80.2	0.25	530	0.84	111	0.16	522	0.71	80.2	0.29
1.0	481	0.60	80.4	0.4	530	0.74	98.0	0.26	477	0.56	80.9	0.44
1.5	381	0.46	79.9	0.54	499	0.60	93.9	0.4	400	0.41	79.0	0.59
2.0	292	0.47	65.2	0.53	437	0.46	83.4	0.54	287	0.39	63.1	0.61
2.5	255	0.43	60.8	0.57	273	0.37	62.7	0.63	207	0.37	48.4	0.63

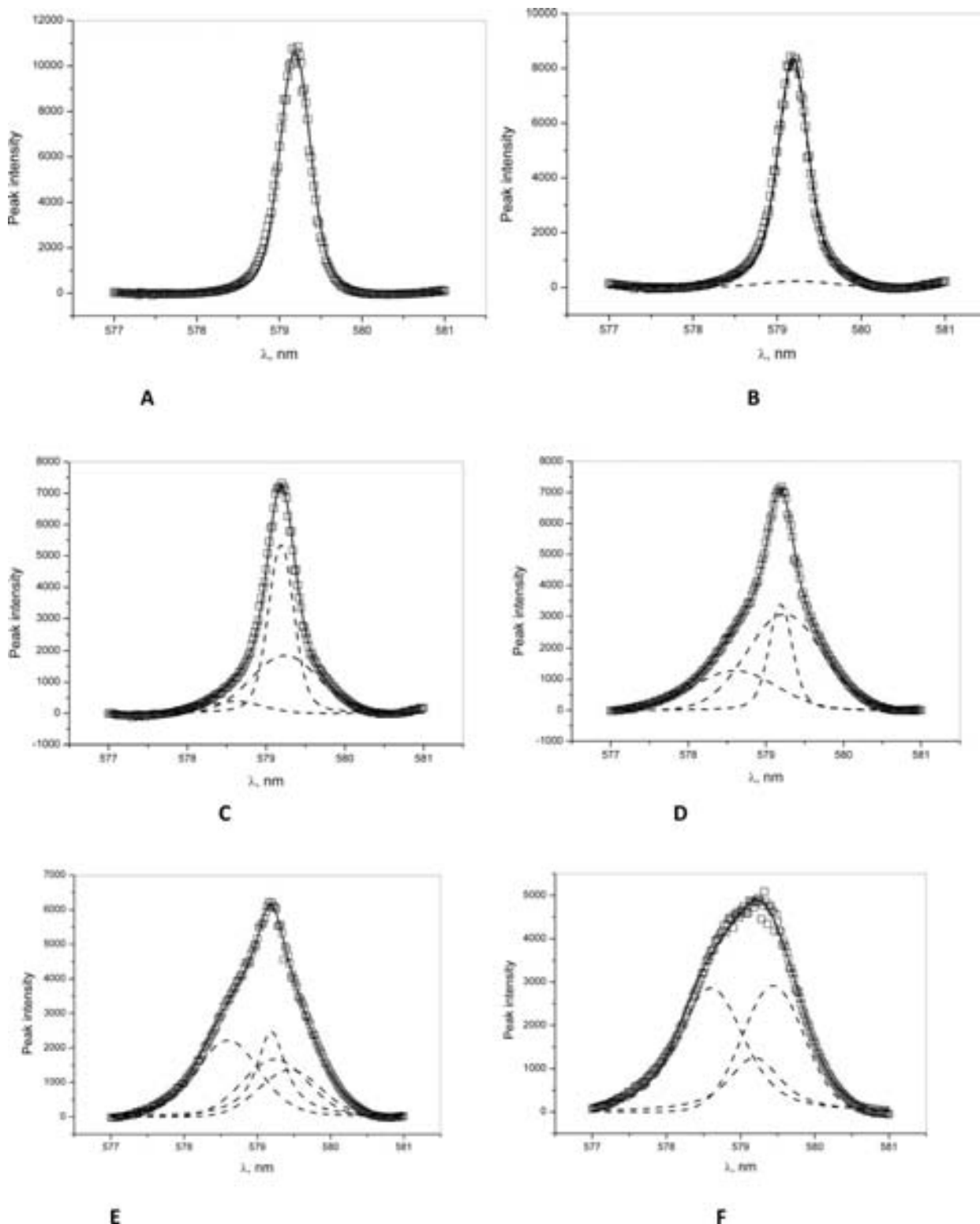


Fig. 4 Peak fitting of the ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ excitation spectra of 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$, obtained in the presence of 0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 and 2.50 mM Me_4NOH (A–F, respectively) in 80% DMSO. Black line is the calculated profile, dashed lines are the spectra of individual species.

intensity. In the absence of added base, recovered luminescence lifetimes are practically independent of the wavelength, but in the presence of base a noticeable variation in the lifetime is clearly seen. This reflects variable contributions from different hydroxo complexes to the observed luminescence intensity at different

wavelengths, as is evident from the deconvolution spectra. The results in Table 2 show that there are two groups of hydroxo complexes, one with recovered lifetimes in the range 200–500 μs , which includes the solvato complex, and another one with recovered lifetimes in the range 50–110 μs . The recovered lifetimes

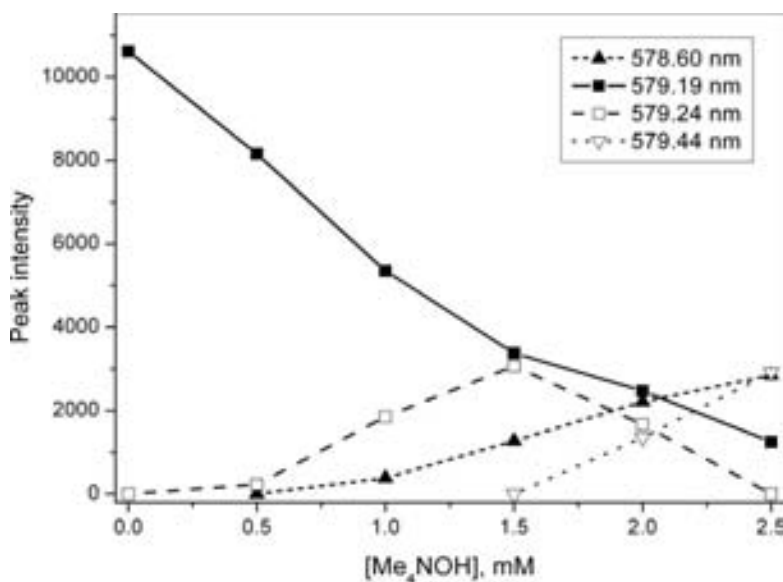


Fig. 5 Intensities of excitation peaks upon addition of Me_4NOH to 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in 80% DMSO.

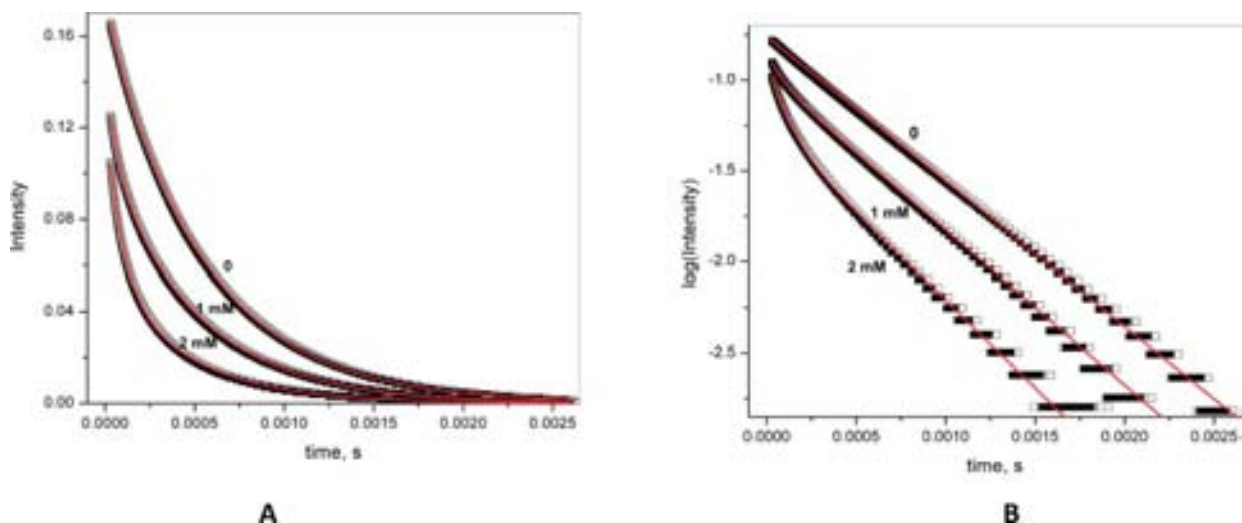


Fig. 6 Time-resolved intensity decays at 579.22 nm for 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ in the presence of 0, 1.00 and 2.00 mM Me_4NOH in 80% DMSO. Red lines show fitting to a single exponent curve for decay in the absence of added base and to a two exponent curve for decays in the presence of added base. A–linear scale, B–semilogarithmic scale.

within each group apparently cannot be resolved by the fitting procedure. The contribution of complexes with larger recovered lifetimes decreases and that of the complexes with smaller lifetimes increases on increasing the hydroxide concentration, so they can be attributed to lower and higher hydroxo complexes respectively, but it seems impossible to correlate these contributions with species distribution.

Attempts were made to fit the time-resolved luminescence decays to other models such as triple and quadruple exponential decays also with a global analysis of all three wavelengths per titration point (data not shown). This approach also gives two groups of decay times, but the values within each group are more uniform: one around 500 μs and another one around 100 μs . The contribution of the slower decay decreases and the contribution of the fast one increases with pH. So, similar to the previous

treatment, fast decays or short lifetimes can be attributed to hydroxo complexes, but the number of exponents required for fitting is smaller than the number of species determined by potentiometry. Better fitting quality was observed for Global Fitting to three exponents, however, in this case the α values often were negative and the contribution of the third exponent was generally very small. In any case we see that decay curves cannot be resolved to the expected number of components. The difficulty in resolving decays of different species may be a result of a very large number of species. Indeed, for every hydroxo complex detected by potentiometry there may exist a number of different solvates because it is a mixed solvent and if ligand interchange in binuclear complexes is slow each solvate may have a slightly different lifetime and so we see an average between many exponents, which finally becomes irresolvable. Alternatively, one or more of the species may

be in rapid exchange on the luminescence timescale so that only an average lifetime is observed.

Biexponential decays were recently reported for Eu(III) complexes with humic acids in water with short lifetimes of between 40 and 60 μs , significantly smaller than that for the aqua ion.¹² The effect was attributed to unspecified quenching effects. Simple neutral electrolytes such as alkali metal chlorides and perchlorates decrease luminescence lifetimes of Eu(III) in water with both anions and cations contributing to the observed effect.¹³ It was suggested that the outer-sphere anion binding and long-range interactions between the excited ion and solvent molecules are responsible for the observed variations. Interestingly, perchlorate anions reduce the luminescence lifetime much more strongly than chloride anions. As was mentioned in the introduction, shorter lifetimes for hydroxo complexes of Eu(III) as compared to the aqua ion were also reported in water.⁵ The time-resolved luminescence lifetime of the solid crystalline $\text{Eu}(\text{OH})_3$ is 88 μs .¹⁴ Since both in solution and in the solid state Eu(III) hydroxides cannot have a larger number of OH groups in the first coordination sphere than in the aqua ion, these results clearly indicate a higher efficiency of quenching by OH^- than by water. In our system the shortest lifetime is about 60 μs , which can be attributed to a mixture of solvated $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ and $\text{Eu}(\text{OH})_3$. This is shorter than that of the Eu(III) aqua ion, but larger than those for the Eu(III) hydroxo complexes in water.⁵ This probably reflects the preferable solvation of hydroxo complexes by DMSO in the mixed solvent, as it occurs for the non-hydrolyzed solvato cation of Eu(III).

To test further for the possible presence of binuclear hydroxo complexes, luminescence resonance energy transfer (LRET) between Tb(III) and Eu(III) was studied. Tb(III) and Eu(III) have been employed as a LRET donor/acceptor pair in DMSO solutions¹⁵ and in enzymes to probe multiple Ln(III) ion binding sites.⁶ Fig. 7, black line, shows the emission spectrum of $\text{Tb}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ obtained with excitation at 487.00 nm, which is selective for Tb(III) excitation. Addition of 1 equivalent of $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ does not affect the spectrum under these conditions of no added hydroxide

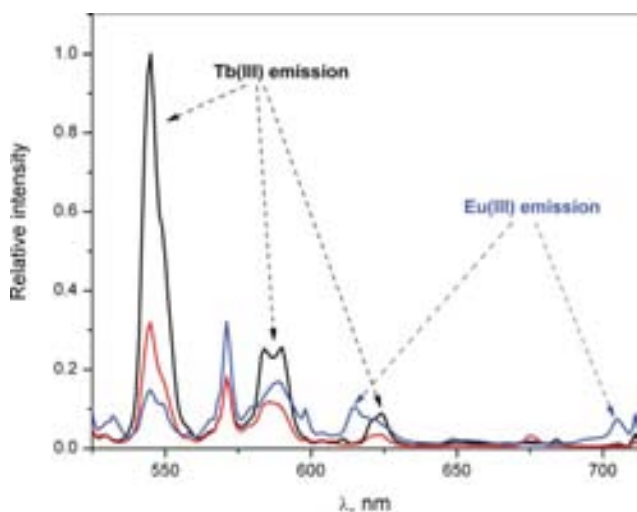


Fig. 7 Emission spectra of $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (excitation at 487.00 nm) in 80% DMSO. Black line: 1.00 mM $\text{Tb}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$, red line: addition of two equivalents of Me_4NOH , blue line: addition of 2 equivalents of Me_4NOH together with 1 equivalent of $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$.

(data not shown). Addition of 2 equivalents of Me_4NOH has a significant quenching effect on the 540 nm emission peak (red line). But when both 2 equivalents of base and 1 equivalent of Eu(III) are added (blue line) the intensity of the Tb(III) luminescence decreases further and characteristic Eu(III) emission lines at 614 and 705 nm appear, indicating energy transfer from Tb(III) to Eu(III) in the mixed hydroxo binuclear complexes.

Kinetics of the cleavage of two phosphodiester, BNPP a DNA model substrate and HPNPP an RNA model substrate, were studied in the same range of concentrations of $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ and Me_4NOH as in potentiometric experiments. The observed catalytic activity was approximately 5 times lower than for $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ with BNPP and approximately 2 times lower with HPNPP as substrates, but still much higher than in water. Fig. 8 shows the results for BNPP cleavage in the presence of 1.00 mM Eu(III) superimposed with the species distribution diagram. No measurable rate is observed below addition of 0.50 equivalents of the base. In the range of base concentrations from 0.50 to 2.0 mM the reaction rate grows following the distribution curve for $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ complex and increases more rapidly following formation of $\text{Eu}(\text{OH})_3$. The plot of $\log(k_{\text{obs}})$ vs. logarithm of total Eu(III) concentration shown in the inset has the slope 1.9 ± 0.2 indicating a higher than first-order contribution of the reactive species. Analysis of all results leads to the rate eqn ((10)) with the first-order dependence on $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ and the second-order dependence on $\text{Eu}(\text{OH})_3$.

$$k_{\text{obs}} = (12 \pm 1)[\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+] + (1.7 \pm 0.3) \times 10^4 [\text{Eu}(\text{OH})_3]^2 \quad (10)$$

Hydrolysis of BNPP with lanthanide perchlorates followed the rate law (11), which was interpreted in a way that the real active species was the binuclear complex $[\text{Ln}_2(\text{OH})_5^+]$ reversibly assembled from mononuclear precursors.^{4c} In the triflate system, where such a binuclear hydroxo complex is formed predominantly, we do observe it as a reactive species.

$$k_{\text{obs}} = k[\text{Ln}(\text{OH})_2^+][\text{Ln}(\text{OH})_3] \quad (11)$$

The second-order rate constant $12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the cleavage of BNPP by DMSO stabilized $\text{Eu}_2(\text{OH})_5^+$ can be compared with the rate constant of $0.84 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ reported previously for a binuclear complex $\text{Eu}_2(\text{OH})_5(\text{ICA})$ of similar composition stabilized by 4-imidazolecarboxylate (ICA) in water.¹⁶ A ten-fold increased reactivity in 80% DMSO reflects the solvent effect in this system, which can be attributed to a stronger binding of the anionic substrate to the catalysts and to preferable solvation of lanthanide cations by DMSO.^{4c}

Results for HPNPP cleavage are shown in Fig. 9. With this substrate the reaction becomes detectable at higher base concentration above 1.00 mM and the reaction rate increases very sharply on further increase in the base concentration. The plot of $\log k_{\text{obs}}$ vs. logarithm of total Eu(III) concentration shown in the inset has the slope 3.1 ± 0.2 .

These results are consistent with the previously observed kinetics in Ln(III) perchlorate solutions with the rate law (12).^{4c} Apparently an active species in both systems is a trinuclear complex assembled by self-association of neutral $\text{Ln}(\text{OH})_3$ species.

$$k_{\text{obs}} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{11} [\text{Eu}(\text{OH})_3]^3 \quad (12)$$

The cleavage of HPNPP is a transesterification reaction in contrast to BNPP, which undergoes a direct nucleophilic substitution by hydroxo anions. Therefore the participation of different active

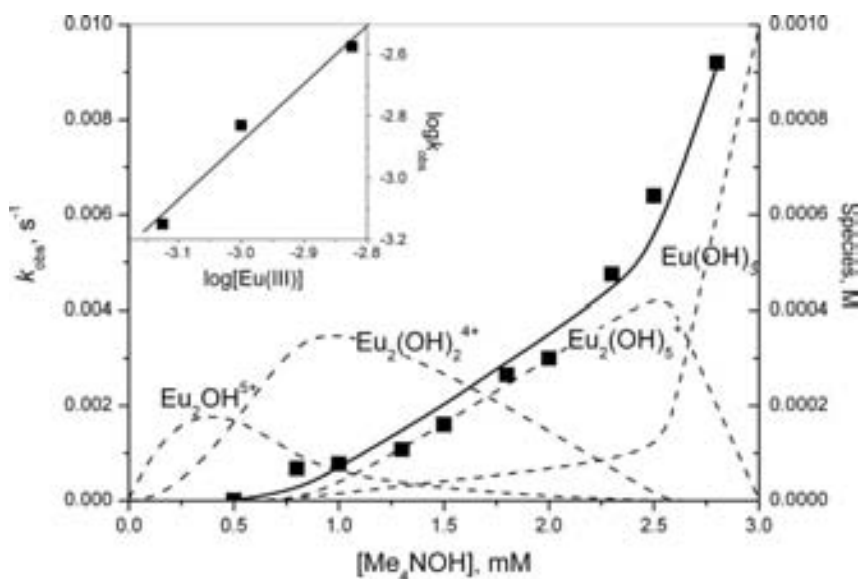


Fig. 8 Observed first-order rate constants for the hydrolysis of BNPP by 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ at variable concentrations of added $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% vol. DMSO at 25 °C. Dashed curves show the species concentrations given on the right axis. The solid line is the theoretical profile for k_{obs} calculated in accordance with the rate equations (10). Inset: dependence of k_{obs} on $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ concentration at constant $[\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})]/[\text{Eu}(\text{III})] = 2$.

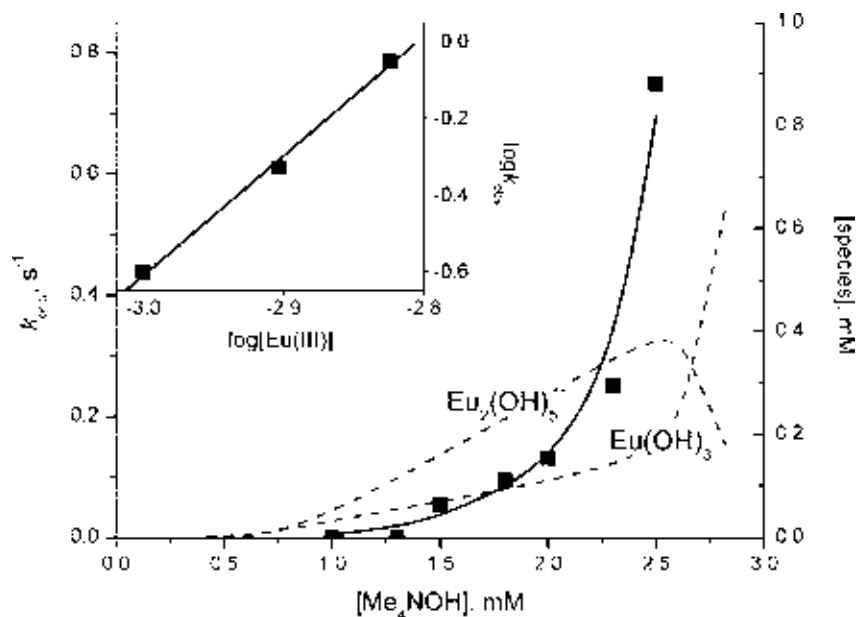


Fig. 9 Observed first-order rate constants for the hydrolysis of HPNPP by 1.00 mM $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ at variable concentrations of added $\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})$ in 80% vol. DMSO at 25 °C. Dashed curves show the species concentrations given on the right axis. The solid line is the theoretical profile for k_{obs} calculated in accordance with rate equations (12). Inset: dependence of k_{obs} on $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ concentration at constant $[\text{Me}_4\text{N}(\text{OH})]/[\text{Eu}(\text{III})] = 2.0$.

species for these substrates in principle is not surprising. However, if for BNPP we observe in 80% DMSO the same type of active species as in water, for HPNPP different species are involved. It was argued previously that this may be related to a possible change in the reaction mechanism for the latter.^{4c} In water transesterification of HPNPP involves fast reversible deprotonation of the hydroxyl group followed by intramolecular nucleophilic attack,¹⁷ but in 80% DMSO the pK_a of the hydroxyl group should increase strongly to approximately 20 and the degree of deprotonation at $\text{pH} < 10$, which corresponds to the pH range

of the kinetic measurements, becomes too small to explain the observed reaction rates. Therefore, the coordinated hydroxo anion should operate now as a general base, a role which does not exist in water, and this may require a different type of active species.

In conclusion, we would like to emphasize the suitability of direct excitation luminescence measurements for the study of speciation of lanthanide hydroxo complexes in combination with the traditional potentiometric technique. The results of this study together with previously reported potentiometric and kinetic

results for perchlorate solutions indicate that the use of mixed aqueous–organic solvents brings about both a desirable increase in catalytic activity and an undesirable complexity of speciation, which is strongly affected by the presence of such innocent anions as perchlorates even at low concentrations.

Experimental

Materials

Bis(4-nitrophenyl) phosphate (Aldrich) was recrystallized from ethanol–water. 2-Hydroxypropyl 4-nitrophenyl phosphate was prepared according to the literature procedure.¹⁸ Sodium triflate, reagent grade Eu(III) triflate and Me₄N(OH)·5H₂O, all from Aldrich, were used as supplied. Distilled and deionized water (Barnstead Nanopure system) was used. DMSO (Baker) was purified by distillation over CaO.

Potentiometry

Potentiometric titrations were performed in a 30-mL thermostatted cell kept under nitrogen at 25 ± 0.1 °C. Measurements of pH were carried out using an Orion model 710-A research digital pH meter while the titrant (Me₄NOH) solution was added to the system in small increments. Details of the electrode calibration and titration procedure are described in ref. 4c. The program HYPERQUAD 2003, version 3.0.51,¹⁹ was used to calculate all equilibrium constants. Species distribution diagrams were calculated by using HYSS 2003 software.^{19b}

Direct photoluminescence spectroscopy

Eu(III) excitation spectra and excited state lifetimes were obtained using a Spectra-Physics Quanta Ray PRO-270-10 Q-switched Nd:YAG pump laser (10 Hz, 60–70 mJ/pulse) and a MOPO-SL for all luminescence measurements described in detail elsewhere.⁷ Briefly, the ⁷F₀ → ⁵D₀ transition of the Eu(III) ion was scanned between 578 and 582 nm in 0.02 nm increments while the ⁵D₀ → ⁷F₂ emission band was monitored. The emission was passed through a 628 nm band-pass filter (Semrock, model FF01-628/27-25) and focused onto a time-gated photomultiplier tube module (Hamamatsu, model H7680-01MOD). Excitation spectra peaks were fit by using the program PeakFit v4.12 (Jandel), Gauss/Lorentz function. Time-resolved luminescence measurements were collected by using a digital Tektronix TDS 3034B oscilloscope. Data were fitted to a poly-exponential decay by using OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation). Emission spectra were collected in 1 nm increments using a monochromator, (CVI Laser Corporation CM110) and detected by a thermoelectrically-cooled Hamamatsu R928 photomultiplier tube.

Kinetics

Kinetic measurements were performed on a Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer equipped with a thermostatted cell compartment (recirculating water bath at 25 ± 0.1 °C). Reaction solutions were prepared by combining appropriate amounts of metal and tetramethylammonium hydroxide stock solutions to the desired volume. Reactions were initiated by adding an aliquot of the substrate solution.

The course of cleavage for all substrates was monitored spectrophotometrically by the appearance of 4-nitrophenolate anion at 420 nm. Stock solutions of BNPP and HPNPP were freshly prepared in water. First-order conditions with base concentrations (0.50–5.0 mM) at least 50 times greater than the substrate concentration (0.010 mM) were used. Because deprotonation of 4-nitrophenol at lower base concentrations was incomplete, a standard addition of 0.010 mM 4-nitrophenol was applied to each sample after the end of the reaction run to determine the apparent molar absorptivity under given conditions. The observed first-order rate constants (*k*_{obs}) were calculated by the integral method from at least 90% conversion or, for slow reactions, from initial rates.

Acknowledgements

The financial support of DGAPA UNAM (project IN 203408) is gratefully acknowledged. J.R.M. gratefully acknowledges the National Science Foundation (CHE0911375) for support and for a major instrumentation award (CHE-0321058) to build the MOPO laser system.

References

- Recent reviews: (a) C. Liu and L. Wang, *Dalton Trans.*, 2009, 227–239; (b) J. R. Morrow, *Comments Inorg. Chem.*, 2008, **29**, 169–188; (c) F. Mancin and P. Tecilla, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 800–817; (d) A. K. Yatsimirsky, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 1997–2011; (e) J. R. Morrow and O. Iranzo, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, **8**, 192–200; (f) N. H. Williams, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2004, **1697**, 279–287; (g) H. Morales-Rojas and R. A. Moss, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 2497–2591.
- Reviews on lanthanide catalysis: (a) S. Lim and S. J. Franklin, *Cell. Life Sci.*, 2004, **61**, 2184–2188; (b) H.-J. Schneider and A. K. Yatsimirsky, In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 40: The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems*, A. Sigel, H. Sigel, Eds.; Marcel Dekker, New York, 2003; Vol. 40, p 369; (c) S. J. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, **5**, 201–208; (d) M. Komiyama, N. Takeda and H. Shigekawa, *Chem. Commun.*, 1999, 1443–1452; (e) A. Blasko and T. C. Bruice, *Acc. Chem. Res.*, 1999, **32**, 475–484.
- (a) S. E. Bunn, C. T. Liu, Z. Lu, A. A. Neverov and R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 16238–16248; (b) W. Y. Tsang, D. R. Edwards, S. A. Melnychuk, C. T. Liu, C. Liu, A. A. Neverov, N. H. Williams and R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 4159–4166, and references therein.
- (a) P. Gómez-Tagle, I. Vargas-Zúñiga, O. Taran and A. K. Yatsimirsky, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 9713–9722; (b) O. Taran, F. Medrano and A. K. Yatsimirsky, *Dalton Trans.*, 2008, 6609–6618; (c) I. Sánchez-Lombardo and A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 2514–2525.
- G. Planque, V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **478**, 11–22.
- W. D. Horrocks, Jr and D. R. Sudnick, *Acc. Chem. Res.*, 1981, **14**, 384–392.
- C. M. Andolina, W. G. Holthoff, P. M. Page, R. A. Mathews, J. R. Morrow and F. V. Bright, *Appl. Spectrosc.*, 2009, **63**, 483–493.
- K. Nwe, J. P. Richard and J. R. Morrow, *Dalton Trans.*, 2007, 5171–5178.
- S. L. Wu, S. J. Franklin, K. N. Raymond and W. D. Horrocks, Jr., *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 162–167.
- F. Tanaka, Y. Kawasaki and S. Yamashita, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, 1988, **84**, 1083–1090.
- B. H. Lee, Y. J. Park and H. Moon, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1995, **16**, 654–657.
- J. Brevet, F. Claret and P. E. Reiller, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2009, **74**, 446, DOI: 10.1016/j.saa.2009.06.042.
- A. Nehlig, M. Elhabiri, I. Billard, A. Albrecht-Gary and K. Lützenkirchen, *Radiochim. Acta*, 2003, **91**, 37–43.

-
- 14 Z. Wang, A. R. Felmy, Y. X. Xia and M. J. Mason, *Radichim. Acta*, 2003, **91**, 329–337.
- 15 J. Chrysochoos, *J. Lumin.*, 1974, **9**, 79–93.
- 16 F. Aguilar-Perez, P. Gomez-Tagle, E. Collado-Fregoso and A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 9502–9517.
- 17 (a) M.-Y. Yang, O. Iranzo, J. P. Richard and J. R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1064–1065; (b) G. Feng, J. C. Mareque-Rivas, R. Torres Mart3n de Rosales and N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13470–13471.
- 18 D. M. Brown and D. A. Usher, *J. Chem. Soc.*, 1965, 6558–6564.
- 19 (a) P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739–1753; (b) L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini and A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 311–318.