



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“RUPTURA CATALÍTICA DE FOSFODIÉSTERES MODELOS DE ARN Y ADN
EMPLEANDO COMPLEJOS DE LANTÁNIDOS CON LIGANTES DERIVADOS DEL
ÁCIDO PICOLÍNICO, TRIS Y CICLODEXTRINAS”**

**TESIS PARA GRADUACIÓN POR EXAMEN PROFESIONAL
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

MARIEL RUIZ KUBLI

TUTOR

DR. ANATOLY YATSIMIRSKY
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Dra. María de Jesús Rosales Hoz	Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas
Dra. Elizabeth Gómez Pérez	Instituto de Química, UNAM
Dr. Ivan Castillo Pérez	Instituto de Química, UNAM
Dr. José Guadalupe López Cortés	Instituto de Química, UNAM

MÉXICO, D.F., OCTUBRE DE 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 213 de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. 478859).

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

- Simposio “Impacto de la Química de Coordinación en 100 años” llevado a cabo en la Facultad de Química en Ciudad Universitaria, México, D.F., el 3 y 4 de diciembre de 2013, en modalidad cartel.
- Advancing the Chemistry of the f-elements Dalton Discussion 14, realizado en Edimburgo, UK, del 28 al 30 de julio de 2014, en modalidad cartel.
- 49° Congreso Mexicano de Química, en la Ciudad de Mérida Yucatán, México, del 17 al 21 de septiembre de 2014, en modalidad oral.

AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM y al Posgrado en Ciencias Químicas.
- Al Dr. Anatoly K. Yatsimirsky por los conocimientos brindados, por su paciencia y apoyo otorgado.
- A los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente manuscrito.
- Al CONACYT por la beca otorgada (No. de registro 478859) para realizar los estudios de maestría.
- A DGAPA-UNAM por el apoyo financiero al proyecto IN214514.
- A la USAI de la Facultad de Química por permitir el uso del equipo de RMN.
- A la Dra. Paola Gómez Tagle y a la M. Mayte Abigail Martínez Aguirre por el apoyo brindado a lo largo de este trabajo.

Con todo el amor de mi corazón a mi familia,
especialmente a mis padres que con todo su cariño me han apoyado en el camino de la vida.
Y a mi abuelo Guillermo Kubli que me escucha desde el cielo.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ε	Absortividad molar
λ	Longitud de onda
A	Absorbancia
A_{inf}	Valor límite de la absorbancia al tiempo infinito
ABH	Ácido benzohidroxámico
AcAPCA	Ácido 6-acetilamino 2-piridincarboxílico
ACM	Ácido chelidámico
ACN	Ácido chelidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Ácido dipicolínico
AHC	Ácido 3-hidroxipiridin 2-carboxílico
AP	Ácido picolínico
APCA	Ácido 6-aminopiridina 2-carboxílico
APH	Ácido 2-piridinhidroxámico
ARN	Ácido ribonucleico
AFB	Ácido fenilborónico
Bis-Tris (BT)	2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitilotrietanol
BDNPP	Bis(2,4-dinitrofenil) fosfato
BNPP	Bis(<i>p</i> -nitrofenil) fosfato
BTP	Bis-tris propano (1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano)
°C	Grados Celsius
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino) etanolsulfónico
EDTA	Ácido 2-([2-[bis(carboximetil)amino]etil](carboximetil)amino)acético
ENPP	Etil-4-nitrofenilfosfato
Eq	Equivalente
EPSP	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-Piperazinpropanosulfónico
HPNPP	2-hidroxi-4-nitrofenilfosfato o 2-hidroxi- <i>p</i> -nitrofenilfosfato
4-ICA	Ácido 4-Imidazolcarboxílico
<i>I</i>	Fuerza iónica
<i>k</i>	Constante de velocidad
k_{non}	Constante de velocidad para la reacción no catalizada
K_f	Constante de formación
K_m	Constante de Michaelis- Menten
k_{cat}	Constante de velocidad de la reacción catalizada
k_{OH}	Constante de velocidad para la hidrólisis alcalina
k_{obs}	Constante de velocidad observada
K_{OH}	Constante de formación de hidroxocomplejos
K_a	Constante de acidez
Ln	Lantánidos

MNPP	Metil-4-nitrofenilfosfato
MOPS	Ácido 3-morfolin propanosulfónico
NP ⁻	Ion 4-nitrofenolato
NPA	Acetato de 4-nitrofenilo
NPDPP	4-nitrofenil difenil fosfato
NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfato
Nu	Nucleófilo
pK_a	Constante de disociación ácida
ppm	Partes por millón
<i>p</i> -NF ⁻	Ion para-nitrofenolato
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón ¹ H
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UpNP	Uridina 3' nitrofenilfosfato
UV -Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visible

RESUMEN

La catálisis por iones metálicos en la hidrólisis de ésteres de fosfato ha sido ampliamente estudiada como una forma de desarrollar nucleasas artificiales para aplicaciones biomédicas y medicinales. Los sistemas catalíticos más activos, con perspectivas prácticas, están basados en complejos de lantánidos(III) ^[1]. Su éxito depende del uso apropiado de ligantes estabilizadores, que puedan prevenir la precipitación del hidróxido metálico en soluciones neutras y poco básicas, y que mantengan las sobresalientes propiedades catalíticas de estos iones metálicos. El presente trabajo está basado en las observaciones previas con respecto al efecto de estabilización posible de ligantes como derivados del ácido picolínico ^[2], y polihidroxiolos tales como TRIS ^[3] y ciclodextrinas ^[4] explorando así la actividad catalítica de sus complejos con lantánidos para el desarrollo de fosfodiesterasas artificiales.

Se realizaron estudios cinéticos de la hidrólisis de 2-hidroxiopropil 4-nitrofenil fosfato (HPNPP) y bis(4-nitrofenil) fosfato (BNPP) como sustratos modelos de ARN y ADN, respectivamente, en la presencia de percloratos de La(III), Pr(III), Nd(III), Eu(III), Gd(III) y Dy(III) en medio acuoso, en el rango de pH de 7.0 a 9.5 y 25°C. El curso de la hidrólisis de HPNPP y BNPP se monitoreó por la aparición del anión 4-nitrofenolato por espectroscopía de UV-vis a 400 nm. Por otro lado, para asignar las especies cinéticamente activas, es decir, aquellas que están involucradas en la hidrólisis de HPNPP y BNPP se realizaron estudios potenciométricos y por RMN ¹H.

Uno de los ligantes más estudiados en el presente trabajo fue el derivado de Tris, Bis-Tris (BT: 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitrilotrietanol). Las titulaciones potenciométricas con este ligante mostraron la formación de complejos mononucleares de lantánidos(III) notablemente estables de composición ML(OH)_n con n=0-3. Las constantes de velocidad observadas (*k*_{obs}) en la ruptura catalítica de ambos sustratos mostraron un incremento al aumentar el pH. Se construyeron diagramas de distribución de especies para cada ión metálico estudiado y se obtuvieron las especies cinéticamente activas; para la hidrólisis de HPNPP las especies activas fueron con n=1, 2 ó 3 mientras que con BNPP fueron las especies con n=2 ó 3. De correlaciones de *k*_{obs} con las especies calculadas en los diagramas de distribución se obtuvieron las constantes de segundo orden (*k*₂). Generalmente *k*₂ fue 10 veces mayor con HPNPP que con BNPP para las mismas especies; sus valores aumentaron con hidroxocomplejos con n más alta y decrecieron para lantánidos con mayor número atómico. El efecto catalítico con 1 mM del complejo lantánido-BT fue por arriba de 10³ para HPNPP y de 10⁶ para BNPP a pH 9; en otras palabras, la eficiencia catalítica comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea fue 1000 veces mayor para BNPP que para HPNP a este pH.

Por otro lado, menos estables, pero más reactivos con los sustratos bajo estudio, fueron los complejos formados con ciclodextrinas (CDs) como ligantes. Se probaron varias CDs nativas y modificadas y la que mejores resultados dio fue β-CD. El efecto catalítico con 2 mM del complejo lantánido-β-CD fue por arriba de 10⁵ para HPNPP y de 10⁸ para BNPP a pH 8. Análisis de las dependencias de la concentración y de pH de *k*_{obs} para los diferentes lantánidos mostraron que las posibles especies activas son polihidroxocomplejos binucleares del tipo M₂CD(OH)_n. El tipo de interacción metal-CD fue estudiado por ¹H RMN.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ésteres de fosfato y su importancia biológica	1
1.1.1 Generalidades del ARN y ADN	1
1.2 Enzimas que catalizan la ruptura del enlace fosfodiéster	3
1.2.1 Mecanismos enzimáticos de la ruptura del enlace fosfodiéster.....	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Nucleasas artificiales	8
2.1.1 Ésteres fosfatos empleados para mimetizar estudios de ruptura	9
2.1.2 Complejos mononucleares.....	10
2.1.3 Complejos multinucleares	11
2.1.4 Propiedades de los iones lantánidos como centros metálicos en la formación de complejos.....	13
2.1.5 Formación de Complejos con lantánidos(III) en agua y su uso en catálisis.....	15
2.1.5.1 Diseño de nucleasas con ligantes aminocarboxilato.....	16
2.1.5.2 . Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligantes monocarboxilatos de piridina.....	18
2.1.5.3 Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligantes derivados de Tris	19
2.1.5.3.1 Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligante Bis-Tris.....	20
2.1.5.3.2 Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligante Bis-Tris Propano	22
2.1.5.4 Complejos de iones metálicos con ciclodextrinas	26
2.1.5.5 Resumen de ligantes con diferentes centros metálicos empleados como catalizadores y constantes de velocidad observadas en la hidrólisis de HPNPP y BNPP .	27
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivos particulares.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1 Reactivos	32
4.2 Métodos	34
4.2.1 Determinación de la concentración de lantánidos(III)	34
4.2.2 Estudios cinéticos	34
4.2.3 Estudios potenciométricos.....	36
4.2.4. Estudios por RMN ¹ H.....	37
4.2.5. Programas de Cómputo	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Hidrólisis de HPNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) con ligantes derivados de ácido picolínico	38
5.1.1 Análisis del efecto de amortiguador	43

5.1.2 Caracterización de las especies presentes en la disolución	44
5.2 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) con ligantes derivados de Tris	48
5.3 Formación y estabilidad de hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris	50
5.3.1 Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H en sistemas con Bis-Tris	52
5.4 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris	56
5.4.1 Análisis de la hidrólisis de HPNPP por hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris	58
5.4.2. Análisis de la hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris	61
5.4.3 Comparación entre los sustrato HPNPP y BNPP en el sistema Bis-Tris en presencia de metales lantánidos(III)	63
5.5 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) derivados de Ciclodextrinas	67
5.5.1 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) y β-Ciclodextrina	69
5.5.2 Espectros de RMN ¹ H de β-Ciclodextrina con metales lantánidos(III)	73
5.5.3 Titulación de β-Ciclodextrina por HPNPP y BNPP por ¹ H RMN	75
6. CONCLUSIONES	77
7. ANEXOS	78
8. BIBLIOGRAFÍA	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ésteres de fosfato y su importancia biológica

Los ésteres de fosfato (también llamados fosfoésteres) forman parte vital en el ámbito biológico ya que cumplen una serie de funciones clave en los organismos vivos. Los podemos encontrar en el esqueleto del ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN), en donde los ésteres de fosfato son las estructuras que enlazan las unidades de nucleósidos dentro de estos polímeros. También los podemos encontrar en el grupo hidrofílico de los fosfolípidos (como componente principal de las membranas celulares) y en muchas moléculas pequeñas que juegan un papel clave en el metabolismo, incluyendo varios cofactores orgánicos (ATP, coenzima A, FAD, NAD⁺) y segundos mensajeros (AMPc, GMPc, IP3). Por otro lado, la fosforilación de proteínas, que implica la transformación reversible de los grupos OH en los residuos de Serina, Treonina o Tirosina en monoésteres de fosfato, es extremadamente importante en los mecanismos regulatorios de las células^[5]; el proceso induce cambios conformacionales en las enzimas y en los receptores, que causan que estén activadas o desactivadas (actuando como switches moleculares) para así controlar funciones de la proteína, como localización subcelular, formación de complejos y la degradación de proteínas^[6].

1.1.1 Generalidades del ARN y ADN

Una de las características fundamentales de los seres vivos es su capacidad de reproducirse, siendo entonces de vital importancia que la información que confiere cada forma de vida individual sea protegida y transmitida a la descendencia. Las biomoléculas utilizadas para el almacenamiento de la información genética son el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Figura 1). Estas moléculas fueron elegidas por la naturaleza debido a su alta estabilidad química ya que son resistentes a la hidrólisis de sus enlaces fosfodiéster en medio fisiológico y pH=7^[7].

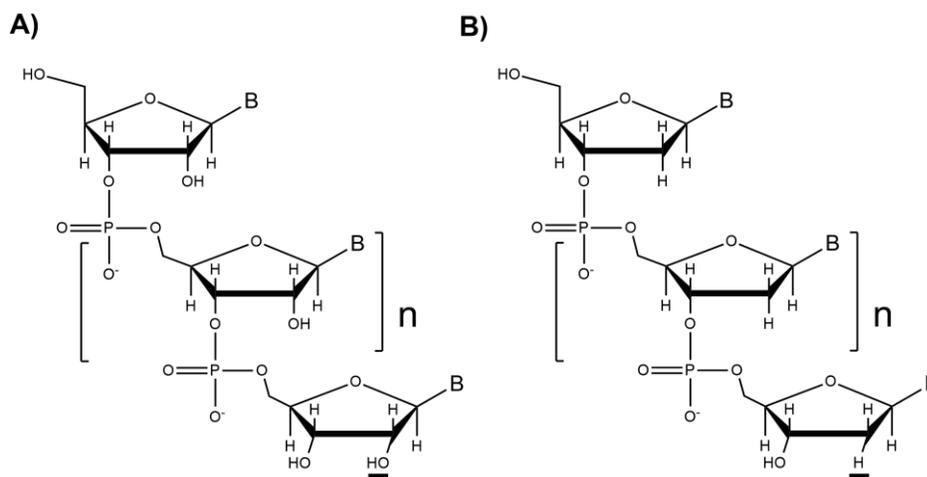


Figura 1. Estructura del **A)** ARN y **B)** ADN.

Por otro lado, la ruptura del ARN y ADN es necesaria para mantener procesos celulares, ésta puede ocurrir por dos rutas: ruptura oxidativa y ruptura nucleofílica. La ruptura oxidativa generalmente procede a través de la abstracción de un átomo de hidrogeno del azúcar, lo que conduce a una ruptura en cadena para la formación final de un grupo cetona en el azúcar y la liberación de PO_4R^{2-} (Figura 2-A). Por otro lado, en la ruptura nucleofílica, el reactivo nucleófilo entrante ataca al átomo de fósforo y se forma un estado de transición pentacoordinado (Figura 2-B). Esta especie tiene una geometría bipiramidal trigonal centrada sobre el átomo de fósforo, con el nucleófilo entrante en un vértice de las dos pirámides y el grupo que es desplazado (grupo saliente, R'), subsecuentemente esta la expulsión del grupo saliente que es un grupo alcohol o alcóxido. Dependiendo de la estructura del sustrato, el paso determinante de la reacción es el ataque nucleofílico o la ruptura del intermediario [8].

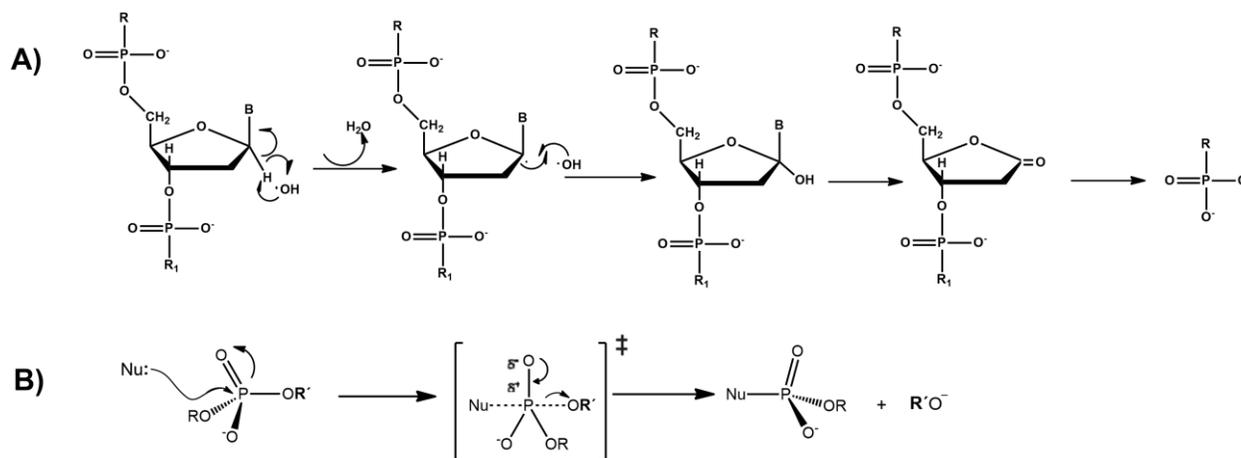


Figura 2. Descripción del mecanismo de la ruptura **A)** oxidativa y **B)** nucleofílica del enlace fosfodiéster.

Cuando el nucleófilo es un alcohol o alcóxido, el proceso es conocido como *transesterificación*, mientras que si es atacado por agua o por un nucleófilo hidróxido, es llamado *hidrólisis*. Tanto el ARN y el ADN pueden ser hidrolizados, sin embargo, el tiempo de vida media estimado para el ARN y ADN es de 100 y 30,000,000 años, respectivamente a pH 7 y 25°C [7]. Esta diferencia ha hecho que mientras que el ARN se hidroliza más fácilmente, el ADN sea adecuado para el almacenamiento a largo plazo de la información genética. La diferencia de ello es la presencia del grupo 2'-OH en el azúcar que funciona como nucleófilo intramolecular y promueve su hidrólisis mediante una transesterificación intramolecular (Figura 3) [9].

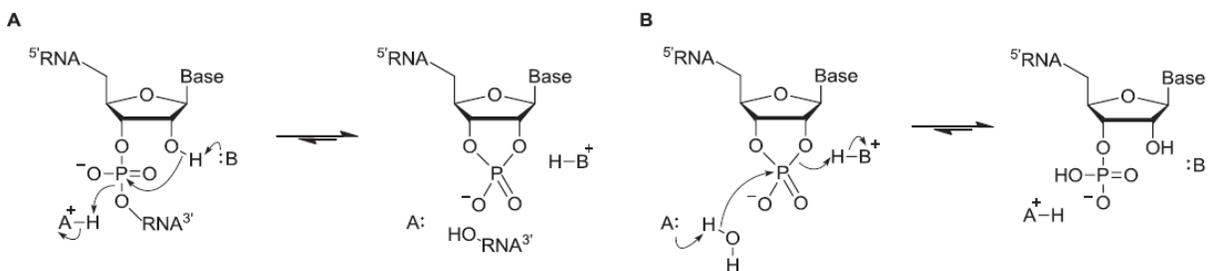


Figura 3. Ruptura de ARN por medio de una transesterificación catalizada por un par ácido-base (A). El fosfodiéster 2',3'-cíclico resultante puede reaccionar a continuación con agua o hidróxido para formar una mezcla de monoésteres 2' y 3'-fosfato (B).

1.2 Enzimas que catalizan la ruptura del enlace fosfodiéster

La cadena del ADN es relativamente estable frente a la hidrólisis, pero la ruptura del enlace P-O es un requisito para la reparación de ADN, la degradación del ADN extraño y el ADN de la célula anfitrión después de la infección, la maduración del ARN, así como el almacenamiento y producción de la energía [10].

En la naturaleza numerosas enzimas catalizan la ruptura del enlace fosfodiéster acelerando la reacción de hidrólisis; son capaces de acelerar las velocidades de las reacciones de hidrólisis específicas a P-O por factores de $> 10^{15}$ en comparación con la reacción no catalizada. Estas enzimas, se clasifican según el polinucleótido que hidrolizan y los enlaces que se rompen. Las *fosfodiesterasas* promueven la hidrólisis de enlaces fosfodiésteres, las *fosfotriesterasas* se encargan de la ruptura de enlaces fosfotriéster, las *fosfatasas* de la desfosforilación de los monoésteres fosfatos para producir fosfato inorgánico y alcoholes. Así mismo, existen enzimas

del ácido ribonucleico, conocidas como *ribozimas*, éstas catalizan la hidrólisis de sus propios enlaces fosfodiéster o enlaces de otros ARNs, así mismo llevan a cabo reacciones de transferencia de grupos fosforilo [6, 11].

Dentro de la familia de las fosfodiesterasas, están las *nucleasas*, que se encargan de promover la ruptura de los enlaces fosfodiéster en el ARN y ADN. Las fosfodiesterasas se dividen en *ribonucleasas* (RNAsas) y *deoxyribonucleasas* (DNAsas); la actividad de las primeras es crucial en la degradación de ARN en componentes más pequeños ya que los niveles de ARN están relacionados con la producción de proteínas, mientras que las segundas juegan un papel importante en la reparación del ADN para mantener una actividad correcta en la célula y la transmisión del genoma a la progenie.

Los sitios activos de la mayoría de las nucleasas contienen cationes divalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} , los cuales son esenciales en la actividad catalítica. Sin embargo, el tipo de centro metálico y el número de iones metálicos varía considerablemente de una nucleasa a otra [12]. Las nucleasas se subdividen en *exonucleasas* y *endonucleasas* [13].

Un ejemplo de una endonucleasa es la enzima EcoRI, extraída de *Escherichia coli*, emplea un solo centro metálico (Mg^{2+}) para asistir la hidrólisis de ADN [14]. Otro ejemplo es la RNAsa H, se encarga de la ruptura del enlace 3'-O-P del ARN en el complejo ADN/ARN por medio de un mecanismo ácido-base asistido por el centro metálico Mg^{2+} para producir 3' hidroxilo y 5' fosfato (Figura 4) [15].

Las RNAsas pueden ser encontradas en casi todos los organismos, y son ampliamente usadas en laboratorios de biología molecular para destruir el molde de ARN después de la síntesis de la primera cadena complementaria del ADN (ADNc) producida en la transcripción inversa.

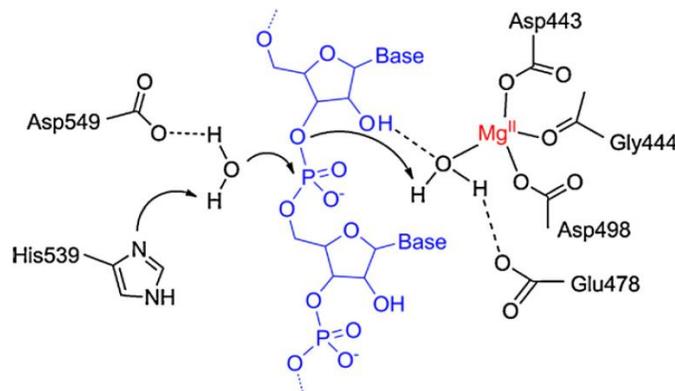


Figura 4. Representación esquemática del sitio activo de la RNAsa H-HIV, esquematiza la ruptura del enlace fosfodiéster mediante un mecanismo ácido base [15].

Algunas nucleasas y fosfatasas son capaces de acelerar la velocidad de hidrólisis en un factor por arriba de 10^{16} y 10^{21} , respectivamente ^[6]. Los sustratos de las fosfatasas pueden ser oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas. Dentro de las fosfatasas encontramos dos clases, las *fosfatasas ácidas* y *alcalinas*, como su nombre lo indica son más activas a pH ácidos y básicos, respectivamente. Las fosfatasas ácidas se dividen en no-metaloenzimas y metaloenzimas ^[16]. Las mejores metaloenzimas estudiadas son las *fosfatasas ácidas púrpuras* (PAPs), recientemente se descubrió que hidrolizan ciertos ésteres fosfato ^[17], contienen un complejo binuclear $Fe^{3+}-M^{2+}$ (donde M puede ser Fe o Zn) en su sitio activo (Figura 5) ^[18].

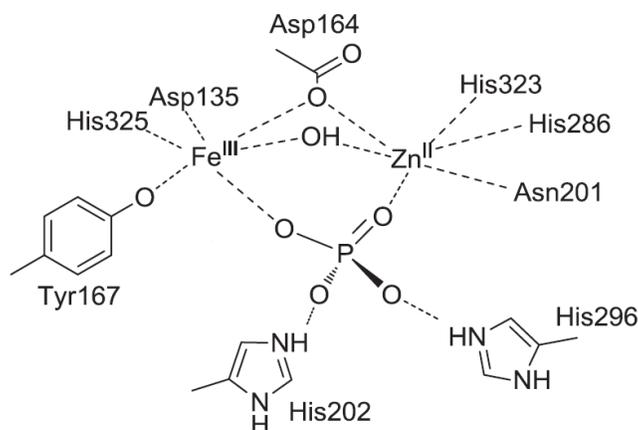


Figura 5. Representación esquemática del sitio activo de PAP ^[18b].

1.2.1 Mecanismos enzimáticos de la ruptura del enlace fosfodiéster

Los mecanismos de ruptura hidrolítica de ésteres de fosfato en las nucleasas, fosfatasas y ribozimas han sido de interés de muchas investigaciones ya que reducen la energía de activación asociada a la ruptura hidrolítica. Utilizando el ejemplo de las enzimas PAP, el ciclo catalítico de la enzima lleva a cabo tres pasos (Figura 6): 1) el sustrato es enlazado y activado al coordinarse con el ion metálico (ácido de Lewis) y por interacciones tipo enlace de hidrógeno con los protones de residuos de aminoácido cercanos al sitio activo; 2) los iones metálicos y los protones de los aminoácidos cercanos al sitio activo proveen un ambiente con carga positiva que promueven la formación del fosforo pentavalente (estado de transición) como resultado del ataque nucleofílico; y 3) la salida del grupo saliente alcóxido es asistido a través de interacciones con los iones metálicos y/o con los residuos de aminoácidos del sitio activo.

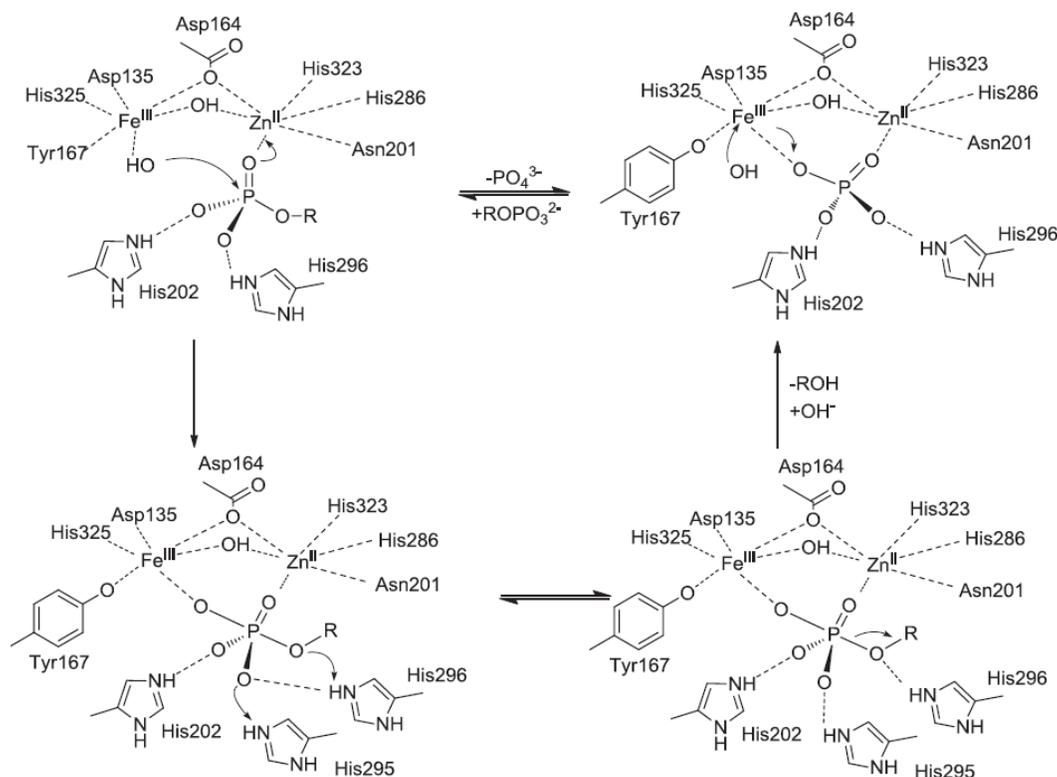


Figura 6. Ciclo catalítico propuesto para PAP de la alubia roja ^[18b].

Es importante destacar que las altas actividades catalíticas de las fosfatasas y nucleasas son debidas en parte al ambiente hidrofóbico del sitio activo ^[19] y a que facilitan la ruptura del sustrato al hacer que éste adopte una posición en la que se promueve la formación del estado de transición (un prerrequisito para que se rompa la cadena) ^[7]. Las altas eficiencias de las rupturas por nucleasas/fosfatasas son la consecuencia no sólo de la activación por parte de grupos del sitio activo, sino también de la alta afinidad que tienen por los sustratos. Esta eficiencia puede ser expresada como k_{cat}/K_M , donde k_{cat} es el número de moléculas de sustrato que son rotas por una molécula de catalizador por segundo, y K_M es la constante de Michaelis-Menten que corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. La relación k_{cat}/K_M tiene sentido de una constante de velocidad de segundo orden entre sustrato y el centro activo de la enzima y puede ser comparada con la constante de velocidad de hidrólisis acuosa no-catalítica.

Las nucleasas naturales se usan ampliamente para el manejo de ácidos nucleicos, sin embargo, hay 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 podría permitir su ruptura en fragmentos más largos, lo cual es importante para descodificar la información genética. Un ejemplo del uso de nucleasas naturales está en la técnica de “foot-printing”, la cual se utiliza para la determinación de sitios de interacción de ADN con proteínas, ésta requiere una ruptura de ADN no específica pero completa que es más fácil de realizar utilizando nucleasas artificiales. Se espera que los agentes químicos capaces de fraccionar ADN en condiciones fisiológicas puedan tener aplicaciones en medicina como fármacos contra el cáncer ^[20].

2. ANTECEDENTES

2.1 Nucleasas artificiales

En las últimas décadas, los químicos han buscado desarrollar imitaciones sintéticas de bajo peso molecular de las enzimas, no sólo para ayudar a mejorar la comprensión fundamental de los aspectos mecanísticos de la acción enzimática, sino también con el fin de desarrollar nuevas herramientas biotecnológicas, como enzimas de restricción artificial y agentes de “foot-printing” (usadas para mapear la estructura de ácidos nucleicos y sus aductos con ligantes, proteínas o ácidos nucleicos en disolución) y terapias focalizadas a ácidos nucleicos ^[21]. Es por ello que se han diseñado nucleasas artificiales enfocadas en imitar los centros activos de las enzimas naturales por estructuras simples que posean el mínimo de componentes de las características esenciales para la catálisis. Estas enzimas artificiales, diseñadas para romper ARN y ADN son poco eficientes y menos específicas comparándolas con las enzimas naturales, sin embargo, el diseño primitivo es más pequeño y puede funcionar en una amplia gama de condiciones. Principalmente los estudios se enfocan en desarrollar moléculas orgánicas y/o complejos metálicos capaces de romper el ARN bajo condiciones fisiológicas y en compuestos que generan radicales de oxígeno que pueden causar la degradación oxidativa del ADN ^[20b].

Las nucleasas artificiales están basadas en el uso de complejos metálicos que activen el enlace P-O e hidrolicen ésteres de fosfato. El estado actual del área está reflejado en numerosos revisiones ^[6, 14b, 20a, 22]. Para que un ión metálico funcione como catalizador debe de ser un ácido duro, llevar a cabo procesos de sustitución de ligantes rápidamente, tener preferentemente números de coordinación altos y sitios de coordinación vacantes en posición *cis* para poder enlazar al sustrato y al nucleófilo garantizando su proximidad. Los metales más utilizados en la construcción de complejos son Zn^{2+} , Cu^{2+} y lantánidos³⁺ ^[23]. Debido a que los metales alcalinotérreos son ácidos de Lewis débiles, su baja actividad catalítica no es sorprendente, la explicación de porqué son eficientes en sistemas biológicos tiene que ver con la formación de hidroxocomplejos activos catalíticamente en sistemas neutros, una vez formadas estos complejos, pueden ser muy reactivos.

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

2.1.1 Ésteres fosfatos empleados para mimetizar estudios de ruptura

En los últimos años, los investigadores han propuesto sustratos no naturales que han servido para mimetizar el enlace éster fosfato en el ARN y ADN, para así poder estudiar la actividad de la ruptura de dichos enlaces. Los tres más usados como modelos de ADN son bis(4-nitrofenil) fosfato (BNPP), bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) y etil-4-nitrofenilfosfato (ENPP) (Figura 7). La ruptura de estas moléculas da como producto el ion 4-nitrofenolato (NP^-), el cual tiene un máximo de absorción a 400 nm (el coeficiente de extinción molar para el nitrofenolato es de $18,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y puede ser monitoreado convenientemente por espectroscopia UV-visible [24]. Para mimetizar el ambiente del enlace fosfodiéster en el ARN un grupo hidroxilo tiene que ser incluido en la molécula para que juegue el rol del grupo 2'-hidroxilo. La molécula modelo de ARN más empleada es 2-hidroxiopropil 4-nitrofenil fosfato (HPNPP), así mismo se han ocupado los nucleósidos 3'-nitrofenilfosfato, tal como la uridina 3'-nitrofenilfosfato (UpNP) (Figura 7).

El producto de la ruptura de BNPP, 4-nitrofenil fosfato (NPP), es comúnmente usado como modelo de monoésteres fosfato naturales. Sin embargo, es importante destacar que estos sustratos son “activados” a través de la ruptura porque el anión NP^- se estabiliza por sus estructuras de resonancia. Así mismo, las tendencias de reactividad no necesariamente se mantienen al pasar del modelo activo del éster fosfato tal como BNPP a un ácido nucleico tal como el ADN de un plásmido [25].

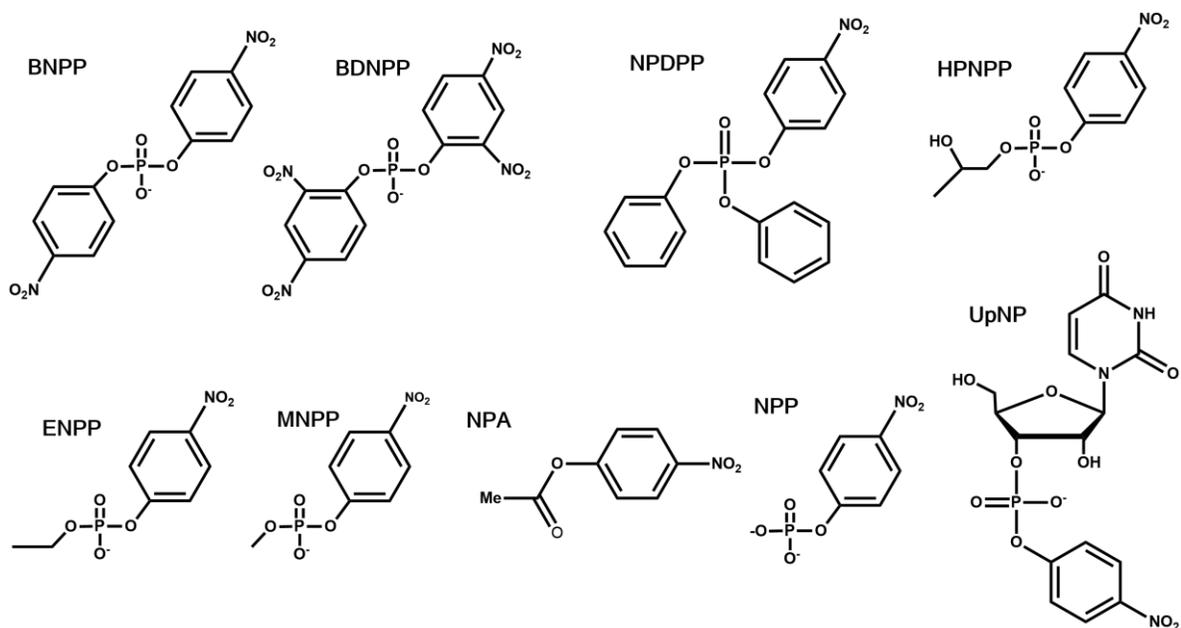


Figura 7. Sustratos no naturales comúnmente usados para evaluar la capacidad de los complejos metálicos para la ruptura de ésteres de fosfato ^[6].

2.1.2 Complejos mononucleares

Los primeros complejos mononucleares estudiados se coordinaron con Zn^{2+} y Cu^{2+} ; debido a que gran parte de las metaloenzimas hidrolíticas incorporan iones de Zn^{2+} en sus centros activos. Además, ambos iones metálicos son ácidos de Lewis relativamente fuertes, lo que permite la polarización del enlace P-O en sustratos y activa el centro de fósforo para un ataque nucleofílico. Otra característica es que valores de pK_a de las moléculas de agua ligadas a Cu^{2+} o Zn^{2+} caen en un rango de pH entre 7 y 9, propiciando que los complejos promuevan la reacción hidrolítica a un pH cercano a las condiciones fisiológicas ^[6].

Alrededor de los años 90s, Burstyn y Deal. estudiaron a detalle la cinética y mecanismo de la ruptura de BNPP y ENPP por el complejo Cu^{2+} en coordinación con el ligante macrocíclico tridentado [9] aneN₃ (1,4,7, triazaciclonona) ^[26]. La especie catalíticamente activa es el monohidroxo $[Cu([9]aneN_3)(OH)OH_2]^+$ (Figura 8), la ruptura ocurre después de la formación del complejo intermediario catalizador-sustrato, seguido de un ataque intramolecular de un nucleófilo hidróxido coordinado para eliminar el ion *p*-nitrofenol, finalmente se libera el fosfomonoéster NPP para regenerar la catálisis. La aceleración de la hidrólisis de BNPP ocurrió en un factor de 10^3 comparada con la velocidad de hidrólisis del metal sin el ligante ^[27]. Más

allá, la funcionalización de los nitrógenos secundarios de [9]aneN₃ con tres grupos isopropilos produce una mejora de 70 veces de la velocidad de hidrólisis de BNPP por el complejo con Cu²⁺ ($k_{\text{obs}}=4.3 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ (a pH 9.2 y 50°C, 200 μM del complejo)) [28].

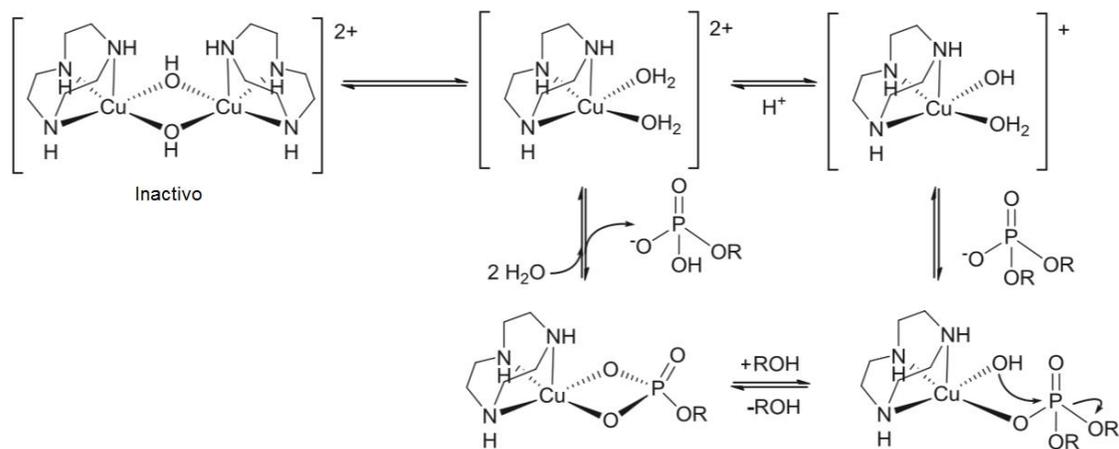


Figura 8. Ciclo catalítico propuesto para la hidrólisis de BNPP por Cu²⁺-[9]aneN₃. Esquema adaptado por [6] de [27].

2.1.3 Complejos multinucleares

Hay enzimas hidrolíticas que contienen dos o tres iones metálicos en su centro activo y éstos operan en forma cooperativa y sinérgica para la ruptura de sustratos. Por lo tanto, no es de sorprenderse el interés en el desarrollo de complejos metálicos bi y trinucleares para obtener catalizadores más activos para la ruptura de fosfodiésteres. Los ligantes sintetizados se diseñan para que sean capaces de acomplejar simultáneamente dos o más centros metálicos dentro de un sistema macrocíclico o uniendo dos o más motivos de enlaces metálicos por unidades espaciadoras (estrategia espaciadora) [6].

Chapman y Breslow [29] realizaron la síntesis de ligantes binucleantes con dos macrociclos 1,4,7-triazaciclododecanos unidos por varias unidades espaciadoras y utilizando Zn²⁺ como centro metálico en el complejo y así estudiar la velocidad de hidrólisis de los ésteres de fosfato. El complejo con el espaciador 1,4-fenil (Estructura A, Figura 9) hidroliza el fosfomonoéster NPP 6 veces más rápido comparada con la velocidad de su análogo monomérico o con el dímero con un espaciador más largo 4,4'-bifenil (Estructura B, Figura 9). Esto sugiere que en este complejo, los dos centros metálicos de Zn²⁺ unen el sustrato y lo activan recordándonos el ejemplo de la

fosfatasa alcalina. Aun así, el complejo B, es más activo en la hidrólisis de fosfodiésteres (BNPP y HPNPP); la hidrólisis de BNPP es 5 veces más rápida comparada con su análogo mononuclear ($k_{\text{obs}}=6.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (a pH 8.4 y 55°C, 227 mM del complejo)) y 2000 veces mejor comparado con la velocidad del metal sin la presencia del ligante. En este caso, el mecanismo propuesto lleva a cabo la activación del ácido de Lewis del sustrato por un centro metálico de Zn^{2+} con el otro centro metálico llevando el ataque nucleofílico (el grupo hidróxido y el alcóxido en el caso de BNPP y HPNPP, respectivamente). Años más tarde, se sugirió que el incremento en la reactividad en el complejo B era atribuido a interacciones tipo π entre el espaciador bifenilo y los grupos aromáticos del sustrato ^[30].

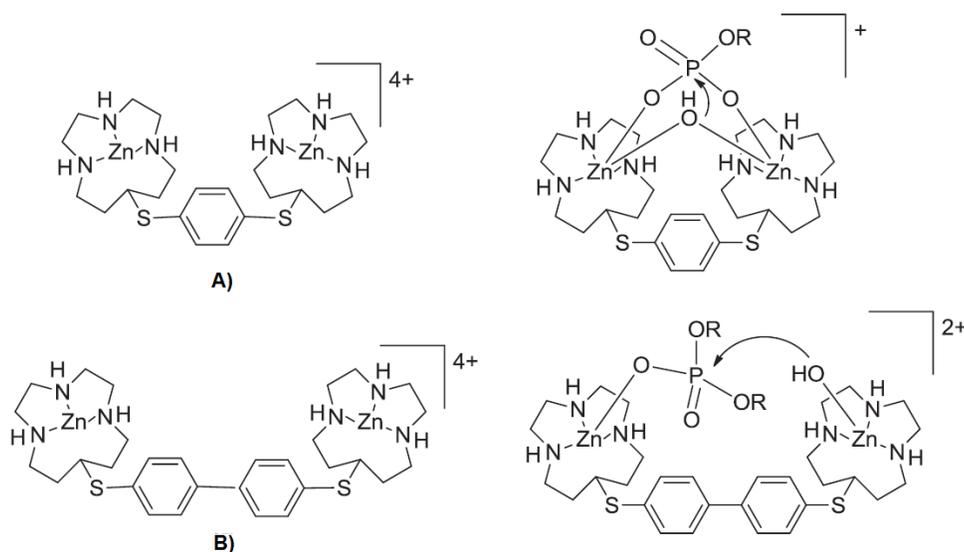


Figura 9. Estructuras de complejos binucleares propuestos por Chapman y Breslow y las propuestas de los mecanismos de ruptura de sustratos con enlace fosfodiéster.

Por otro lado, en el 2002 Iranzo *et al.* sintetizaron el complejo binuclear $\text{Zn}_2(\text{LO})$ (Figura 10) y estudiaron la ruptura catalítica de HPNPP a diferentes valores de pH. De los perfiles de pH se obtuvieron constantes de velocidad de segundo orden. Con este trabajo, reportaron la actividad catalítica más alta encontrada hasta el momento con una $k_c=0.71 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 10.05 y 25°C. Los autores explican que esta alta actividad catalítica del complejo $\text{Zn}_2(\text{LO})$ se debe a la función cooperativa de los dos iones metálicos al proveer una estabilización adicional al estado de transición para la ruptura del enlace fosfodiéster ^[31].

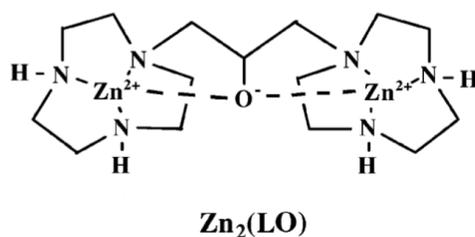


Figura 10. Complejo binuclear propuesto por Iranzo *et al.* ^[31].

Entre la literatura de sistemas catalíticos reportados para la hidrólisis de fosfodiésteres, los más activos son complejos con metales con altas cargas: lantánidos(III) ^[32] Ce(IV) ^[33], Th(IV) ^[34], y Zr(IV) ^[35]. Dentro de este grupo de catalizadores, los lantánidos(III) tienen la ventaja de ser menos sensibles a la hidrólisis del metal en soluciones neutras, lo que conduce finalmente a la precipitación del hidróxido metálico y en la pérdida de la actividad ^[3a]. Por estas razones hablaremos entonces de las propiedades de los iones lantánidos como centros metálicos en la formación de complejos.

2.1.4 Propiedades de los iones lantánidos como centros metálicos en la formación de complejos

Las propiedades de coordinación de los cationes lantánidos han sido discutidas en varias reseñas ^[36]. Los cationes de lantánidos trivalentes se comportan como ácidos de Lewis “duros” con unión de ligante predominantemente electrostático no-direccional. Consecuentemente, estos iones tienen afinidad alta a ligantes “duros” con donadores de átomos de oxígeno y a grupos cargados negativamente. Presentan altos números de coordinación; números por arriba de 12 son típicos para los complejos de lantánidos. En la serie de los lantánidos, el radio iónico decrece cuando aumentamos el número atómico (Tabla 1). No obstante, debe ser notado que hay una dependencia significativa entre el radio iónico y el número de coordinación; a menudo éste último es desconocido o puede ser variable, lo que hace que las correlaciones con los radios iónicos de los lantánidos sea incierta ^[36b].

Los cationes lantánidos en agua no tienen afinidades detectables a amoníaco y a ligantes de poliaminas acíclicas. Se unen fuertemente a aniones duros como el F⁻ (log $K \approx 3$), pero el enlace con otros monoaniones inorgánicos simples como el Cl⁻ es débil (log $K \approx 0$). Los carboxilatos

forman complejos más estables ^[20a]. A pesar de una disminución monótonica en el tamaño de cationes en la serie de los lantánidos, las tendencias de las constantes de estabilidad no son a menudo monótonas ^[36a]. Este es un fenómeno general en el que no existe una explicación clara, aunque se ha propuesto que tal vez se esté relacionado con un patrón complejo de la deshidratación de cationes con diferentes tamaños ante su complejación ^[36a].

La acidez de los acuo- lantánidos incrementa al ir hacia cationes más pesados. De los valores de pK_a dados en la tabla 1, se puede ver que la formación significativa de un hidroxocomplejo metálico ocurre a un pH por arriba de 7. Los hidroxocomplejos tienden a agregarse formando especies di- y polinucleares, como $M_2(OH)_2^{4+}$ y $M_5(OH)_9^{6+}$ ^[37]. La formación del complejo binuclear $La_2(OH)_5^+$ fue reportado de una solución diluida (2 mM) de $LaCl_3$, a pH básico ^[32j]. El catión Ce^{4+} , el cual es muy ácido ($pK_a=0.7$ ^[38]), es fuertemente hidrolizado en soluciones ácidas, pero proporciona especies poliméricas e hidroxogel en soluciones neutras, haciendo que sea difícil obtener resultados reproducibles.

Tabla 1. Datos del radio iónico, pK_a y parámetros cinéticos de la hidrólisis de BNPP en la saturación cinética de los diferentes iones lantánidos ^[20a, 39].

Lantánido (III)	Radio Iónico (pm) N.C.=9	pK_a ^{a)}	* pK_a	k_{cat} (s^{-1}) $\times 10^4$ ^{b)}
Y	121.5	8.11	7.8	
La	135.6	9.12	8.81	0.13
Ce	133.6	8.65	8.34	
Pr	131.9	8.62	8.32	0.63
Nd	130.3	8.49	8.18	
Eu	126	8.06	7.76	2.5
Gd	124.7	8.14	7.83	5.4
Tb	123.5	7.95	7.64	
Dy	122.3	7.89	7.59	5.5
Er	120.2	7.82	7.52	8.6
Tm	119.2	7.7	7.39	--
Yb	118.2	7.55	7.24	7.8
Lu	117.2	7.57	7.27	5

^{a)} Proviene de experimentos realizados a 25°C y $I=0.7$ M. *Valores calculados para $I=0$ a 25°C con la ecuación reportada en ^[39b]. ^{b)} Constantes medidas a 50°C en 0.01 M de buffer EPPS, pH 7.0.

2.1.5 Formación de Complejos con lantánidos(III) en agua y su uso en catálisis

Los iones de lantánidos libres de ligantes son altamente reactivos para la hidrólisis de ésteres de fosfato, incluyendo al ARN y ADN. Sin embargo, ha surgido el interés en desarrollar ligantes orgánicos que se unan fuertemente a los iones de lantánidos para incrementar la solubilidad de estos iones metálicos en medios básicos (debido a que a pHs altos precipitan) y para desarrollar enzimas artificiales de restricción que por medio del metal se unan covalentemente a moléculas que unen secuencias de ácidos nucleicos específicamente.

En los últimos años se han desarrollado varios ligantes que coordinan iones de lantánidos para el propósito de hidrolizar fosfatos (Figura 11). Los ligantes cargados negativamente tienden a ligarse fuertemente a metales lantánidos pero la reactividad hidrolítica de los iones metálicos unidos a estos ligantes disminuye considerablemente en comparación con su reactividad sin ligante. Por otro lado, los ligantes neutros tienden a liberar los iones de lantánidos por descomplejación (moléculas A y B de la figura 11) [3b].

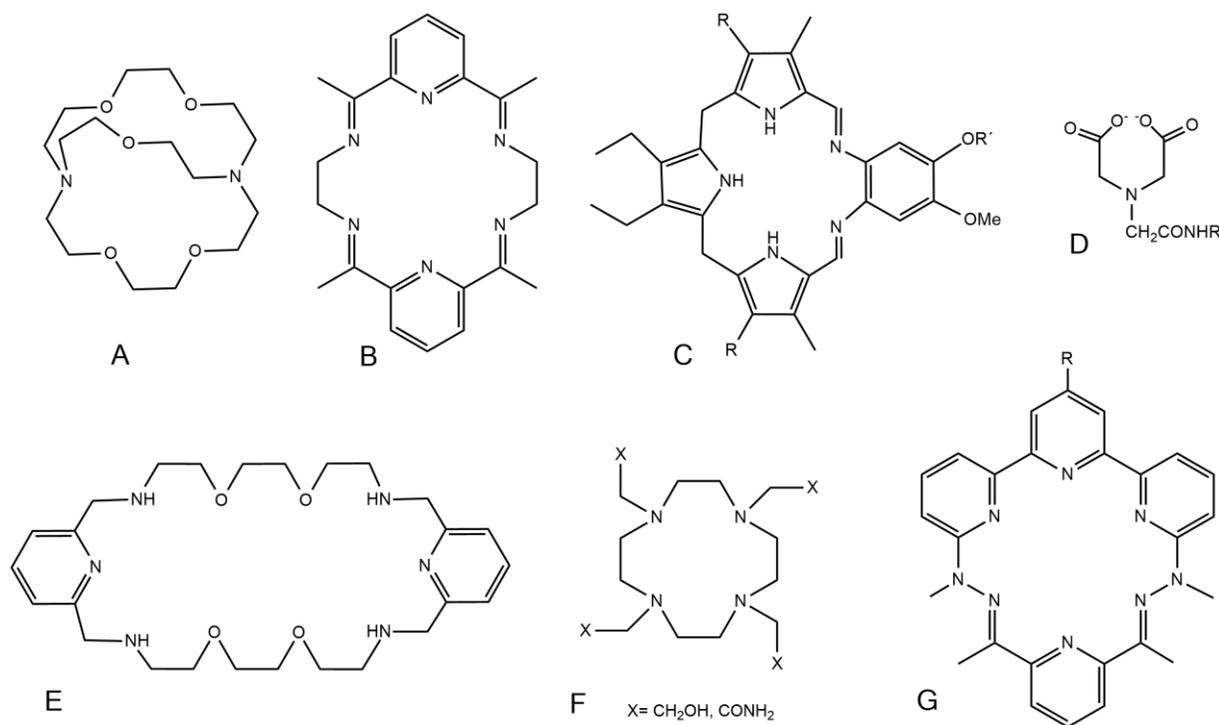


Figura 11. Diferentes ligantes utilizados para acomplejar centros metálicos de lantánidos.

A: [40], B: [41], C: [42], D: [43], E: [44], F: [45], G: [46].

En investigaciones previas se ha observado la complejación y en algunos casos la presencia de hidroxocomplejos en ligantes carboxilatos (monocarboxilatos de piridina), ligantes derivados de Tris (Tris, Bis-Tris y Bis-Tris Propano) y en ciclodextrinas con metales lantánidos. Dichos complejos han sido caracterizados por rayos X, potenciometría, RMN, entre otros. A continuación se describen dichos sistemas.

2.1.5.1 Diseño de nucleasas con ligantes aminocarboxilato

El diseño de nucleasas artificiales con ligantes carboxilato en su estructura ha sido empleado para mimetizar los grupos análogos a los aminoácidos en las enzimas. Existe una gran variedad de trabajos con aminoácidos como ligantes. Las constantes de velocidad reportadas en agua para estos sistemas con lantánidos pueden ser altas ^[47], sin embargo, debido a altos valores de pK_a de aminoácidos naturales, la formación de complejos requiere altos valores de pH; por arriba de 9, donde el sistema pierde estabilidad por precipitación de hidróxidos de lantánidos. En el 2006, Aguilar-Pérez *et al.* estudiaron el ligante 4-imidazolcarboxilato (Figura 12) por su semejanza a los aminoácidos; dicho ligante es menos básico, lo que permite la formación de complejos a pH más bajos y la caracterización de los hidroxocomplejos activos de forma más segura ^[48]. Los centros metálicos empleados fueron iones lantánidos(III).

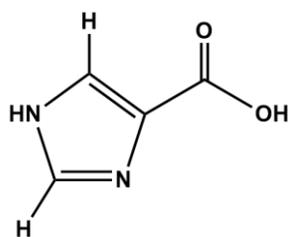


Figura 12. Estructura del ligante ácido 4- imidazolcarboxílico (4-ICA).

Por titulaciones potenciométricas, se encontró que el ligante 4-ICA (L) estabiliza hidroxocomplejos de los lantánidos trivalentes formando especies del tipo $ML(OH)^+$ cuando $M=La, Pr$, o del tipo $M_2L_n(OH)_{6-n}$ cuando $M=La, n=2$; $M=Pr, n=2,3$; $M=Nd, Eu, Dy, n=1-3$. Se realizaron estudios cinéticos de la hidrólisis de BNPP, HPNPP y NPDPP como función del pH y de la concentración del ligante y del metal. De datos cinéticos en conjunto con datos potenciométricos, los autores proponen que la formación de especies binucleares del tipo $M_2L_2(OH)_4$ (Figura 13-A) cuando el metal es La^{3+} y Pr^{3+} y del tipo $M_2L(OH)_5$ (Figura 13-B) con

M= Nd³⁺, Eu³⁺ y Dy³⁺ son aquellas con mayor actividad catalítica. La mayor reactividad se encontró con el catión La³⁺ para ambos sustratos diéster; se reportaron constantes de segundo orden de $k=4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k=41\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para los sustratos BNPP y HPNPP, respectivamente, a 25°C, en medio acuoso y con $[\text{M}]=[\text{L}]=2\text{mM}$. También se observó que para estos sustratos la actividad catalítica decrece en el orden La>Pr> Nd>Eu>Dy.

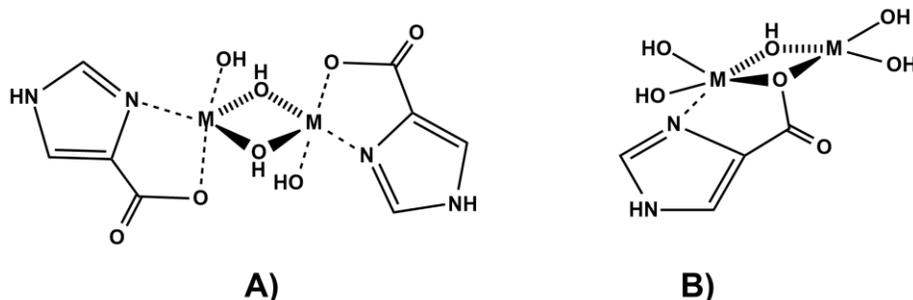


Figura 13. Estructura de los complejos activos de 4-ICA. **A)** $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$ y **B)** $\text{M}_2\text{L}(\text{OH})_5$.

En otra parte de este estudio, se analizó el efecto salino en los sistemas; se encontró que la velocidad de hidrólisis disminuye en presencia de aniones (Cl^- , NO_3^- , $(\text{EtO})_2\text{PO}_2^-$, CH_3COO^-), indicando una afinidad alta de los hidroxocomplejos neutros hacia especies aniónicas. Con el anión CH_3COO^- se encontró la mayor constante de afinidad $K=230\text{M}^{-1}$ hacia el ión Nd^{3+} , esto se atribuye a que el ión acetato (anión plano) puede encajar mejor en el sitio del enlace catalítico, enlazándose de manera bidentada por los dos centros metálicos a manera de puente y así impide la coordinación del sustrato. Con estos estudios, los autores proponen un mecanismo de hidrólisis para BNPP y HPNPP: ambos involucran la complejación reversible de la especie binuclear activa $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_4$ con el diéster de fosfato en forma de puente (activación por doble ácido de Lewis). Para BNPP el proceso es seguido por el ataque de un hidróxido puente unido al metal hacia el átomo de fósforo (Ruta 1) 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 2) (Figura 14-A). Mientras que para HPNPP, después de la complejación de la especie binuclear se requiere la desprotonación del grupo 2 hidroxilo, el cual posteriormente sustituye uno de los hidróxidos puentes, para ser este grupo alcóxido el nucleófilo en la hidrólisis del enlace fosfodiéster (Figura 14-B).

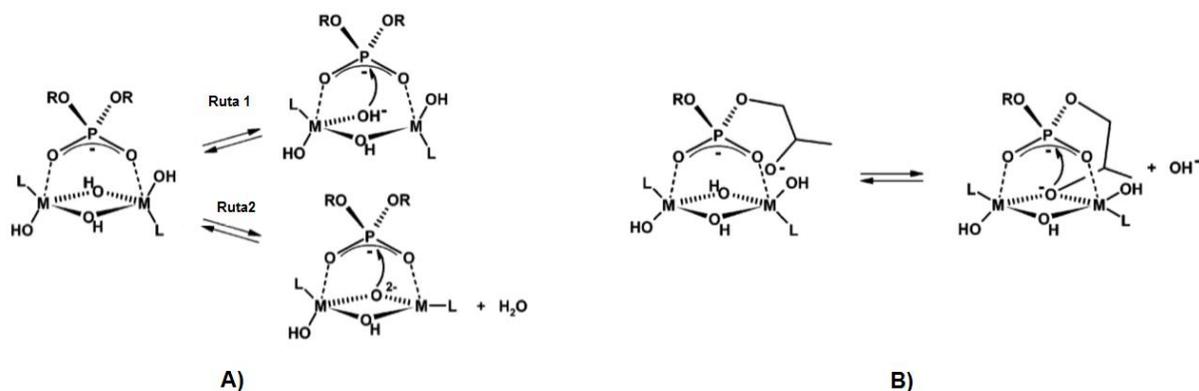


Figura 14. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de BNPP (A) y HPNPP (B) por el complejo $M_2L_2(OH)_4$. Donde L= 4-ICA.

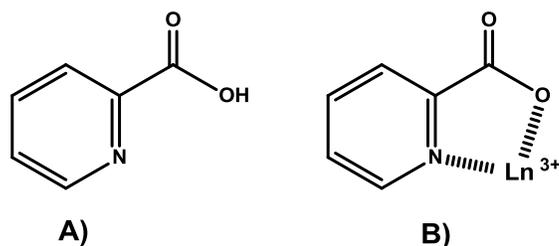
En estos sistemas, el ligante carboxilato con los iones metálicos provee una eficiencia catalítica para el sustrato BNPP y HPNPP del orden de 10^5 y 10^2 en agua, respectivamente, que se expresa en términos de la relación de las constantes de segundo orden de la reacción catalizada por el hidroxocomplejo entre la constante de segundo orden de la reacción catalizada por el ión hidróxido. Este es uno de los sistemas más rápidos reportados hasta el momento ^[48].

2.1.5.2 . Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligantes monocarboxilatos de piridina

Los monocarboxilatos de piridina, como picolinato han sido usados ampliamente para la construcción de complejos de lantánidos y redes de coordinación ^[49] debido a que estas moléculas con átomos de nitrógeno y oxígeno pueden transferir energía de irradiación UV eficientemente al ion lantánido. Además, los complejos de lantánidos con ligantes polidentados que contienen fragmentos de ácido picolínico coordinados son de interés en las aplicaciones en "time-resolved luminescence imaging" ^[50].

La coordinación del ligante picolinato se estudió por potenciometría con diferentes iones lantánidos(III). Las constantes de formación fueron determinados para complejos del tipo ML_n con $n=1-4$ (Figura 15) ^[2]. Para poder comprobar que el ligante es bidentado coordinado a través del átomo de nitrógeno del anillo piridina y el grupo carboxílico se estudio bajo la misma técnica la complejación de Eu^{3+} con ácido picolínico (ácido 2-piridin carboxílico), ácido nicotínico y ácido isonicotínico (ácido 4-piridin carboxílico). Los resultados demuestran que Eu^{3+} con

picolinato forma cuatro complejos ML_n con $n=1-4$ más estables en comparación con los formados con nicotinato e isonicotinato dónde se forma sólo el complejo ML ; el complejo con $n=1$ es más estable por aproximadamente dos órdenes de magnitud. Esta estabilidad mayor en picolinato es atribuida a la formación de un anillo estable de cinco miembros por la quelación del átomo de nitrógeno del piridino, observándose así la naturaleza bidentada del ligante ^[51].



La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Er	Tm	Y
3.54	3.74	3.85	3.88	4.06	4.07	4.06	4.15	4.22	4.28	4.36	4.03

Figura 15. Estructura del ácido picolínico (A) y el complejo ML_n (B) con los logaritmos de las constantes de formación de los complejos 1:1 formados con iones lantánidos(III) y picolinato ^[2]
 $\mu=0.1$ M (KNO_3) T= 25 °C.

2.1.5.3 Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligantes derivados de Tris

Se ha reportado la formación de complejos con buffers biológicos derivados de Tris : Tris, Bis-Tris (BT) y Bis-Tris Propano (BTP) en presencia de metales lantánidos, en la figura 16 se muestran sus estructuras y las constantes de estabilidad con algunos de los metales lantánidos(III). A continuación se hablará de lo que se conoce acerca de la complejación de BT y BTP coordinados a iones lantánidos.

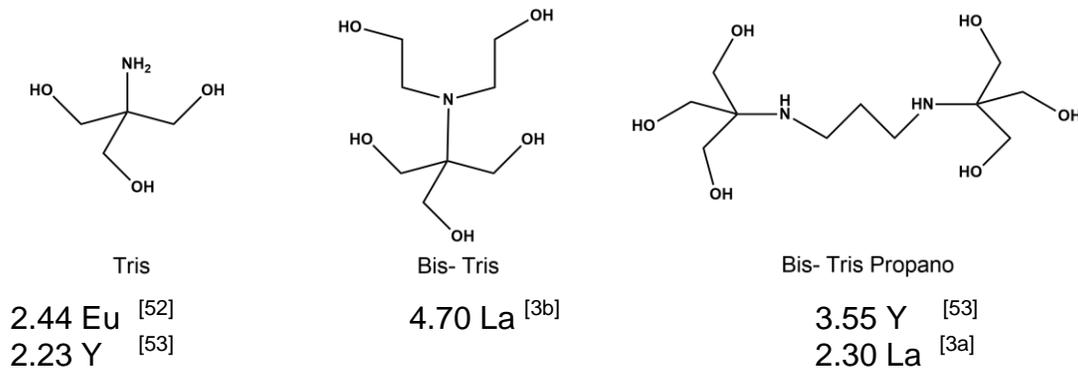


Figura 16. Buffers biológicos usados como ligantes. Se muestran los logaritmos de las constantes de estabilidad de los complejos con los ligantes coordinados a los iones lantánidos(III) ^[20a].

2.1.5.3.1 Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligante Bis-Tris

En 1998 Jin Oh *et al.* observaron que el buffer biológico 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitrilotrietanol (Bis-Tris) se coordina fuertemente a La^{3+} en agua formando un dímero altamente activo para la hidrólisis de fosfodiésteres ^[54]. Pudieron obtener cristales a partir de una mezcla equimolar de LaCl_3 con Bis-Tris. La estructura de $[\text{La}(\text{BT})_2]\text{Cl}_3$ (Figura 17) muestra que el ion metálico tiene diez sitios de coordinación ocupados por dos moléculas de Bis-Tris, cada molécula de Bis-Tris actúa como un ligante pentacoordinado con cuatro átomos de oxígeno y un átomo de nitrógeno, el átomo de oxígeno remanente de Bis-Tris no puede coordinarse debido a su posición estructural. Así mismo, hacen notar que la estructura cristalina es un complejo con una relación 1:2, metal: ligante (M/L), pero que en solución acuosa la especie predominante es el complejo 1:1 (relación M/L).

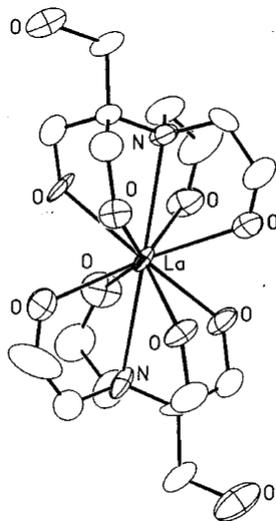


Figura 17. Diagrama ORTEP del complejo de lantano (III) coordinado a dos moléculas de Bis-Tris. Las distancias entre los átomos de oxígenos coordinados al centro metálico están entre 2.515 y 2.622 Å. Las distancias entre los átomos de nitrógeno coordinados al centro metálico son entre 2.863 y 2.948 Å. Los átomos de hidrógeno y el ion cloro no coordinado no se muestran para una mayor claridad.

Así mismo, reportan el estudio mediante una titulación potenciométrica de una mezcla equimolar de LaCl_3 y Bis-Tris en agua, la cual muestra que no hay metal ni ligante libre. El pK_a de Bis-Tris cambia de 6.5 a 4 en la presencia de un equivalente de LaCl_3 , indicando que la formación del complejo es favorable en solución acuosa ($K_f = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Otros buffers con estructura similar a Bis-Tris, como Tris, Bis-Tris propano, Taps, Tapso o Tes no se unen a iones

lantano tan bien como Bis-Tris. En particular, la constante de enlazamiento de Tris con La^{3+} es de $2.75 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ [52]. Por otro lado, la titulación potenciométrica de Bis-Tris con La^{3+} consume 2 equivalentes de NaOH a pH 9.8 observándose una pendiente baja, por lo que Jin Oh *et al.* proponen la formación del hidroxocomplejo binuclear A de la figura 18; dicho complejo o su equivalente cinético es la especie activa en la hidrólisis de BNPP.

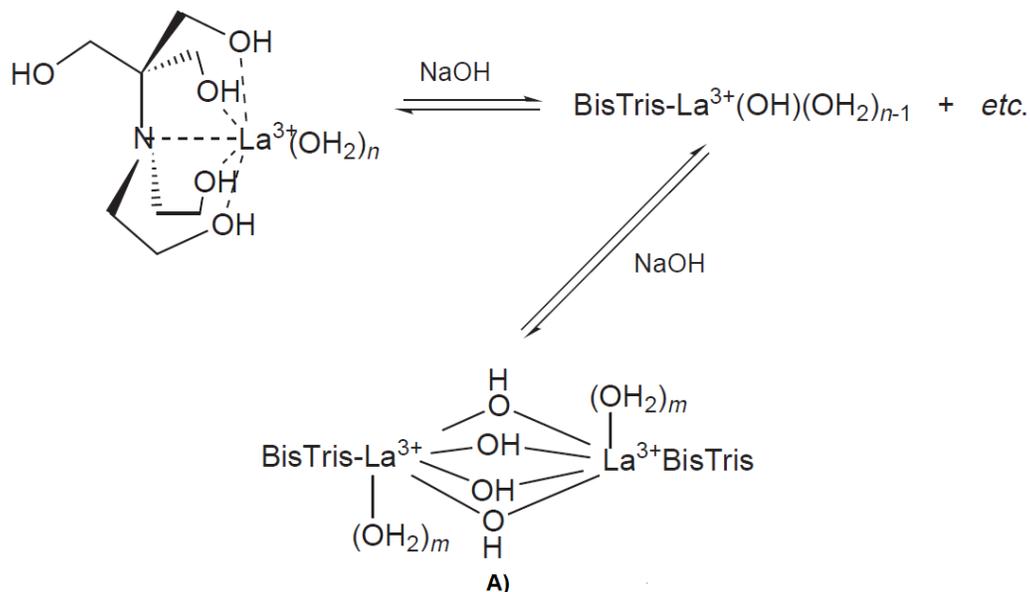


Figura 18. Hidroxocomplejo binuclear formado a partir de una mezcla equimolar de La^{3+} y Bis-Tris.

Los iones lantano tienden a formar geles bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 9$) aún en concentraciones bajas (0.5 mM); es interesante destacar que aun a concentraciones de 40 mM de La^{3+} y a pH de 11.5, la mezcla equimolar con Bis-Tris es soluble y no reduce la reactividad del centro metálico para la hidrólisis de BNPP. Se realizaron estudios comparativos de la actividad hidrolítica de la solución 1:1 LaCl_3 y Bis-Tris (0.5 mM) con dos equivalentes de NaOH con y sin ligante, dando constantes de $k=7.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $k=8.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Se ha propuesto que el mecanismo hidrolítico es por el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo (del hidroxocomplejo) al grupo fosfato, que se encuentra unido por los dos centros metálicos del mismo complejo (Figura 19) [54-55].

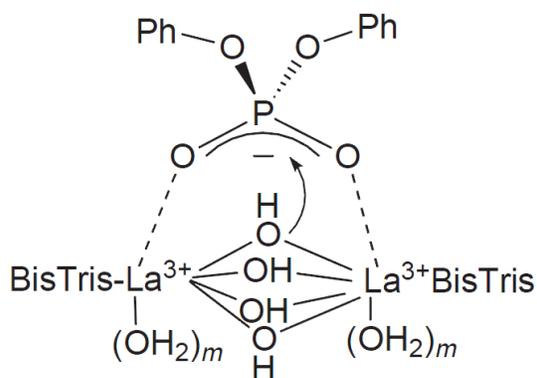


Figura 19. Mecanismo de la hidrólisis de fosfodiésteres por el hidroxocomplejo binuclear de Bis-Tris y La^{3+} .

2.1.5.3.2 Complejos coordinados a lantánidos(III) con ligante Bis-Tris

Propano

En el 1998, Gómez-Tagle y Yatsimirsky estudiaron el ligante BTP por la alta actividad hidrolítica de sus complejos con lantano(III) en soluciones poco básicas ^[56]. Por tanto, realizaron estudios cinéticos de la hidrólisis de BNPP, NPP y NPA con sistemas de lantánidos(III)-BTP a 25°C y en un rango de pH entre 7 a 9 ^[3a]. Este sistema se diferencia de otros sistemas basados en lantánidos en varios aspectos.

Primero, encontraron que las reacciones son de primer orden cinético sin ninguna "saturación" observada con otros sistemas basados en lantánidos ^[32b, 57].

Segundo, los perfiles de la velocidad de reacción vs pH tienen pendientes $m \gg 0$, lo que indica la desprotonación de al menos dos moléculas de agua coordinadas (o ligantes -grupos OH) en los complejos activos catalíticamente. Titulaciones potenciométricas con mezclas de percloratos de lantánidos(III) y BTP revelaron la formación de hidroxocomplejos binucleares $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n^{6-n}$, donde $\text{M} = \text{La}^{3+}, \text{Pr}^{3+}, \text{Nd}^{3+}, \text{Eu}^{3+}, \text{Ga}^{3+}$ y Dy^{3+} y $n=2,4,5$ ó 6 (Figura 20). La presencia de especies binucleares fue confirmada por datos ESI-MS (espectrometría de masas de Ionización por electrospray); técnica usada para la caracterización de complejos metálicos ^[58]. Los resultados muestran que para un metal dado, las constantes de velocidad incrementan cuando aumenta el número de iones hidróxido coordinados al metal.

Tercero, en la serie de los complejos, con una n dada, la actividad más alta fue observada con La^{3+} ; la constante de velocidad de segundo orden disminuye en el orden $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} > \text{Gd} > \text{Dy}$. Esta tendencia es opuesta a la observada para los lantánidos acuo catiónicos [32d, 57b], donde actividades altas para cationes pequeños son atribuidos por tener alta densidad de carga y como consecuencia, mayor activación electrofílica al sustrato. En esta investigación, Gómez-Tagle y Yatsimirsky muestran que la basicidad del hidróxido coordinado al metal es igualmente importante cuando la reactividad de un hidroxocomplejo con diferentes lantánidos es comparada, especialmente cuando se trata de complejos binucleares la basicidad del OH^- coordinado es más importante que la electrofiliidad del catión lantánido; es decir, hidroxocomplejos con cationes más electrofílicos pero con menos iones OH^- tienen menos reactividad.

Es importante destacar que la constante de primer orden a una concentración dada de metal y a pH 9 siguió el orden: $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} < \text{Gd} < \text{Dy}$, esto es debido a que a este pH, los lantánidos más pesados generan mayores fracciones de hidroxocomplejos más reactivos, mientras que los cationes metálicos más electrofílicos desactivan el nucleófilo OH^- reduciendo su alta basicidad, pero este efecto desactivador es compensado por la habilidad de los cationes a formar mayores hidroxocomplejos en donde el anión OH^- es relativamente más básico [3a].

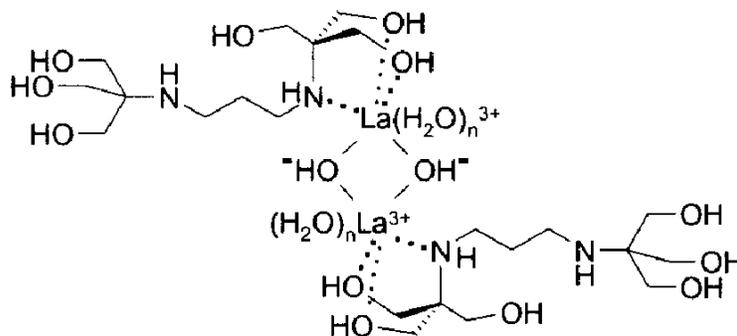


Figura 20. Hidroxocomplejo propuesto como $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_2^{4+}$. La complejación con BTP estabiliza algunas especies previniendo la formación de complejos con nuclearidad mayor y eventualmente la precipitación del hidróxido metálico. La desprotonación de las moléculas agua coordinadas al metal permite la formación de $\text{M}_2(\text{BTP})_2(\text{OH})_n$ con $n > 2$ [3a].

Adicionalmente, se encontró que la hidrólisis de NPP sigue un mecanismo tipo Michaelis-Menten con una "saturación cinética". La diferencia cinética puede ser atribuida a una mayor fuerza de enlace del dianión NPP que al monoanión BNPP a las especies de lantánidos(III). Las actividades de los complejos de lantánidos en la hidrólisis de NPA, que fueron 10^6 veces más reactivas que con el sustrato BNPP en la hidrólisis alcalina o acuosa, son similares a las

obtenidas en la hidrólisis con BNPP indicando la capacidad de los lantánidos(III) para estabilizar el estado de transición del fosfodiéster en la hidrólisis.

Así mismo, en el 2001 Gómez-Tagle y Yatsimirsky estudiaron la hidrólisis de BNPP y NPDPP catalizado por el Y^{3+} , en presencia del ligante BTP y el ligante Tris, observando una cinética de segundo orden. Por titulaciones potenciométricas y de 1H -NMR de BTP en la presencia de Y^{3+} , propusieron la formación de un complejo mononuclear $Y(BTP)^{3+}$ y un hidroxocomplejo binuclear $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$ donde $n=2,4,5$ o 6. La titulación de Tris en la presencia de Y^{3+} estuvo limitado por la baja estabilidad del sistema y se ajustó a un sistema cuyas especies fueron $Y(Tris)^{3+}$ y el complejo binuclear $Y_2(Tris)_2(OH)_5^+$. Los estudios cinéticos de perfiles de dependencia de pH y concentración comparados con los diagramas de distribución de especies (Figura 21), mostraron que la hidrólisis catalítica de BNPP involucra una interacción simultanea del sustrato con la especie $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$ y $Y_2(BTP)(OH)_5^+$ en el sistema Y^{3+}/BTP y una interacción de dos especies $Y_2(Tris)_2(OH)_5^+$ en el sistema $Y^{3+}/Tris$ (Figura 22). Con esto se propusieron 2 ecuaciones, una para cada sistema para poder obtener una k_{obs} teórica ^[53].

$$k_{obs} = k_3 [Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}] [Y_2(BTP)(OH)_5] \quad (1)$$

$$k_{obs} = k_2 [Y_2(Tris)_2(OH)_5^+] + k_3 [Y_2(Tris)_2(OH)_5^+]^2 \quad (2)$$

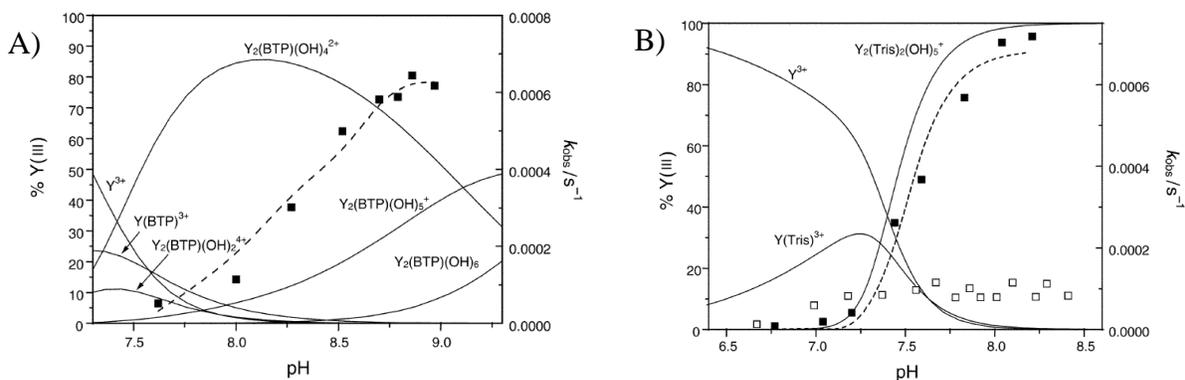


Figura 21. Diagramas de distribución de especies para los hidroxocomplejos formados por (A) 1.8 mM de Y^{3+} y 20 mM de BTP en función del pH y (B) 2 mM de Y^{3+} y 20 mM de Tris. Se observan constantes de primer orden para la hidrólisis de BNPP A 25°C (cuadros sólidos) y NPP (cuadros vacíos). Las líneas punteadas son las k_{obs} teóricas vs el perfil de pH calculadas con la ecuación 1 y 2, respectivamente ^[53].

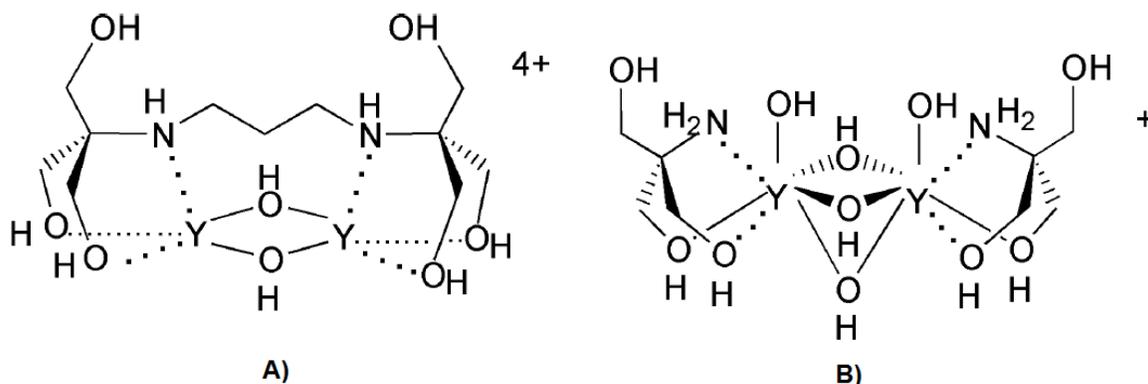


Figura 22. Estructuras propuestas para los hidroxocomplejos formados con el metal Y^{3+} y con los ligantes BTP **A**) y TRIS **B**), basadas en la estructura reportada para el complejo de La^{3+} con el ligante Bis-Tris ^[54]. La estructura de los complejos $Y_2(BTP)(OH)_n^{6-n}$ se ejemplifica con la estructura de $Y_2(BTP)(OH)_2^{4+}$ (**A**), con dos aniones OH, y la estructura con Tris con el complejo $Y_2(Tris)_2(OH)_5^+$ (**B**) ^[53].

Las comparaciones en términos de la k_{obs} , mostraron que la actividad fosfodiesterolítica de Y^{3+} en la presencia de BTP es mucho mayor que la reportada para la mayoría de los sistemas basados en lantánidos(III) a una concentración de $[Y^{3+}] = 4.5 \text{ mM}$, la k_{obs} para la hidrólisis de BNPP alcanzó el valor de 0.0025 s^{-1} a 25°C y pH 8.5, que corresponde a una vida media de sólo 4.6 min. Las actividades de los sistemas BTP-lantánidos(III) reportadas, son un orden de magnitud menor incluso a pH mayores. De forma comparativa, el acuo-ion más activo Er^{3+} tiene una $k_{obs} = 0.00053 \text{ s}^{-1}$ en su saturación y a 50°C ^[59]. Constantes reportadas para la ruptura de BNPP por complejos macrocíclicos de lantánidos(III) ^[32c, f, 60] alcanzan una $k_{obs} = 0.001 \text{ s}^{-1}$ sólo a temperaturas elevadas. Es importante destacar que la constante de velocidad para la hidrólisis de BNPP no catalizada a 25°C es de $1.1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ ^[61].

Para explicar esta alta actividad, Gómez-Tagle y Yatsimirsky, propusieron que el complejo $Y_2(BTP)(OH)_4^{2+}$ provee sólo una asistencia electrofílica al sustrato, mientras que el complejo $Y_2(BTP)(OH)_5^+$ con más hidroxio aniones, actúa como nucleófilo hacia el fosforo(V).

La constante k_3 de tercer orden para BNPP con complejos de Tris son 10 veces menores a la k_3 reportadas con complejos de BTP, dando constantes de 110 y $830 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, ya que en el sistema con Tris sólo se tiene el complejo $Y_2(Tris)_2(OH)_5^+$ en la solución ^[53].

2.1.5.4 Complejos de iones metálicos con ciclodextrinas

En la búsqueda de encontrar sistemas en que los complejos mono o dinucleares puedan imitar los sitios activos de las fosfodiesterasas, así como tener sensores eficientes en luminiscencia y ser switches para el análisis de biomateriales ^[62], los químicos inorgánicos han propuesto complejos de iones lantánidos(III) con ciclodextrinas (CDs) (Figura 23); los primeros tienen propiedades de luminiscencia que son sensibles al ambiente ^[36a] y las segundas proveen microambientes específicos y protectores para moléculas pequeñas, que se alojan en la cavidad de la CD ^[63]. Las CDs pueden hospedar complejos de coordinación ^[64] con constantes de enlace tan grandes como 2000 M^{-1} ^[65] y se ha esperado que reduzcan la desactivación en la luminiscencia de los estados excitados de los iones de Ln^{3+} e incrementen la intensidad de luminiscencia en los cromóforos ^[66].

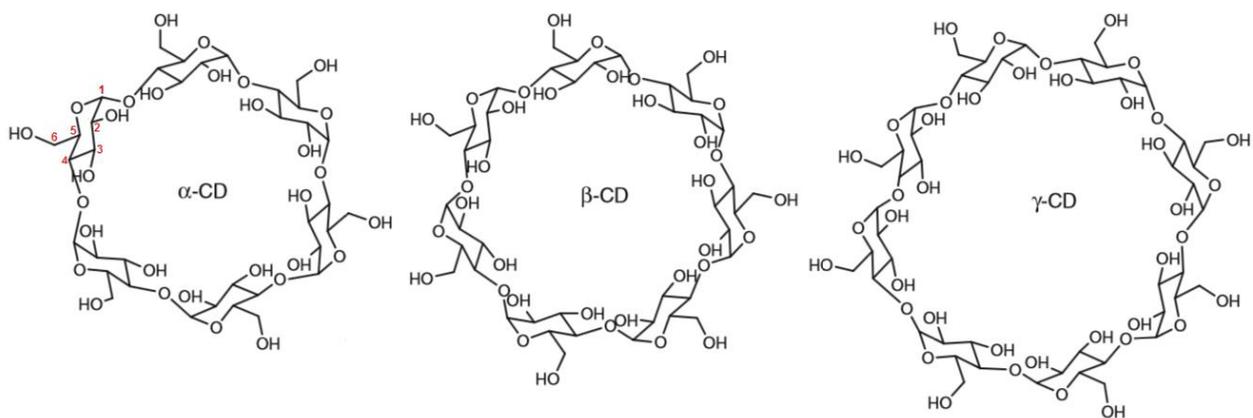


Figura 23. Estructura de α , β y γ ciclodextrinas, contienen 6, 7 y 8 unidades de α -D-glucopiranosas, respectivamente, conectadas a través de las uniones α -(1 \rightarrow 4) ^[67].

Los investigadores Fatin-Rouge y Bünzli han realizado estudios termodinámicos y estructurales de la inclusión de complejos entre iones lantánidos(III) y ciclodextrinas nativas. Se observó que a bajos pH, las constantes de asociación de los complejos 1:1 están en el rango de $\log K=2-4$ (fuerza iónica $\mu=0.1\text{M}$, NaCl). Los análisis de RMN muestran que el ión metálico se coordina al átomo anomérico del Oxígeno de α -CD en la región del átomo C_5 . Por otro lado, se estudió la complejación de Tb^{3+} en medio básico $\text{pH}=12.33$, las moléculas de α -CD se encuentran parcialmente desprotonadas; mediciones por RMN de ^{13}C mostraron que la complejación ocurre en el OH-3 del segundo grupo hidroxilo. Por titulaciones en UV-Vis se

determinó una constante de $\log K=4.2$ [68] y por analogía con la estructura determinada por difracción de rayos X para el complejo de Cu^{2+} con ciclodextrina se propuso la estructura del complejo de Y^{3+} con $\alpha\text{-CD}$ (Figura 24) [69].

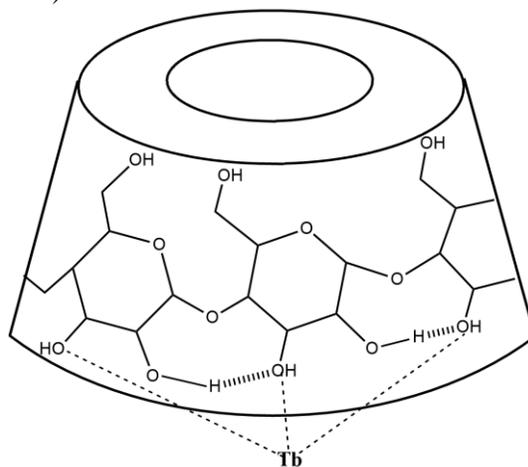


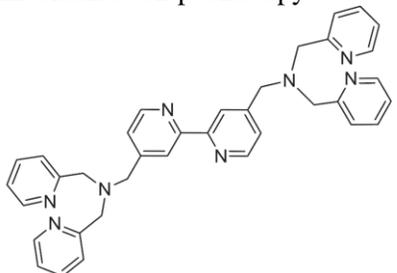
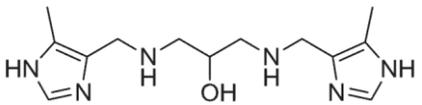
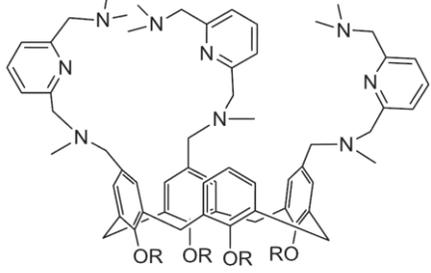
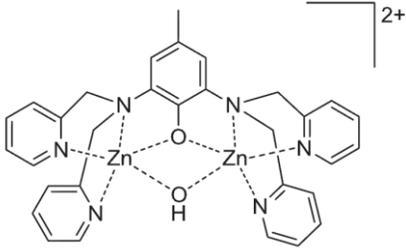
Figura 24. Complejo de $\alpha\text{-CD}$ con Tb^{3+} [68]. El estudio por rayos X del complejo metálico con Cu^{2+} confirma dicha estructura [69].

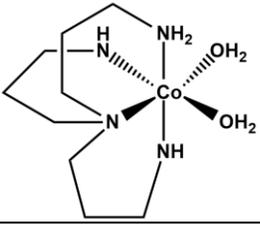
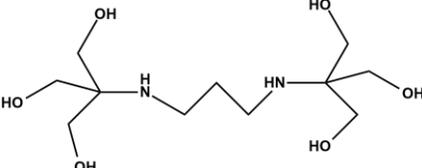
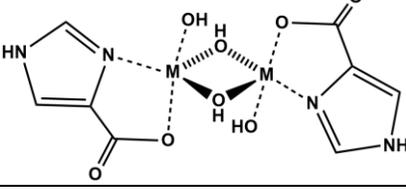
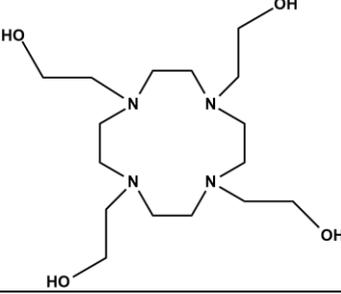
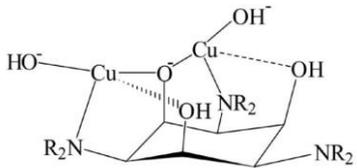
A pesar de que ya hay estudios que nos demuestran la complejación de metales lantánidos a ciclodextrinas, sólo hay algunos artículos que hablan de la actividad catalítica de éstos complejos. Yashiro *et al.* reportaron el estudio cinético del complejo de $\gamma\text{-ciclodextrina-Ce}^{3+}$ en la hidrólisis de 2'-deoxiadenosin-5'-monofosfato a 2'-deoxiadenosina. De acuerdo a estudios preliminares mencionan que los iones lantánidos(III) en la forma de complejos CD mantienen actividades destacables en la hidrólisis de fofodiésteres; el 14% de sustrato (5 mM) fue hidrolizado con Ce^{3+} - $\gamma\text{-CD}$ (10 mM 1:5) a pH 7.2, 50°C y 80 min, lo que es comparable con el valor (23% conversión) obtenido en la ausencia de $\gamma\text{-CD}$ [4]. Por otro lado, se han reportado estudios cinéticos con sistemas derivados de $\beta\text{-CD}$ formando complejos binucleares con Zn^{2+} o Cu^{2+} [70].

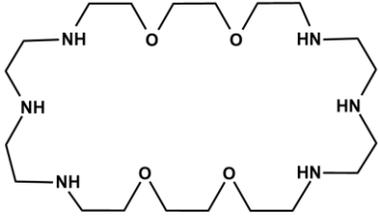
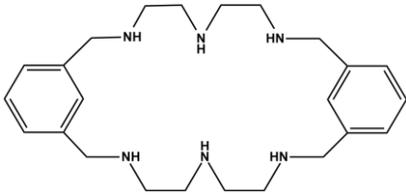
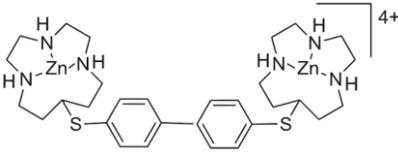
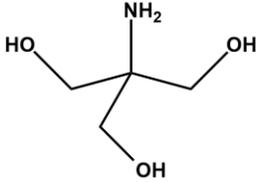
2.1.5.5 Resumen de ligantes con diferentes centros metálicos empleados como catalizadores y constantes de velocidad observadas en la hidrólisis de HPNPP y BNPP

En la tabla 2 se muestran algunos de los mejores complejos que han catalizado la hidrólisis de fofodiésteres hasta la fecha, con la finalidad de comparar los complejos de iones lantánidos con otros iones metálicos en presencia de diferentes ligantes con los sustratos HPNPP y BNPP.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la ruptura de HPNPP* y BNPP por iones lantánidos y otros complejos metálicos.

Complejo metálico	Tipo de ligante/ complejo	Sustrato	Condiciones	k_{cat}^* o k_{obs} s ⁻¹	Ref.
(Cu ²⁺) ₃ -L	Trinucleante con puente bpy 	HPNPP	25°C, pH 7 Pseudo ^a	1.43×10 ⁻²	[71]
(Zn ²⁺) ₂ -L	Binucleante con dos puentes 2-propanol 	HPNPP	65% EtOH/H ₂ O 25°C, pH 7.98 True ^a	1.52×10 ⁻³	[72]
(Zn ²⁺) ₃ -L	Trinucleante con puente calixareno  R = CH ₂ CH ₂ OEt	HPNPP	35% EtOH/H ₂ O 25°C, pH 7 True	24×10 ⁻⁴	[73]
(Zn ²⁺) ₂ -L	Binuclear con puente fenol 	HPNPP	H ₂ O/DMSO (70:30) 25°C, pH no ajustado True	6.4×10 ⁻⁴	[74]
Ce ⁴⁺	acuo-ion	BNPP	0.5 eq. de ácido Palmítico, 2 mM Brij-35, 37°C [M]=2 mM	2.6×10 ⁻²	[75]

Co ³⁺ -trpn	Mononuclear 	BNPP	50 °C, pH 7.0 [M]=10 mM	2.5×10 ⁻²	[61]
La ³⁺	acuo-ion	BNPP	50°C, pH 7.0 [M]=2 mM	5.6×10 ⁻⁶	[59]
La ³⁺ - L	Mononucleante 	BNPP	25°C, pH 9.3 [M]=2 mM 20 mM BTP	4.5×10 ⁻⁴	[3a]
(La ³⁺) ₂ -L ₂		BNPP	10 mM Tris-HCl, 25°C, pH 9.2 [M]=2 mM	0.0015	[48]
Eu ³⁺	acuo-ion	BNPP	50°C, pH 7.0, [M]=2 mM	1.0×10 ⁻⁴	[59]
Eu ³⁺ -L	Mononucleante 	BNPP	37°C, pH > pK _a =7.4, [M]=1 mM	1.9×10 ⁻⁴	[32f]
Er ³⁺	acuo-ion	BNPP	50°C, pH 7.0, [M]=2 mM	3.2×10 ⁻⁴	[59]
Cu ²⁺	acuo-ion	BNPP	75°C, pH 6.5 [M]=0.1 mM	5.7×10 ⁻⁷	[76]
(Cu ²⁺) ₂ -L	Binuclear 	BNPP	25 °C, pH 8.6, [M]=1 mM	9.5×10 ⁻⁴	[77]
Ni ²⁺	acuo-ion	BNPP	75°C, pH 6.6, [M]=1 mM	1.3×10 ⁻⁷	[76]
Mg ²⁺	acuo-ion	BNPP	75°C, pH 8.2, [M]=1 mM	1.8×10 ⁻⁷	[76]

$(Zn^{2+})_2-L$	Binucleante 	BNPP	35°C, pH>pKa=9.1, [M]=2 mM	2.3×10^{-7}	[78]
$(Zn^{2+})_2-L$	Binucleante 	BNPP	75% EtOH, 35°C, pH 8.2, [M]=2 mM	1.12×10^{-8}	[79]
$(Zn^{2+})_2-L$	Binuclear 	BNPP	55°C, pH 8.4, 227 mM del complejo	6.4×10^{-4}	[30]
$Y^{3+}-L$	Mononucleante 	BNPP	20 mM Tris, 25°C, pH 8.2, [M]=2 mM	7×10^{-4}	[53]

^a"True" significa que las cinéticas tipo Michaelis-Menten fueron estudiadas usando un exceso de sustrato con relación al complejo mientras que "Pseudo" significa que se usó un exceso de complejo en relación con el sustrato.

Hasta ahora los iones lantánidos(III) han sido estudiados con diferentes ligantes en la hidrólisis de fosfodíesteres, sin embargo, se siguen buscando ligantes que prevengan la formación de geles hidroxio y que mantengan las propiedades catalíticas de estos iones metálicos. De los antecedentes revisados surge el interés de proponer estructuras de derivados de ácido picolínico como ligantes análogos del ácido 4- imidazolcarboxílico; de estudiar ligantes derivados de Tris, específicamente Bis-Tris que ha sido el menos estudiado en la hidrólisis de fosfodíesteres, teniendo sólo un dato de la hidrólisis de BNPP con el ion La^{3+} ; y con ciclodextrinas, ya que con iones lantánidos sólo se ha reportado la hidrólisis de 2'-deoxiadenosin-5'-monofosfato en presencia de Ce^{3+} .

3. OBJETIVOS

Estudiar la hidrólisis catalítica de ésteres de fosfato, como modelos de ARN y ADN, empleando complejos de lantánidos con ligantes derivados de ácido picolínico, tris y ciclodextrinas. Con el fin de encontrar un ligante capaz de estabilizar el sistema y que conserve las propiedades reactivas del centro metálico en medio acuoso, a pH cercanos a la neutralidad y a temperatura ambiente.

Este trabajo pretende contribuir en la construcción de nuevos catalizadores como “nucleasas artificiales” para futuras investigaciones bioquímicas y medicinales.

3.1. Objetivos particulares

1.-Realizar estudios cinéticos de hidrólisis utilizando HPNPP y BNPP como sustratos análogos de ARN y ADN, respectivamente. Analizar ambos sustratos en presencia de diferentes centros metálicos de lantánidos trivalentes coordinados a ligantes derivados de ácido picolínico, tris y ciclodextrinas en medio acuoso.

2.- Mediante estudios potenciométricos, analizar la distribución de especies presentes a las condiciones de reacción y asignar especies cinéticamente activas involucradas en la hidrólisis de HPNPP y BNPP.

3.- Utilizando RMN ^1H comprobar la complejación del ligante con el metal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Los reactivos y disolventes utilizados en los estudios cinéticos y potenciométricos no tienen alguna purificación ni tratamiento previo.

DISOLVENTES

Agua desionizada con resistividad de $18 \pm 0.1 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ obtenida con el equipo Nanopure Barnstead

D₂O, Aldrich 99.996%

Metanol, J.T. Baker, 99%

Acetonitrilo, Reproquifin, 99.5%

REACTIVOS

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

Pr(ClO₄)₃, Aldrich, solución en agua 99.9%, 40% en peso, densidad a 25°C 1.563 g/mL

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

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

Gd(ClO₄)₃, Aldrich, solución en agua 99.9%, 40% en peso, densidad a 25°C 1.445 g/mL

Dy(ClO₄)₃, Aldrich, solución en agua 99.9%, 40% en peso, densidad a 25°C 1.476 g/mL

SUSTRATOS

Bis(4-nitrofenilfosfato) (BNPP)

2-hidroxipropil 4-nitrofenil fosfato (HPNPP) ^[80]

LIGANTES

Ácido 6-aminopiridina 2-carboxílico (APCA), Aldrich

Ácido chelidónico, Aldrich, 98%

Ácido chelidámico, Aldrich, 95%

Ácido benzohidroxámico, Aldrich, 99%

Ácido picolínico, Aldrich, 99%

Ácido dipicolínico, Aldrich, 99%

Ácido 2-pirinhidroxámico, Aldrich, 99%
Ácido 3-hidroxipiridina 2-carboxílico, Aldrich 98%
Ácido 6-acetilamino 2-piridincarboxílico, Aldrich, 99%
Bis-Tris, Aldrich, 98%
2-hidroxipropil- β ciclodextrina, Aldrich
 α -ciclodextrina, Sigma
 β -ciclodextrina
 γ -ciclodextrina

AMORTIGUADORES

MOPS, Aldrich
Tris[hidroximetil]amino-metano, Aldrich, 99%
Bis-Tris, Aldrich, 98%

OTROS

4-Nitrofenol, Aldrich, 99%
NaCl, Aldrich, 99%
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, Aldrich, 99%
Naranja de Xilenol, Aldrich, 99%
EDTA, Aldrich, 99%
Biftalato ácido de potasio, Aldrich, estándar analítico, 99.95-100%
NaOH, Meyer, >97%

4.2 Métodos

4.2.1 Determinación de la concentración de lantánidos(III)

La concentración de las soluciones stock de las sales de lantánidos (-50mM) se determinaron por titulaciones utilizando EDTA como titulante y naranja de xilenol como indicador ^[81]. En un matraz se colocan 20 mL de Buffer Ácido acético/Acetato de sodio a pH=5, 100 μ L de $\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$ - 50mM y 400 μ L de naranja de xilenol. Se titula con una solución de EDTA 0.1M hasta observar el punto de equivalencia, observándose un cambio de color de rojo a amarillo.

4.2.2 Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos se llevaron a cabo a través de mediciones espectrofotométricas en UV-vis. Se utilizaron dos equipos, Hewlett Packard 8453 y Scientific Evolution, ambos de doble haz con arreglo de diodos (con una ventana espectral de 190-1100 nm, una resolución de 1 nm y una precisión de longitud de onda $< \pm 0.5$). Para mantener el control de la temperatura a 25°C, el equipo consta de compartimentos termostatados, los cuales utilizan un baño de recirculación de agua marca Fisher Scientifics Isotemp y Thermo Scientific (± 0.1 °C), respectivamente.

Las celdas empleadas fueron de plástico y con 1 cm de longitud de paso óptico. En ellas se colocaban concentraciones determinadas de metal, ligante, electrolito y de sustrato en medio acuoso para obtener un volumen final de 2 mL.

El curso de la hidrólisis de BNPP y HPNPP se monitoreó por la aparición del anión 4-nitrofenolato por espectroscopía de UV-vis a 400 nm (Figura 25-A). Se realizaron cinéticas con relación fija M:L (mM) variando el pH en el rango de 6.5 a 9, a temperatura constante de 25°C y cinéticas a pH fijo, manteniendo la concentración del metal igual a la del ligante ($[\text{M}]=[\text{L}]$) pero variando dicha relación. Las k_{obs} fueron obtenidas a partir de las curvas cinéticas mediante ajustes no lineales a la ecuación de primer orden o a partir de velocidades iniciales, para sistemas rápidos o lentos, respectivamente.

De reacciones rápidas, se puede obtener el perfil completo de la aparición de 4-nitrofenolato, es decir, hasta alcanzar la hidrólisis completa del sustrato, obteniéndose así una curva de absorbancia contra tiempo (Figura 25-B); dicha curva se ajusta a la ecuación integral de primer orden (Ecuación 3), donde A^{400} es la absorbancia a 400 nm; Δ_{∞} , es la diferencia entre absorbancia inicial y la infinita; A_0 , es la absorbancia al inicio; k_{obs} es la constante de velocidad observada y t es el tiempo.

$$A^{400} = A_0 + \Delta A_{\infty} (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (3)$$

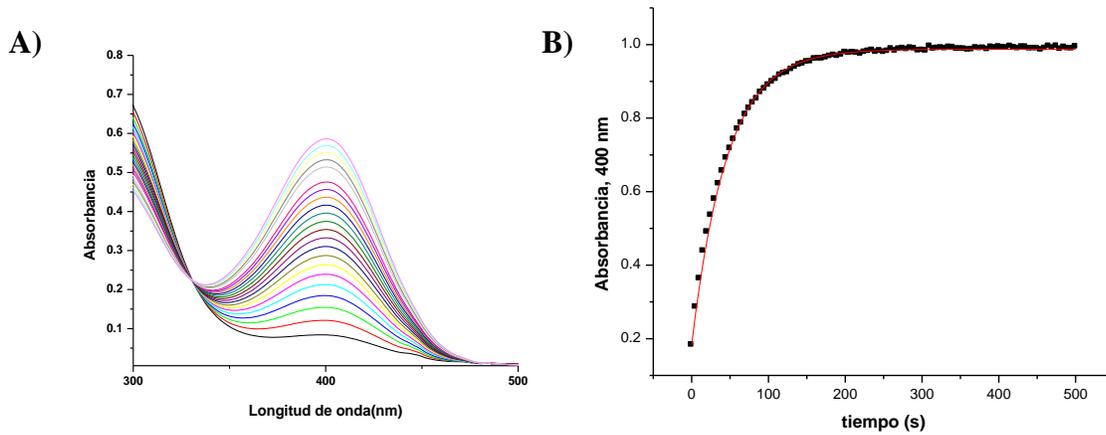


Figura 25. (A) Monitoreo de la absorbancia de nitrofenolato a 400 nm a través del tiempo. (B) Ejemplo del ajuste integral para la curva cinética. La línea sólida muestra el ajuste a la ecuación 3.

Por otro lado, cuando las cinéticas eran lentas se utilizó el método de las velocidades iniciales para obtener k_{obs} . Los datos experimentales de las curvas cinéticas (gráficas de absorbancia de 4-nitrofenolato contra tiempo), con un máximo de 10% de conversión del sustrato, se ajustaron mediante regresiones lineales en donde la pendiente es la velocidad inicial, v_0 . De la ecuación 4 podemos ver que al dividir v_0 entre la A_{∞} obtenemos k_{obs} .

$$v_0 = \left[\frac{dA_{NF}}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = k_{obs} \epsilon_{NF} [S]_0 = k_{obs} A_{\infty}^{pH}; A_{\infty}^{pH} = [S_0] [\epsilon_{NF}]$$

$$k_{obs} = \left[\frac{v_0}{A_{\infty}^{pH}} \right] \quad (4)$$

Cabe entonces resaltar que A_{∞} se obtiene de multiplicar ϵ_{NF} por la concentración de sustrato añadido en la celda, donde ϵ_{NF} es el coeficiente de absortividad molar de 4-nitrofenolato a un pH

definido. Para tener una gráfica de ϵ_{NF} contra pH (Figura 26), se realizó una titulación de nitrofenol 0.049 mM, en presencia de 50 mM de MOPS (MOPS para mantener la fuerza iónica) en agua con NaOH 0.5M. La razón de variación de la absorptividad molar del nitrofenol con el cambio de pH es su disociación ácida en el intervalo de pH 6-8.

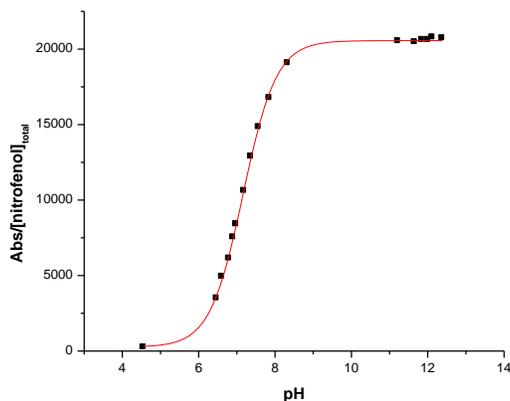


Figura 26. Gráfica de ϵ_{NF} contra pH.

4.2.3 Estudios potenciométricos

Para este estudio se utilizó un potenciómetro de la marca Thermo Orion Modelo 710A, con una precisión de ± 0.01 en unidad de pH, empleando un electrodo de vidrio Orion 8102BNUWP. Para calibrar el potenciómetro se usaron amortiguadores estándar de referencia a 25°C, pH 4.00, 7.00 y 10.00, marca Aldrich, con precisión de ± 0.01 .

Se realizaron titulaciones potenciométricas de los metales, ligantes y de la mezcla de ambos. Las concentraciones fueron de 1-5 mM, con fuerza iónica de 50 mM, empleando como electrolito NaCl. Las titulaciones se llevaron a cabo con NaOH ≈ 0.5 M (el cual se valoraba por la titulación de biftalato de sodio, obteniéndose su concentración real), adicionando volúmenes pequeños a una celda con 25 mL de la mezcla a titular, a 25°C y con flujo de nitrógeno.

4.2.4. Estudios por RMN ^1H

Los espectros de RMN ^1H presentes en este trabajo se realizaron en un espectrómetro de RMN Varian Gemini de 300 MHz. Las muestras fueron disueltas en D_2O en concentraciones de 2-10 mM.

Para los ligantes Bis-Tris y $\beta\text{-CD}$ se realizaron titulaciones en presencia de $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ y se midieron los desplazamientos químicos (δ_{obs}). En el caso de $\beta\text{-CD}$, se realizó la titulación con BNPP y HPNPP, en concentraciones de 0-5 mM. En algunos casos, los datos se ajustaron con la ecuación 5 que corresponde a una asociación del tipo 1:1, y que toma en cuenta las condiciones de intercambio rápido de ligantes.

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{libre}} + 0.5(\Delta\delta/[\beta\text{-CD}])([\beta\text{-CD}] + [\text{L}] + 1/\text{K} - (([\beta\text{-CD}] + [\text{L}] + 1/\text{K})^2 - 4[\beta\text{-CD}][\text{L}])^{0.5}) \quad (5)$$

donde $\Delta\delta = (\delta_{\text{enlazado}} - \delta_{\text{libre}})$

4.2.5. Programas de Cómputo

Los ajustes por regresión lineal y no lineal para la obtención de constantes de velocidades por el método de velocidades iniciales o por el ajuste de constantes de velocidad al método integral, respectivamente, se obtuvo con el programa Origin versión 6, 7 y 8.5. Las constantes de formación se obtuvieron a partir del estudio de las titulaciones potenciométricas, calculadas con ayuda del programa HYPERQUAD 2003 versión 3.0.51. Los diagramas de distribución de especies se modelaron en el programa HYSS 2003 y los espectros de resonancia fueron procesados con el programa MestReNova.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Hidrólisis de HPNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) con ligantes derivados de ácido picolínico

Se estudiaron varios ligantes derivados del ácido picolínico, entre ellos, el ácido picolínico (AP), el ácido 3-hidroxipiridina 2- carboxílico (AHC), el ácido 6-aminopiridina 2-carboxílico (APCA), el ácido 6-acetilamino 2-piridincarboxílico (AcAPCA), el ácido 2-piridinhidroxámico (APH), el ácido benzohidroxámico (ABH), el ácido dipicolínico (ADP), el ácido chelidámico (ACM) y el ácido chelidónico (ACN) (Figura 27).

Se realizaron diferentes pruebas cinéticas con el ligante AHC en presencia de Eu^{3+} , en relación 1:1 M:L, en un intervalo de pH de 6.4 a 8.14 (utilizando MOPS 50 mM para ajustar el valor de $\text{pH} \leq 8$ ó CHES para $\text{pH} > 8$). Sin embargo, antes de comenzar la hidrólisis del sustrato se observó la presencia de precipitado. Antes de descartar el estudio de este ligante se hicieron pruebas a $\text{pH}=8$ variando la relación M:L (1:2,2:1 y 1:0.5) sin obtener una estabilidad en el sistema. Así mismo, el ligante ABH presentó precipitado (en relación 1:1 (a $\text{pH} 8$ y 7) y 1:1.5 ($\text{pH}=8$), por lo que se descontinuó su estudio.

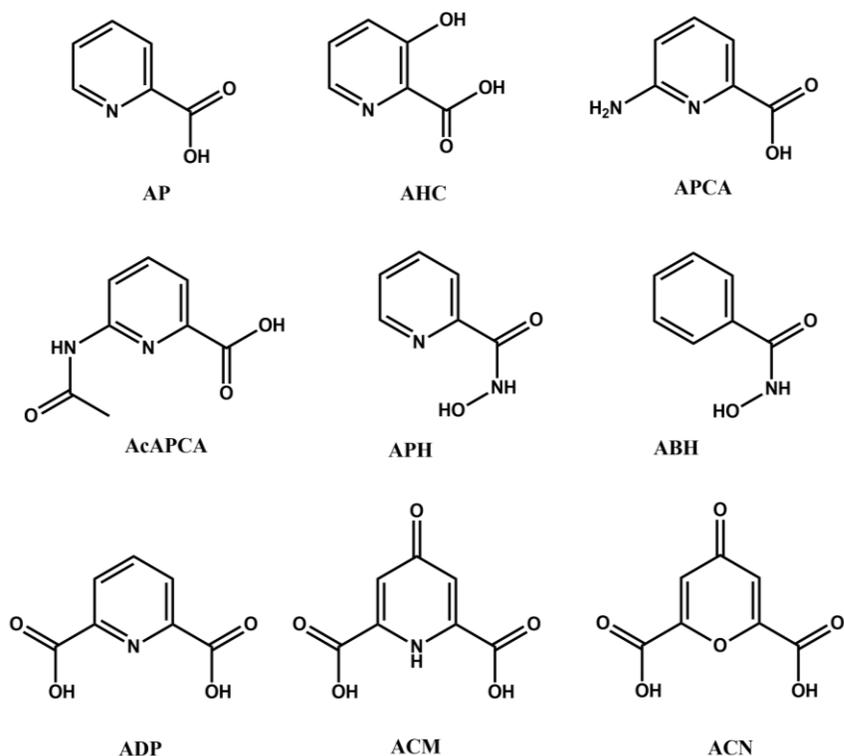


Figura 27. Ligantes derivados de ácido picolínico que se estudiaron en el presente trabajo.

Así mismo, se realizó el estudio cinético de APCA, AP, APH en presencia de Eu^{3+} a diferentes pH, cubriendo el intervalo de 6.5 a 8.7 unidades de pH (empleando MOPS o CHES como amortiguadores), con una relación M:L 1:1.5 (mM) e hidrolizando el sustrato HPNPP. Como resultado se obtuvieron perfiles cinéticos diferentes para cada ligante empleado, esto sugiere que, en disolución existen diferentes especies de hidroxocomplejos en los diferentes sistemas (Figura 28); para APCA, a medida que se aumenta el pH hay un aumento de la k_{obs} hasta llegar a un primer máximo a pH alrededor de 7.8 ($k_{\text{obs}}=5.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), donde empieza a disminuir la k_{obs} hasta llegar a pH 8.2 ($k_{\text{obs}}=2.68 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), posteriormente se observa una mayor dependencia de la k_{obs} con respecto al pH hasta alcanzar el segundo máximo a 8.5 unidades de pH ($k_{\text{obs}}=0.00112 \text{ s}^{-1}$). El perfil cinético del ligante APH muestra un aumento de k_{obs} conforme aumenta el pH, hasta alcanzar un máximo a pH 7.49 ($k_{\text{obs}}=2.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), posteriormente disminuye a pH 7.97 ($k_{\text{obs}}=2.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) y a pH 8.49 vuelve a aumentar ligeramente ($k_{\text{obs}}=1.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Con el ligante AP se observa que la k_{obs} aumenta a mayor pH (de $k_{\text{obs}}=7.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a pH= 6.37 a $k_{\text{obs}}=1.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH= 8.48) de manera lineal. A modo comparativo se tiene la hidrólisis del ion Eu^{3+} sin ligante en medio acuoso, el perfil cinético muestra un crecimiento exponencial a medida que se aumenta el pH (de $1.8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a pH= 6 a $k_{\text{obs}}=1.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH= 7), sin embargo, sabemos que el acuo ion Eu^{3+} no es estable a pH básicos y precipita ^[82], por lo que los ligantes APCA, APH y AP le confieren al metal estabilidad al coordinarse y permiten medir constantes de velocidad a pH mayores. La mayor reactividad de APCA comparada con AP y APH probablemente se deba a la presencia de hidroxocomplejos binucleares.

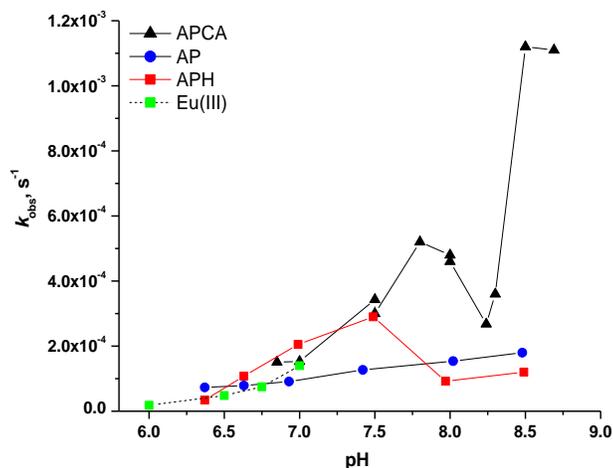


Figura 28. Constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de HPNPP vs pH, en presencia de Eu^{3+} (1mM) para diferentes ligantes derivados de ácido picolínico en concentraciones de 1.5 mM y Buffer MOPS/CHES (50 mM).

En la figura 29 se presentan los resultados cinéticos de ACN, APH, ADP y ACM (1mM) con el metal Eu^{3+} (1 mM) en presencia del sustrato HPNPP. Los perfiles cinéticos están en el intervalo de 6.4 a 8.4 unidades de pH y los ligantes APH, ACN, y ACM muestran que a medida que se aumenta el pH, incrementa el valor de la k_{obs} hasta llegar un máximo en cada caso para luego disminuir; la k_{obs} máxima para estos ligantes es de 4.3×10^{-4} , 1.56×10^{-4} y $3.69 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a pH 8.09, 7.54 y 6.84, respectivamente. El estudio del ligante ADP se limita por la estabilidad del sistema, observándose precipitado a pH por arriba de 6.93 ($k_{\text{obs}}=6.83 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a pH 6.93), para los ligantes ACN y ACM hay presencia de precipitado a pH por arriba de 7.97 y 7.68 ($k_{\text{obs}}=8.1 \times 10^{-5}$ y $k_{\text{obs}}=1.04 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), respectivamente. Comparando las reactividades de los ligantes con el acuo ion Eu^{3+} , la reactividad de ACM es menor que el acuo ion, indicando que el sistema no es activo catalíticamente y que hay inhibición de la reactividad del metal por la coordinación de éste al centro metálico. En el caso ADP los dos primeros puntos reportados pueden ser de una k_{obs} donde el ligante no se ha coordinado al Eu^{3+} y por lo tanto la actividad catalítica está dado por el acuo ion, pero con el tercer punto podemos ver una disminución en de la k_{obs} en comparación con el acuo ion por la coordinación de este ligante al centro metálico. Para el ACN a pH de 6.43 ($k_{\text{obs}}=4.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) vemos reactividad parecida al acuo ion, pero posteriormente vemos una disminución de la reactividad en comparación a éste; aunque este ligante nos permitió medir cinéticas hasta pH de 8, su baja actividad no ameritó mayor estudio.

Una posible explicación de que la k_{obs} para estos ligantes sea menor a la del acuo ion es debido a su estructura química; poseen dos grupos carboxílico que al desprotonarse pueden coordinarse al ion metálico en forma bidentada por estos grupos, al coordinarse de esta forma habrá un menor número de sitios vacantes para coordinar hidroxilos, que son aquellos que hacen el ataque nucleofílico hacia el átomo de fósforo; entonces mientras menor es el número de hidroxilos, menor actividad catalítica. Esto también explica porque el ACN tiene mayor actividad que el ACM, debido a que éste último ocupara un sitio más (con el nitrógeno piridínico) en la esfera de coordinación del metal, limitando el número de grupos hidroxilo en la misma y disminuyendo la reactividad del hidroxocomplejo en el sistema.

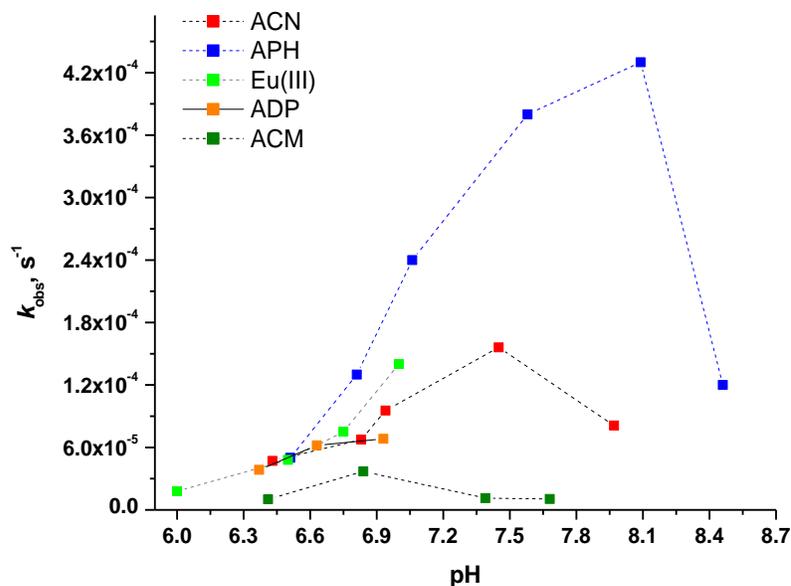


Figura 29. Constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de HPNPP vs pH, en presencia de Eu^{3+} (1mM) para diferentes ligantes derivados de ácido picolínico en concentraciones de 1 mM y Buffer MOPS/CHES (50 mM).

De los ligantes derivados de ácido picolínico estudiados en la hidrólisis de HPNPP en la presencia del ion metálico Eu^{3+} , el que fue más activo catalíticamente y con el que se pudo llegar al valor de pH más alto fue con el ligante APCA. Por ello se realizó el estudio cinético a diferentes valores de pH con el sustrato BNPP. En la figura 30 podemos comparar datos cinéticos de la constante de velocidad observada para la hidrólisis de HPNPP y BNPP para APCA 1.5 mM y Eu^{3+} (1 mM) con amortiguador MOPS/CHES 50 mM. Tomando en cuenta que los valores de k_{obs} para hidrólisis espontánea de HPNPP y BNPP a pH 8 son 1×10^{-7} y $1.1 \times 10^{-11} s^{-1}$, respectivamente [83], el efecto catalítico para el sistema con HPNPP y BNPP fue de 4×10^3 y 1×10^7 a este pH; esto nos dice que la eficiencia catalítica comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea es más que 1000 veces mayor para BNPP que para HPNP con este catión y ligante. Como veremos a continuación la mayor eficiencia de catálisis en la ruptura del análogo de ADN comparando con el análogo de ARN es un fenómeno general para lantánidos en contraste con cationes alcalinotérreos y con Zn(II).

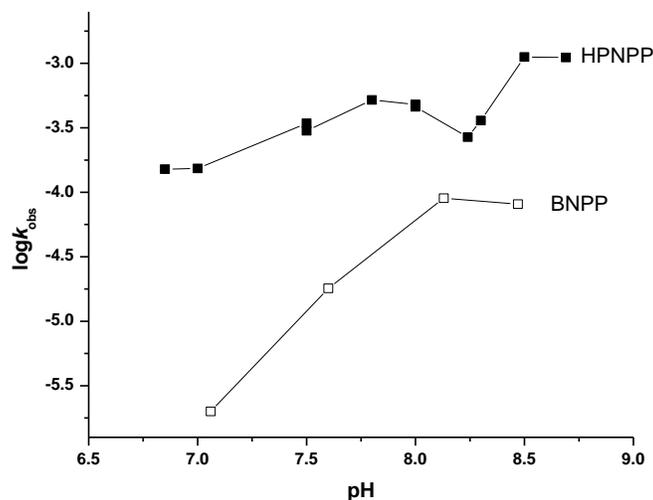


Figura 30. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de BNPP y HPNPP vs pH, en presencia del ligante APCA (1.5 mM) y Eu^{3+} (1mM) en medio acuoso a 25°C. El pH se mantuvo con amortiguador MOPS y CHES 50 mM.

Debido a que se encontró mayor eficiencia catalítica en el sistema con el sustrato BNPP, se realizó el estudio de la dependencia de k_{obs} vs la variación en la concentración de APCA con el ion metálico Eu^{3+} (1 mM) en medio acuoso, pH=8, 50 mM MOPS, y 25°C con éste sustrato (Figura 31). Observamos que k_{obs} pasa por un máximo cuando [APCA] es 1 mM ($k_{obs}= 1.37 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) y posteriormente disminuye al aumentar la concentración de ligante; esto se debe a que aumentando la concentración de ligante, la concentración de la especie activa va disminuyendo; un mayor número de ligantes coordinados al centro metálico inhibe así la formación del hidroxocomplejo.

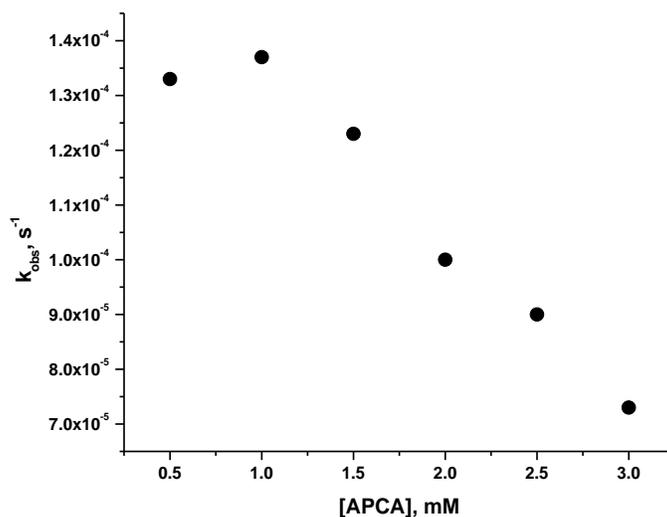


Figura 31. Constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de BNPP vs concentración de APCA, en presencia de Eu^{3+} (1mM) en medio acuoso, pH=8 (50 mM MOPS) y 25°C.

5.1.1 Análisis del efecto de amortiguador

Para saber si el amortiguador que usamos estaba interfiriendo en la reactividad del sistema, realizamos pruebas cinéticas con y sin amortiguador; para los sistemas sin amortiguador se utilizó NaCl 50 mM para mantener la misma fuerza iónica. Los sistemas que se estudiaron sin amortiguador fueron los ligantes APCA, AP y AcAPCA (2.5mM) en la presencia de Eu^{3+} (1mM) hidrolizando HPNPP (Figura 32). Conforme aumenta el pH se observa un incremento en la k_{obs} para los tres sistemas de ligantes, teniendo así un mismo perfil cinético. APCA presenta mayor reactividad pasando de una $k_{\text{obs}} = 2.52 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.41 a una $k_{\text{obs}} = 6.86 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 8.8. El segundo ligante más activo en la serie es AP, donde a pH 7.22 da una k_{obs} de $5.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, incrementando dicho valor hasta k_{obs} de $3.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 9.32. Por último, con el ligante AcAPCA se obtuvieron valores de $k_{\text{obs}} = 5.3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.78 hasta llegar a el valor de $k_{\text{obs}} = 3.37 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 9.01. En la gráfica A de la figura 32 podemos ver también la comparación de estos sistemas con la hidrólisis del acuo ion Eu^{3+} , observando que estos ligantes al coordinarse al centro metálico estabilizan el ion formando hidroxocomplejos reactivos.

Comparando los dos sistemas más activos sin amortiguador estudiados (APCA y AP), en presencia de amortiguador MOPS/CHES 50 mM, se obtiene la gráfica B de la figura 32. El ligante APCA muestra dos perfiles cinéticos distintos con y sin presencia de amortiguador, lo que refleja que el amortiguador está interfiriendo en el sistema. Esto puede explicarse por la estructura de MOPS o CHES y a que se ocupó en alta concentración; el nitrógeno del grupo morfolino (MOPS) o el nitrógeno del grupo amino (en CHES) y el oxígeno del grupo sulfonato (de MOPS /CHES) pueden coordinarse al centro metálico e interferir con la coordinación del ligante que estamos estudiando, existiendo una competencia del ligante y el amortiguador por anión Eu^{3+} y así distorsionando la distribución de especies del sistema. Analizando el mismo efecto del amortiguador con el AP, vemos también la interferencia del amortiguador; sin la presencia de éste se pudo medir la reactividad del sistema hasta pH 9.32 lo cual no había sido posible en la presencia de MOPS/CHES, llegando sólo hasta mediciones de k_{obs} a pH 8.48 por la presencia de precipitado. Esto nos dice que los complejos formados con el amortiguador y el ligante en medio acuoso en presencia de Eu^{3+} son sistemas menos solubles que aquellos formados sólo por el ligante.

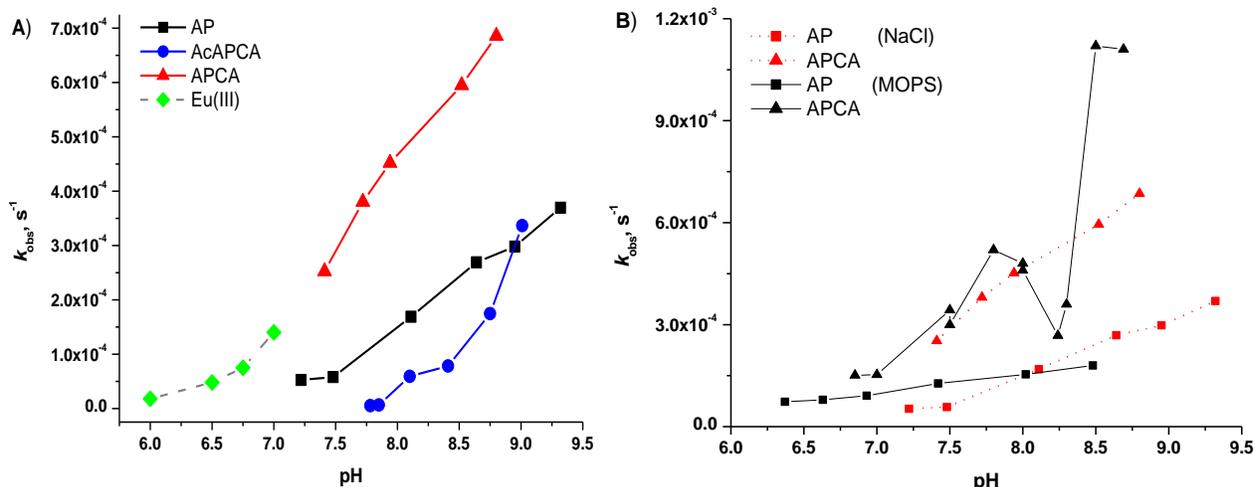


Figura 32. (A) Constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de HPNPP vs pH, en presencia de Eu^{3+} (1mM) y diferentes ligantes derivados de ácido picolínico en concentraciones de 2.5 mM sin presencia de Buffer (NaCl 50 mM). (B) Comparación de las k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs pH para sistemas con y sin amortiguador MOPS/CHES, con ligante 1.5 mM y 2.5 mM, respectivamente, y 1 mM Eu^{3+} . *La comparación se hizo tomando en cuenta los cálculos de las especies al ver que no varían en gran medida al emplear 1.5 ó 2.5 mM de ligante.

5.1.2 Caracterización de las especies presentes en la disolución

Con base en los resultados anteriores, se prosiguió a caracterizar las especies presentes en la disolución en los sistemas con el ligante APCA, AP y AcAPCA 2.5 mM en presencia del ion metálico Eu^{3+} 1 mM y en ausencia de amortiguador, así como a obtener las constantes de segundo orden para cada especie, calculadas a partir de regresiones múltiples en la dependencia de k_{obs} en función del pH.

Para caracterizar las especies presentes en disolución, se realizaron titulaciones potenciométricas de estos ligantes en presencia de Eu^{3+} , (el ejemplo se presenta en las figuras A1 y A2 en anexos) las cuales permitieron determinar las constantes de estabilidad resumidas en la tabla 3 y calcular los diagramas de distribución de especies para cada sistema a estudiar. El análisis de los datos potenciométricos se realiza con el programa Hyperquad proponiendo especies en equilibrio y ajustando a un modelo en el que se simula la curva de titulación del ligante con el metal (Figura A1 en anexos); de ahí se obtienen las especies en el equilibrio con sus respectivas constantes de estabilidad $\log \beta_{pqr}$ ($pM + qL + rH = M_pL_qH_r$ (donde L es el ligante

desprotonado)) y pK_a (Tabla 3). Una vez obtenidas las constantes de estabilidad, se simula la distribución de especies en equilibrio empleando el programa Hyss tomando en cuenta las condiciones cinéticas que incluyen concentración total del metal y ligante, y un intervalo de pH.

Tabla 3. Constantes de estabilidad de complejos con Eu^{3+} $\log\beta_{pqr}$ y pK_a (donde L es el ligante desprotonado) para derivados del ácido picolínico y amortiguadores. ($pM + qL + rH = M_pL_qH_r$).

	pK_a^{HL}	$\log\beta_{110}$	$\log\beta_{120}$	$\log\beta_{130}$	$\log\beta_{11-1}$	$\log\beta_{11-2}$	$\log\beta_{22-5}$	$\log\beta_{11-3}$
APCA	7.11	3.00	5.84		-5.11	-12.26	-29.73	-21.10
AcAPCA	4.20	5.69	9.71		-2.98	-11.98		-22.03
AP	5.28	4.25	7.75	10.73	-3.54	-11.82	-30.06	
AP ^{a)}	5.75	4.38	8.23	11.13				
MOPS	7.21	2.05						
TRIS	8.34	2.55						

^{a)} Datos obtenidos de ^[51]; a 25°C en 1.0 M de NaClO_4 .

De los datos de la Tabla 3 se observa que comparando con el ácido picolínico no sustituido, APCA es un ácido más débil y AcAPCA un ácido más fuerte. Esto está en acuerdo con los efectos de sustituyentes esperados: efecto donador del grupo amino y aceptor del acetamida. Sin embargo, la estabilidad de los complejos metálicos, que normalmente es mayor con un ligante más básico (en su forma desprotonada), no sigue a la tendencia esperada $\text{AcAPCA} < \text{AP} < \text{APCA}$. Al contrario, los complejos más estables se forman con el ligante menos básico AcAPCA y los más débiles con el ligante más básico APCA. La explicación posible es que el grupo NH_2 en posición *orto* no puede coordinarse con el ion metálico ya que esto implicaría la formación de un ciclo de 4 miembros poco favorable; y sólo se impide la coordinación por el efecto estérico (Figura 33) que resulta ser mayor que el efecto favorable del aumento del pK_a (fenómeno reportado para ligantes piridínicos ^[84]). Por otro lado, el oxígeno del grupo acetyl de AcAPCA puede formar un enlace de coordinación con el metal y esto explica mayor estabilidad de complejos con este ligante. Entonces el efecto estabilizador más grande lo debe tener AcAPCA; pero al mismo tiempo como se observa en la figura 32-A, sus complejos tienen una actividad más baja probablemente por una saturación coordinativa del centro metálico.

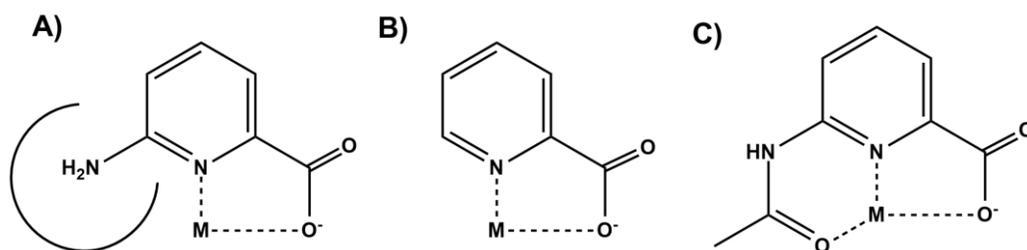


Figura 33. Tipo de coordinación esperado para **A)** APCA, **B)** AP y **C)** AcAPCA.

Para asignar las especies activas se compara la distribución de la concentración de las especies y las constantes de velocidad observadas k_{obs} en función del pH (Figura 34). Claramente el crecimiento de k_{obs} a mayor pH puede atribuirse a la formación de hidroxocomplejos, sin embargo, los perfiles de pH para k_{obs} no correlacionan con el perfil correspondiente de concentración de sólo una especie; esto significa que a la reactividad observada contribuyen más de una especie y que la expresión para k_{obs} como función de las concentraciones de varias especies debe tener la forma de la ecuación (6).

$$k_{\text{cal HPNPP}} = k_1[\text{Eu}(\text{OH})^{2+}] + k_2[\text{EuL}(\text{OH})] + k_3 [\text{EuL}(\text{OH})_2] + k_4 [\text{Eu}_2\text{L}_2(\text{OH})_5] \quad (6)$$

Para conocer cuáles de estas especies y en qué grado contribuyen en la ruptura, se realizaron regresiones múltiples para simular la k_{obs} a partir de las concentraciones de los hidroxocomplejos a los pH en los que se realizaron los estudios cinéticos, así se obtuvo que las especies activas del sistema con APCA son $\text{M}(\text{OH})$, $\text{ML}(\text{OH})$ y $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_5$, con constantes de segundo orden presentes en la tabla 4, donde $\text{ML}(\text{OH})_2$ no contribuye. Para el ligante AP se encontró que las especies activas son $\text{ML}(\text{OH})$, $\text{ML}(\text{OH})_2$ y $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_5$, mientras que con AcAPCA son sólo dos especies las activas, $\text{EuL}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{EuL}(\text{OH})_2^+$ con constantes de segundo orden resumidas en la tabla 4. Con APCA, se tienen constantes con mayor reactividad que con AP y AcAPCA, lo cual no es sorpresa ya que teníamos valores mayores de k_{obs} para este sistema. Hay mejor reactividad cuando se tiene el complejo $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_5$ lo que concuerda con resultados ya reportados utilizando BTP^[3a] ya que se tiene un hidroxocomplejo con un mayor número de grupo hidroxos nucleofílicos; los resultados por potenciometría corroboran la existencia de este complejo en APCA y AP con constantes de estabilidad alta (Tabla 3). La constante de segundo

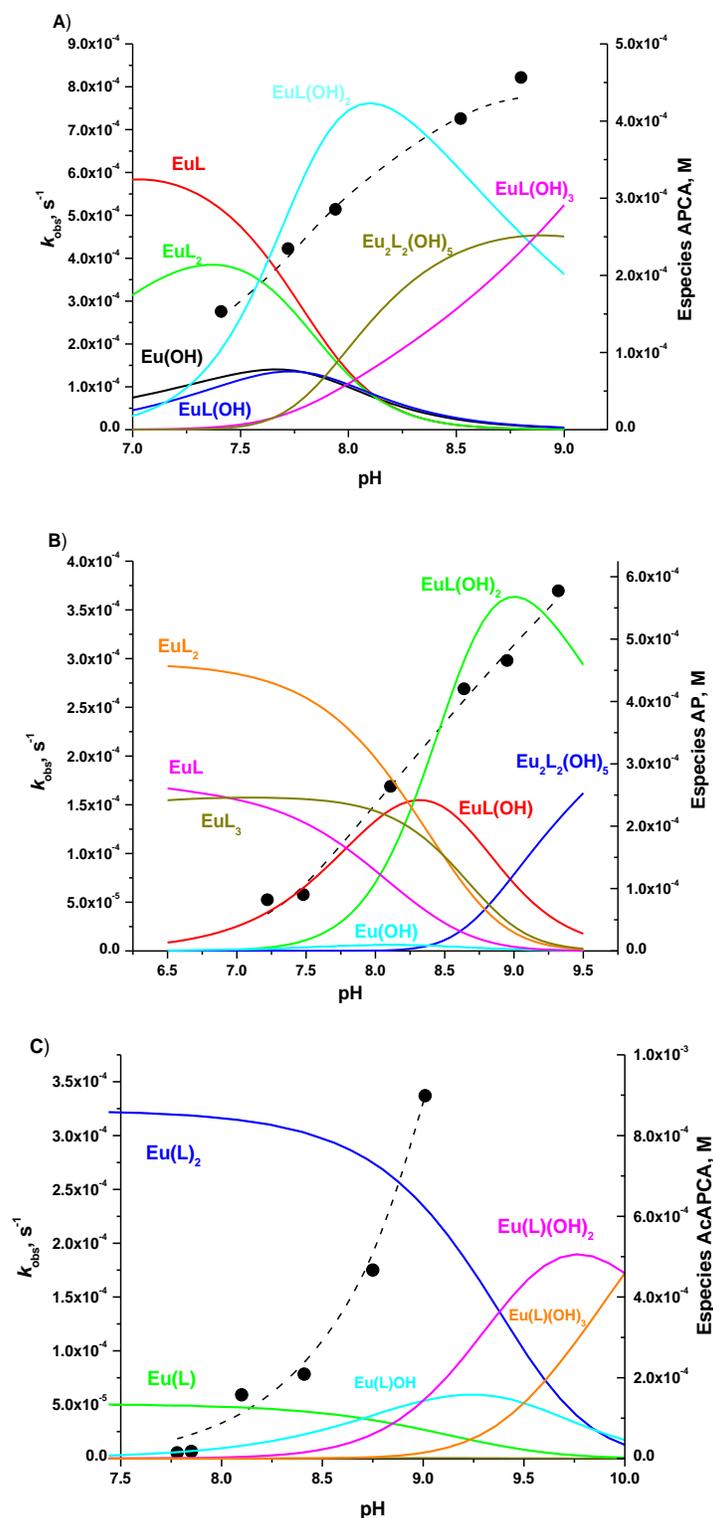


Figura 34. Diagrama de distribución de especies traslapada con los valores de k_{obs} y k_{cal} de **A)** APCA, **B)** AP, **C)** AcAPCA 2.5 mM, Eu^{3+} 1 mM, NaCl 50 mM y HPNPP 2.5×10^{-5} M. Las líneas continuas representan la distribución de especies en las condiciones en que la cinética se realizó. Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} y la línea punteada a los valores de k_{cal} calculada por la ecuación (6) con constantes de velocidad de la tabla 4 para cada sistema, respectivamente.

orden estimada para especies $\text{Eu}(\text{OH})^{2+}$ sin ligante es igual a $1.4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que para $\text{EuL}(\text{OH})$ es 2.9, 0.6 y $1.15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ con el ligante APCA, AP y AcAPCA, respectivamente. Esto nos dice que el complejo con APCA es más reactivo, mientras que los complejos con AP y AcAPCA son menos reactivos que el acuo ion; esto puede corroborarse en la figura 32-A.

Tabla 4. Constantes de segundo orden ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para la hidrólisis de HPNPP por complejos de Eu^{3+} con diferentes ligantes derivados de ácido picolínico a 25°C y medio acuoso.

	$\text{Eu}(\text{OH})^{2+}$	APCA	AP	AcAPCA
k_1	1.4			
k_2		2.9	0.6	1.15
k_3			0.2	1.04
k_4		3	1.1	

La razón de tener una actividad mayor de los complejos de APCA no es claro. Sin embargo, por la baja estabilidad de los complejos de este ligante se discontinuó su estudio ya que no tiene mucha perspectiva para aplicaciones.

5.2 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) con ligantes derivados de Tris

El estudio se continuó comparando la actividad de Eu^{3+} 1mM en presencia de TRIS 50 mM con el sustrato HPNPP y BNPP. En la figura 35 podemos observar que estos dos sistemas tienen el mismo perfil cinético; para el sistema con HPNPP se obtuvieron valores de $k_{\text{obs}}=1.37 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 7, al aumentar el pH se aumentó k_{obs} hasta llegar a un intervalo de pH en el que no era mucho el cambio ($k_{\text{obs}}=4.24 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pH 7.5 a $k_{\text{obs}} 4.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pH 8.3) dando incremento ligero nuevamente a pH 8.6 ($k_{\text{obs}}=5.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). El efecto catalítico para el sistema con HPNPP y BNPP fue de 4.4×10^3 y 1.9×10^6 a pH 8, respectivamente; esto nos dice que la eficiencia catalítica, comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea, es 1000 veces mayor para BNPP que para HPNPP con este catión y ligante. Este nivel de actividad catalítica es cercano al observado con APCA, pero el ligante no tiene un efecto estabilizador significativo. Por otro lado, pruebas con Bis-Tris como ligante mostraron un efecto estabilizador sobresaliente: no hay precipitación del

metal hasta pH alto como 9-10. Por esta razón realizamos un estudio del sistema Bis-Tris – ión lantánido(III) con más detalles.

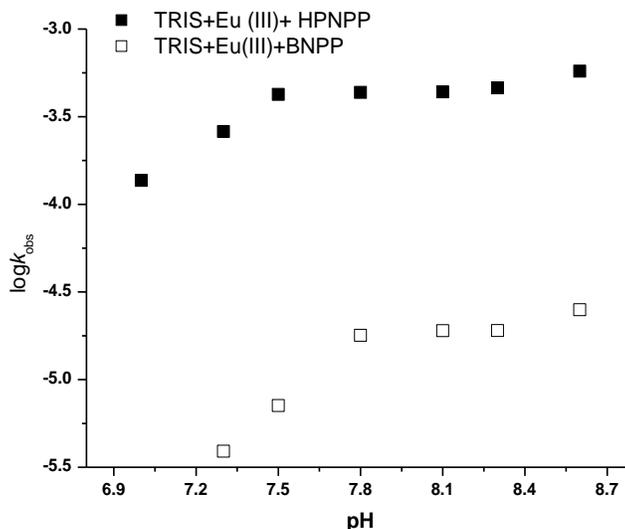


Figura 35. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de HPNPP y BNPP vs pH, en presencia de TRIS (50 mM) y Eu^{3+} (1mM) en medio acuoso a 25°C.

Con el objetivo de estudiar sistemas con Bis-Tris como ligante, se propuso analizar si las pruebas cinéticas podrían hacerse en presencia del amortiguador Tris, ya que tal como se había analizado, sugiere ser el mejor buffer para mantener el pH en el sistema sin que interfiera. En la figura 36 se observa el perfil cinético con Bis-Tris 2.5 mM sin amortiguador comparado con el de Tris 50 mM, ambos en presencia de Eu^{3+} y HPNPP como sustrato. Se muestra que el buffer Tris no puede ser usado en el estudio cinético con Bis-Tris ya que la alta concentración del mismo interfiere en las k_{obs} del sistema. Afortunadamente el sistema Bis-Tris - ion lantánido(III) tiene suficiente capacidad amortiguadora para mantener constante el pH en el proceso de hidrólisis de sustratos empleados en concentraciones al menos 10 veces por debajo de la concentración del ligante.

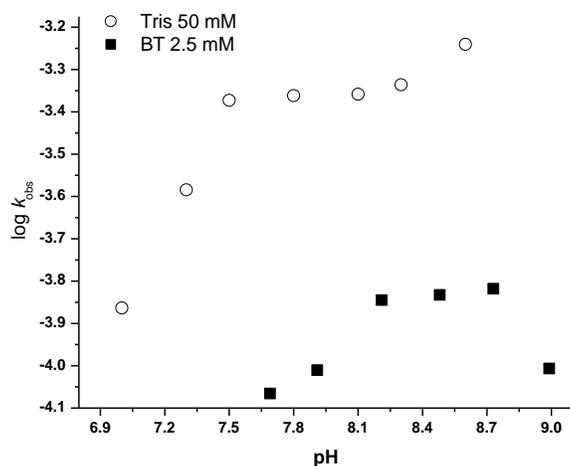
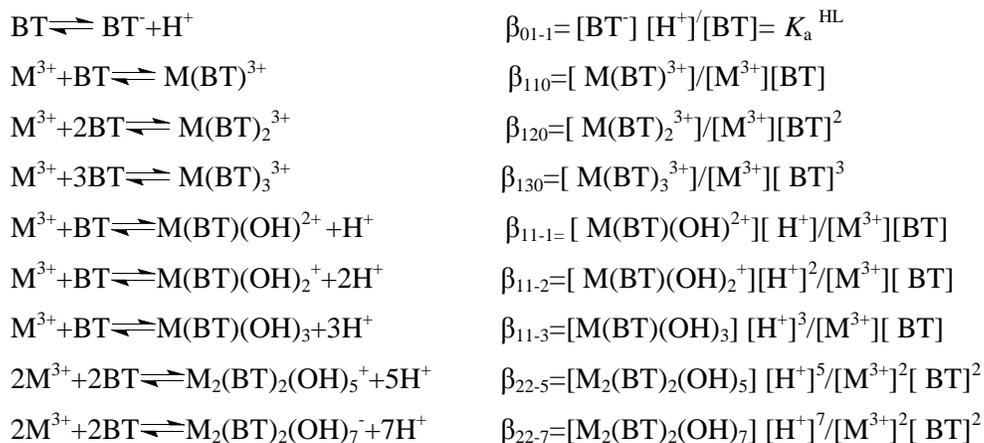


Figura 36. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} , para la hidrólisis de HPNPP vs pH de Bis-Tris (2.5 mM) (cuadros) y TRIS (50 mM) (bolitas), en presencia de Eu^{3+} (1mM).

5.3 Formación y estabilidad de hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris

Se realizaron titulaciones potenciométricas de los diferentes metales lantánidos(III) 1mM con Bis-Tris 2.5 mM manteniendo la fuerza iónica con NaCl 50 mM y asegurando que Bis-Tris estuviera protonado añadiendo 1 equivalente de HCl. Estos estudios mostraron la formación de complejos mononucleares estables de composición $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_n$ con $n=0-3$ (Tabla 5). Los valores de β representan la constante de formación global de los siguientes equilibrios:



Otros resultados que se obtuvieron a partir de las titulaciones potenciométricas fueron los valores del primer y segundo $\text{p}K_a$ para complejos con cada metal lantánido estudiado ($\text{p}K_a^{\text{ML}}$ y $\text{p}K_a^{\text{ML}(\text{OH})}$) y éstos fueron comparados con los valores de $\text{p}K_a^{\text{M}}$ (Tabla 5) [39b]. Los equilibrios son los siguientes:

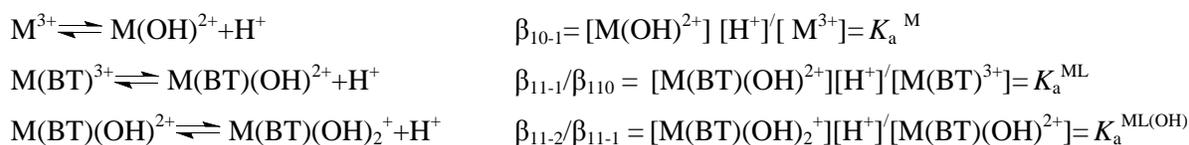


Tabla 5. Constantes de estabilidad $\log\beta_{pqr}$ y pK_a (donde L es el ligante desprotonado) para Bis-Tris. ($pM + qL + rH = M_pL_qH_r$).

pK_a^{HL}	$\log\beta_{110}$	$\log\beta_{120}$	$\log\beta_{130}$	$\log\beta_{11-1}$	$\log\beta_{11-2}$	$\log\beta_{11-3}$	$\log\beta_{22-7}$	$pK_a^{M^a}$	pK_a^{ML}	$pK_a^{ML(OH)}$
La(III)										
6.625	3.61	7.59	10.49	-3.74	-13.58	-24.50	-54.02	8.81	7.35	9.84
6.48 ^{b)}	3.76 ^{b)}	8.20 ^{b)}								
Pr(III)										
	3.85	8.50	10.28	-3.32	-12.97	-21.71		8.32	7.17	9.65
Nd(III)										
	4.18	8.28		-3.65	-13.25	-21.75		8.18	7.825	9.6
	4.54 ^{b)}	8.40 ^{b)}								
Eu(III)										
	4.915	8.40	10.76	-2.64	-10.81	-20.05		7.76	7.555	8.17
	5.13 ^{b)}	8.75 ^{b)}								
Gd(III)^{c)}										
	4.64	8.28			-10.75	-19.71	-45.66	7.83		
	6.23 ^{b)}	10.93 ^{b)}								
Dy(III)										
	4.35	6.49		-2.82	-10.80	-20.16		7.59	7.17	7.98
	5.48 ^{b)}	8.76 ^{b)}								

^{a)} Valores calculados usando $I=0$ a 25°C y la ecuación en ^[39b], ^{b)} Datos obtenidos por Nicholson y Wood ^[85]. ^{c)} Para Gd(III) existe un complejo adicional con $\log\beta_{11-4} = -29.61$

Las constantes de estabilidad obtenidos en este estudio son razonablemente cercanos a los reportados por Nicholson y Wood a 30°C y fuerza iónica 0.1 M .^[85] Podemos observar de la tabla 5 que la estabilidad en la formación de complejos metal-ligante de composición 1:1 sigue la siguiente tendencia $\text{La} < \text{Pr} < \text{Nd} < \text{Eu} > \text{Gd} > \text{Dy}$. Esto tiene congruencia debido a que mientras más ácido es el centro metálico, más factible va a hacer la aceptación de un nucleófilo (ligante) para así completar la deficiencia de electrones. La importancia particular la tiene el comportamiento de hidroxocomplejos ya que son las especies potencialmente activas. En la tabla 5 se incluyen los valores de pK_a de los acuo-iones de lantánidos y se observa que en general la tendencia del pK_a del metal es disminuir al ir a metales más pesados, una posible explicación es que a pesar de que aumenta su número atómico, disminuye su radio iónico (por la contracción lantánida) y por lo tanto aumenta la acidez (más oxofílico) por lo que puede llegar al equilibrio de desprotonación

del acuo-ion a pH menores. Los resultados obtenidos permiten calcular los valores de pK_a también para complejos metal ligante como $pK_a(ML) = \log\beta_{110} - \log\beta_{11-1}$. Estos valores están incluidos en la penúltima columna de la tabla 5 y se observa que el pK_a del ML para cada metal disminuye en comparación con el pK_a del acuo-catión, esto quiere decir que las especies ML^{3+} son ácidos más fuertes que las especies M^{3+}_{aq} . Este efecto, que es particularmente grande para lantánidos más ligeros, es decir con el radio iónico mas grande, no es trivial ya que la coordinación del ligante en principio debe bajar la acidez del catión por donación de pares electrónicos del ligante. El fenómeno es conocido también para complejos de Zn^{2+} empleados como modelos de enzimas Zn^{2+} y se atribuye al cambio del número de coordinación y otros efectos del ligante coordinado ^[86]. Vale la pena mencionar que el fenómeno nunca fue reportado para lantánidos. Así mismo, es posible calcular el segundo valor de pK_a del complejo como $pK_a(MLOH) = \log\beta_{11-1} - \log\beta_{11-2}$, los valores correspondientes están en la última columna de la tabla 5. Como se espera, estos valores son más altos. Las tendencias de los valores del primer y segundo pK_a son diferentes: mientras que el primer pK_a depende poco del tipo del catión, el segundo disminuye al aumentar el número atómico del catión de la misma manera pero más fuertemente, que para el caso del pK_a de los acuo-cationes.

5.3.1 Resonancia Magnética Nuclear de 1H en sistemas con Bis-Tris

Para obtener mayor información sobre el sistema de Bis-Tris con lantánidos(III) se propuso su estudio por RMN de 1H . Para ello, primero se obtuvo el espectro de Bis-Tris a diferentes pH para luego ser comparados con los espectros de Bis-Tris y metal a pH constante. En la figura 37 se presenta el espectro de RMN de 1H a pH 1.7, 5.6, 7.1 y 8.7 de BT. Se puede observar que a pH 1.7 sólo se tienen dos señales con un desplazamiento (δ) de 3.81 y 3.3 ppm, que a medida en que se aumenta el pH van desplazándose a campos más altos (pH= 5.6 δ =3.79 y 3.29; pH=7.1 δ =3.61 y 2.98 ppm), hasta que se observan tres señales a pH 8.72 a δ = 3.53, 3.46 y 2.82 ppm con multiplicidad de singulete para la primera nombrada y triplete para la segunda y tercera, respectivamente; estas señales fueron asignadas a la molécula de Bis-Tris en la figura 37 espectro 4. Las señales del espectro de Bis-Tris a pH 7.1 son muy anchas, esto es debido a que este pH es muy cercano al pK_a y existe el intercambio de protón y deuterio. La explicación de porque las señales van desplazándose a campos más altos es debido a que a pH mayores tenemos el

nitrógeno de Bis-Tris desprotonado, esto hace que los pares de electrones libres hagan un efecto de protección a los protones necesitando así mayor energía para excitar a los espines nucleares.

Adicionalmente, con los valores de los desplazamientos de los espectros de Bis-Tris a diferentes pH se pudo realizar una gráfica de desplazamiento (de la señal más desplazada) vs pH (Figura 38) y se obtuvo el valor de pK_a de BT de 6.69, la cual es comparable con el pK_a obtenido por potenciometría= 6.63 o el reportado por K. N Nicholson de 6.48 ^[85].

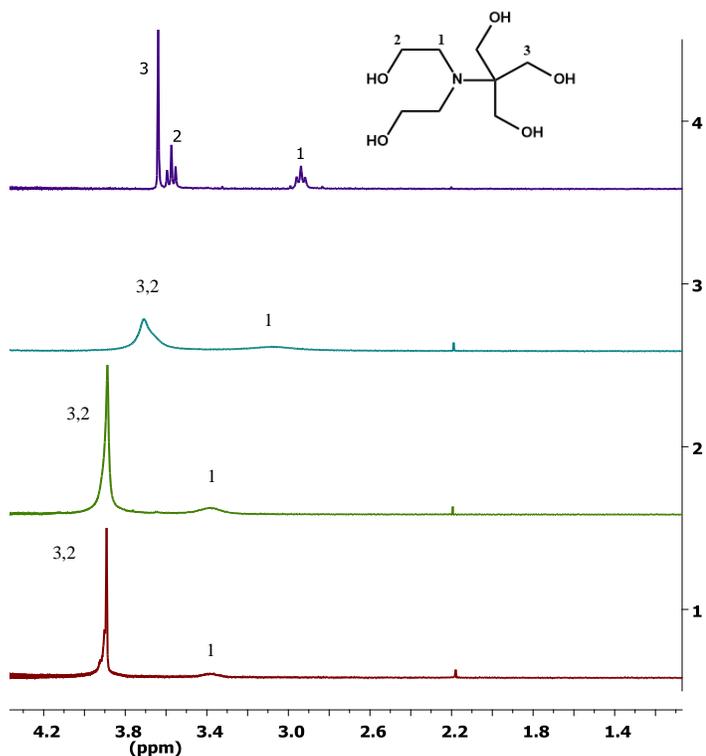


Figura 37. Espectro de RMN ^1H de Bis-Tris a 1) 1.7, 2) 5.6, 3) 7.07 y 4) 8.78 unidades de pH, en D_2O .

Los espectros de RMN ^1H de Bis-Tris con lantánidos se realizaron con Eu^{3+} y Nd^{3+} debido a que estos metales son los que ensanchan menos las señales del espectro. Dichas señales no se alcanzaban a ver porque la señal del agua era muy intensa, por lo que se optó por realizar experimentos PRESAT (supresión del agua por presaturación), que permite obtener espectros donde la señal del agua es casi removida y mejora la relación señal-ruido.

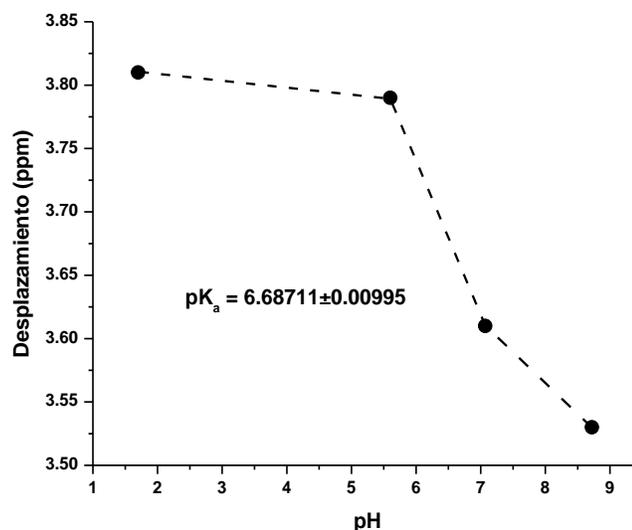


Figura 38. Cálculo de pK_a de Bis-Tris por RMN.

En la figura 39-A se encuentran el espectro de RMN 1H de Bis-Tris a pH 7 (espectro 1) comparado con espectros PRESAT al mismo pH para diferentes relaciones metal: ligante (M=Nd); 8:4, 20: 2.8 y 4:2 mM (espectros 2-4). Se realizaron simulaciones de distribución de especies en el programa HySS para poder conocer las especies presentes en equilibrio a ese pH manteniendo las concentraciones que se ocuparon en el estudio de RMN, para así poder asignar señales. Los resultados mostraron que para el sistema donde Nd^{3+} es el doble de Bis-Tris 8:4 (espectro 2), las especies en equilibrio son $Nd(BT)$, $Nd(BT)_2$ y $Nd(BT)(OH)$; están presentes con relación al metal en 50, 40 y 10% aproximadamente, mientras que el sistema con 7 veces más metal que ligante (20:2.8 mM- espectro 3) tiene las mismas especies pero están presentes en un 75% para $Nd(BT)$ y en un 10% para $Nd(BT)_2$ y $Nd(BT)(OH)$ aproximadamente. El espectro 4 con relación 2:4; el doble de ligante que de metal presenta $Nd(BT)$, $Nd(BT)_2$ y BT con 10, 80,10 en % con relación al metal (columna derecha de los espectros). El Nd^{3+} afecta desplazamientos por su campo magnético de manera dependiente tanto de la distancia entre protón y catión como del ángulo entre momento magnético del catión y protón. El espectro 3 contiene la fracción más alta del complejo 1:1 y en este caso se observan solo desplazamientos a campo alto. El espectro 2 tiene una mayor fracción del complejo ML_2 y en el espectro 4 este complejo es predominante. Como podemos ver en estos casos aparece y crece la intensidad de señales desplazados al campo alto los cuales lógicamente podemos atribuir al segundo ligante coordinado. Esta observación indica que en contraste con la estructura simétrica cristalina (Figura 17), en disolución los ligantes no son equivalentes.

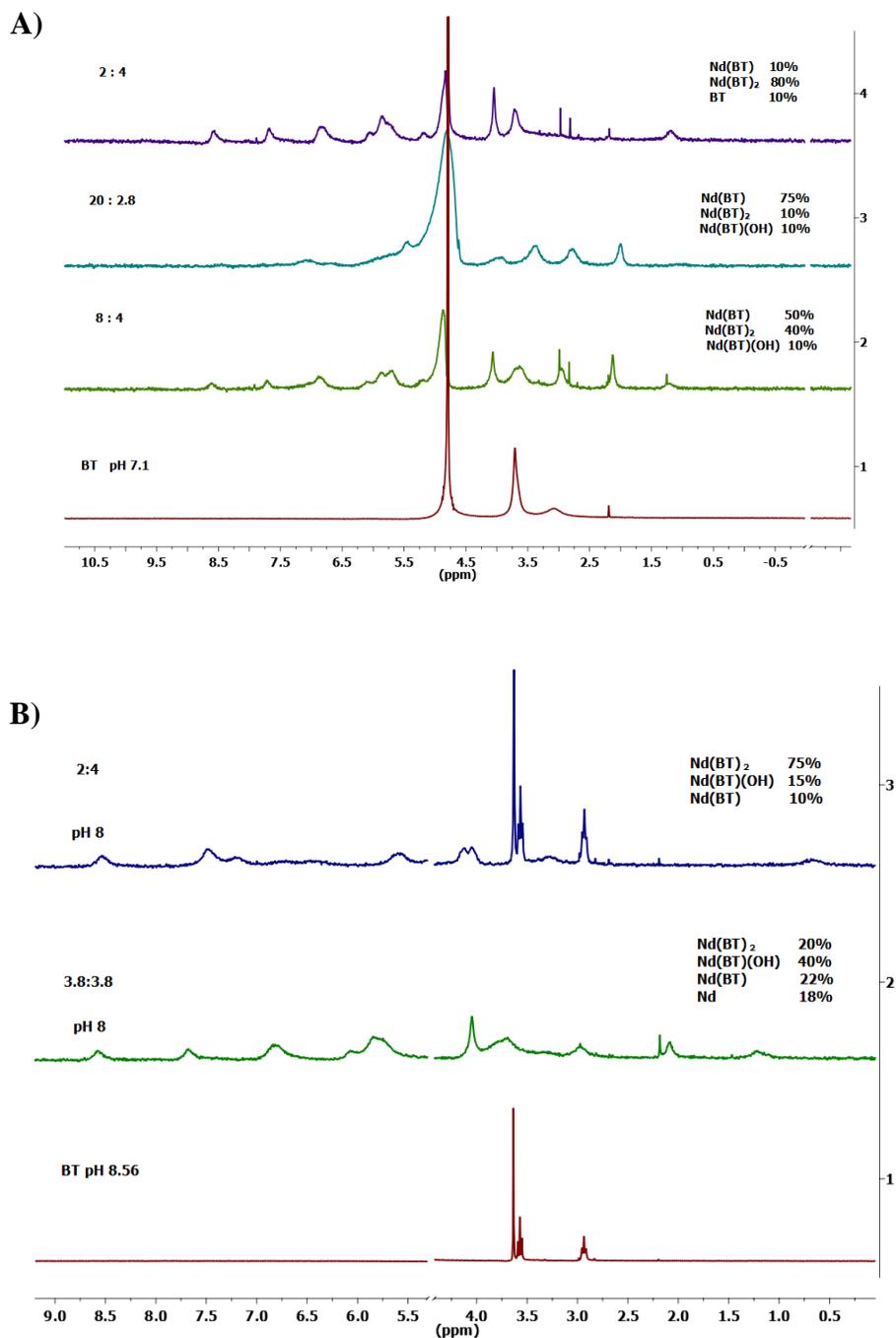


Figura 39. Espectro de RMN ^1H y PRESAT de Bis-Tris en presencia de Nd^{3+} a diferentes concentraciones y pH de **A)** 7 y **B)** 8, en D_2O . La columna de la izquierda y derecha se muestran las concentraciones de Nd: BT (mM) ocupados y las especies que están en el equilibrio, así como el porcentaje en la disolución calculadas en Hyss (con respecto al ligante), respectivamente. *En **B)** la zona del agua fue recortada para fines prácticos.

Teniendo ya los espectros a pH 7 de diferentes relaciones M:L se prosiguió a verificar su existencia cualitativa a pH 8, en la figura 39-B se muestran tres espectros, el primero de Bis-Tris a pH 8.56, el segundo con relación equimolar de M:L 3.8 mM a pH 8 y el tercero con el doble de exceso de Bis-Tris; la especie predominante en el sistema equimolar calculada en Hyss es $\text{Nd}(\text{BT})(\text{OH})$ presente en un 40%, mientras que para el sistema con el doble de ligante fue la especie $\text{Nd}(\text{BT})_2$ con un 75%, presentando también 18% del hidroxocomplejo $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})$ (véase todas las especies en la columna derecha de la figura 39-B). Sin embargo, debido al uso de concentraciones más altas que en experimentos cinéticos, el sistema presenta poca estabilidad y no permite aun un análisis cualitativo.

5.4 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris

Debido a los resultados anteriores se prosiguió a analizar a fondo el sistema de Bis-Tris con diferentes iones lantánidos(III) en el intervalo de pH de 7.5 a 10 con HPNPP y BNPP (Figura 40-A y 40-B, respectivamente), con relación M:L igual a 1:1; esta relación se determinó por una previa simulación de especies, donde se mostró que se puede emplear sin tener problemas de precipitación. Los perfiles cinéticos muestran la misma tendencia para todos los metales y con ambos sustratos; al aumentar el pH incrementa el valor de k_{obs} . Esto puede ser debido a que a mayor pH mayor desprotonación de ligantes acuo del centro metálico, para así formar hidroxocomplejos con mayor número de grupos hidroxilo los cuales funcionan como nucleófilos en la ruptura del enlace fosfodiéster.

Para corroborar que efectivamente las reacciones con los complejos eran de primer orden se realizaron pruebas cinéticas a pH fijo, manteniendo la concentración del metal igual a la del ligante ($[\text{M}]=[\text{L}]$) pero variando la concentración total en dicha relación (ejemplo: M:L 0.5:0.5, 1:1, 2:2, 3:3, 4:4) para cada uno de los metales lantánidos con el sustrato HPNPP y BNPP (Figura A3 y A4 en anexos, respectivamente). Un ejemplo de este estudio se muestra en la figura 41, en la hidrólisis de HPNPP en presencia de Bis-Tris y La^{3+} , dónde se graficó el log de k_{obs} vs log $[\text{M}]$, de la pendiente se obtuvo el valor de 1.08 ± 0.14 , la cual nos dice que la constante es de primer orden con respecto al metal.

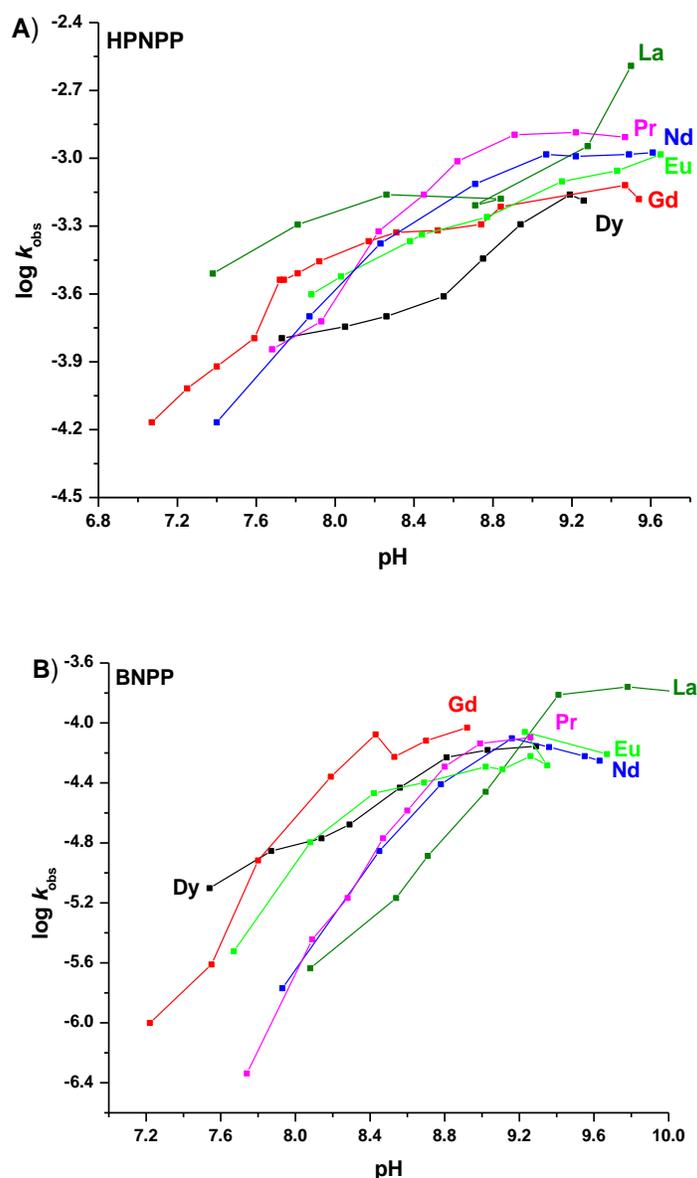


Figura 40. Constantes de velocidad observada vs pH de **A)** HPNPP y **B)** BNPP para diferentes iones lantánidos(III) en presencia de Bis-Tris como ligante con relación M:L igual a 1:1 (datos cinéticos de la tabla A1 en anexos).

Con el sustrato HPNPP, se encontró que el orden cinético con respecto al metal fue de 1.08 ± 0.14 , 1.12 ± 0.054 , 0.90 ± 0.04 , 1.02 ± 0.1 , 1.04 ± 0.04 y 1.4 ± 0.1 para La, Pr, Nd, Eu, Gd y Dy, respectivamente, mientras que con el sustrato BNPP el orden cinético con respecto al metal fue de 0.66 ± 0.04 , 1.04 ± 0.13 , 0.71 ± 0.1 , 0.822 ± 0.224 , 0.75 ± 0.08 y 0.936 ± 0.07 para La, Pr, Nd, Eu, Gd y Dy, respectivamente.

Este resultado con ambos sustratos (HPNPP y BNPP) concuerda con la observación de que las especies de Bis-Tris con los diferentes iones lantánidos(III) son mononucleares; como se deduce a partir de los datos obtenidos por potenciometría.

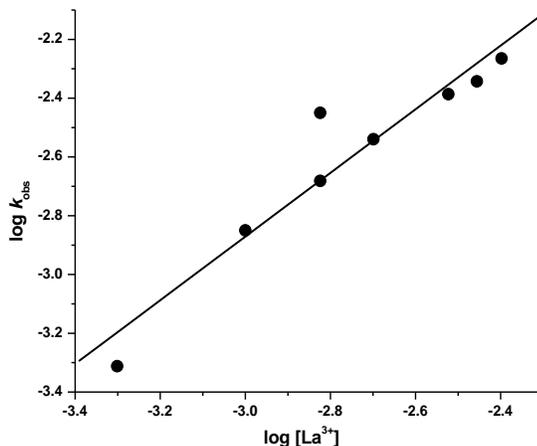


Figura 41. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs el logaritmo de la concentración de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en relación 1:1 con Bis-Tris en agua y a 25°C.

5.4.1 Análisis de la hidrólisis de HPNPP por hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris

En la hidrólisis de HPNPP a pH arriba de 9, se observa que para la serie de lantánidos la reactividad disminuye conforme aumenta el número atómico, es decir, la constante de velocidad observada sigue el siguiente orden: $\text{La} > \text{Pr} > \text{Nd} > \text{Eu} > \text{Gd} > \text{Dy}$ (ver Figura 40-A). Se observa que la constante de velocidad observada para el sistema con La^{3+} es 3.8 veces mayor que la de Dy^{3+} y 2.5 mayor que la de Eu^{3+} . Los perfiles de velocidad vs pH son complicados y el orden de reactividad a otros pH es diferente. Esto refleja las diferencias en la distribución de especies activas para cada catión de lantánido.

Haciendo el análisis de las especies activas en la hidrólisis de HPNPP, se graficaron las constantes observadas vs el diagrama de distribución de especies para cada metal estudiado (Figura 42). La figura 42 también muestra las ecuaciones de ajustes obtenidos por aplicación de correlación multiparamétrica en términos de la ecuación (6) a los datos experimentales. Las constantes de velocidad para especies individuales además están resumidas en la tabla 6.

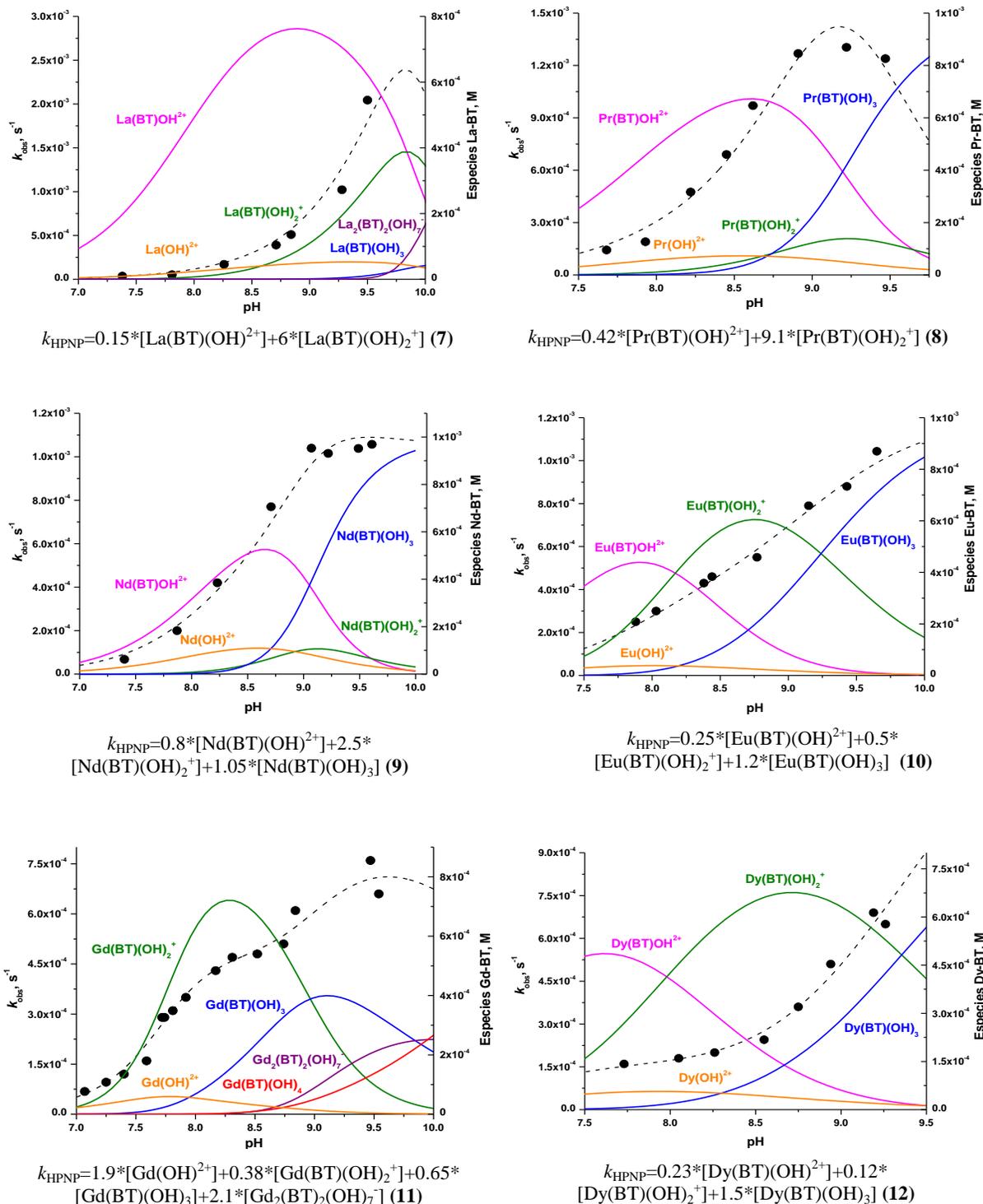


Figura 42. Diagrama de distribución de especies traslapada con los valores de k_{obs} y k_{cal} de Bis-Tris 1 mM, en presencia de diferentes iones lantánidos(III) 1 mM, NaCl 47.5 mM y HPNP 2.5×10^{-5} M. Las líneas continuas representan la distribución de especies en las condiciones en que la cinética se realizó. Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} y la línea punteada a los valores de k_{cal} , calculadas a partir de ecuaciones particulares para cada metal (Ecuaciones 7-12).

Las especies varían dependiendo el centro metálico; para La^{3+} y Pr^{3+} las especies activas son $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})^{2+}$ y $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_2^+$ con constantes de segundo orden de 0.15 y 6 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para La^{3+} y de 0.42 y 9.1 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Pr^{3+} , respectivamente (Ecuación 7 y 8). Para Nd^{3+} y Eu^{3+} las especies activas son $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})^{2+}$, $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_2^+$ y $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_3$ con constantes de segundo orden de 0.8, 2.5 y 1.05 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Nd y 0.25, 0.5 y 1.2 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Eu^{3+} , respectivamente (Ecuación 9 y 10). El perfil ondulatorio de las k_{obs} en Gd^{3+} (Figura 42-Gd) se debe a que son varias especies las que contribuyen en la hidrólisis, incluyendo al acuo- ion, dos hidroxocomplejos mononucleares y una binuclear ; $\text{Gd}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Gd}(\text{BT})(\text{OH})_2^+$, $\text{Gd}(\text{BT})(\text{OH})_3$ y $\text{Gd}_2(\text{BT})_2(\text{OH})_7$, con constantes de segundo orden calculadas de 1.9, 0.38, 0.65 y 2.1 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (Ecuación 11). Finalmente, el análisis de distribución de especies y k_{obs} para Dy^{3+} mostró que los hidroxocomplejos activos eran tres, que al igual que para Nd^{3+} y Eu^{3+} son $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})^{2+}$, $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_2^+$ y $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_3$ con constantes de segundo orden de 0.23, 0.12 y 1.5 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (Ecuación 12).

Tabla 6. Constantes de segundo orden para especies individuales.

	HPNPP					BNPP		
	MH ₁	MLH ₁	MLH ₂	MLH ₃	M ₂ L ₂ H ₇	MLH ₁	MLH ₂	MLH ₃
La		0.15	6.0				0.25	2.5
Pr		0.42	9.1				0.22	0.20
Nd		0.80	2.5	1.05			0.45	0.05
Eu		0.25	0.50	1.2			0.048	0.067
Gd	1.9		0.38	0.65	2.1		0.015	0.22
Dy		0.23	0.12	1.5			0.032	0.14

Tomando como comparación la especie activa que es común para la serie de lantánidos(III), $\text{M}(\text{BT})(\text{OH})_2^+$, observamos que la constante de segundo orden para La^{3+} es 50 veces mayor que para Dy^{3+} y 12 veces mayor que para Eu^{3+} .

Con la ayuda de la tabla 2 en los antecedentes podemos comparar la reactividad de La^{3+} $k_{\text{obs}}=2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, nuestro sistema más reactivo, con otros modelos de complejos, podemos ver que es un poco menos reactivo que $(\text{Zn}^{2+})_3\text{-L}$; ligante trinucleante con puente calixareno a 25°C, pH 7 y en medio 35% EtOH/H₂O con $k_{\text{cat}}= 2.4 \times 10^{-3} \text{ [73]}$, un poco más reactivo que el complejo de

(Zn²⁺)₂-L, con ligante binucleante con dos puentes 2-propanol a 25°C y pH 7.98 en medio 65% EtOH/H₂O con $k_{cat} = 1.52 \times 10^{-3}$ [72], y 3 veces mejor que el complejo binuclear con puente fenol (Zn²⁺)₂-L a 25°C, pH no ajustado en medio H₂O/DMSO (70:30) con $k_{cat} = 6.4 \times 10^{-4}$ [74].

5.4.2. Análisis de la hidrólisis de BNPP por hidroxocomplejos de iones lantánidos(III) y Bis-Tris

En la hidrólisis de BNPP a pH alrededor de 9 se observa que para la serie de lantánidos la reactividad es distinta que con HPNPP; para BNPP la constante de velocidad observada sigue la siguiente tendencia La > Pr > Nd > Eu < Gd > Dy. La constante de velocidad observada para el sistema con La³⁺ es 2.8, 2.5 y 1.9 veces mayor que la de Eu³⁺, Dy³⁺ y Gd³⁺, respectivamente.

En el análisis de las especies activas en la hidrólisis de BNPP para cada metal estudiado (Figura 43) a diferencia de obtener diferentes especies según el lantánido como se vio para HPNPP, se observó que sólo dos especies son activas en la hidrólisis de BNPP para toda la serie de iones metálicos: M(BT)(OH)₂⁺ y M(BT)(OH)₃, con constantes de segundo orden de 0.25 y 2.5 para La³⁺; de 0.22 y 0.20 para Pr³⁺; 0.40 y 0.50 para Nd³⁺; de 0.47 y 0.068 para el ion Eu³⁺; 0.013 y 0.23 para Gd³⁺; y 0.32 y 0.14 para el ion Dy³⁺, respectivamente. De esta información se obtiene que la especie más activa es M(BT)(OH)₃ en la hidrólisis del fosfodiéster análogos al ADN; la constante de segundo orden calculada para el complejo con La³⁺ como centro metálico es 37, 18 y 11 veces mayor que el complejo con Eu³⁺, Dy³⁺ y Gd³⁺. El complejo con Gd³⁺ es 3.4 y alrededor de 2 veces mayor que el complejo de Eu³⁺ y Dy³⁺, respectivamente.

Para comparar la reactividad de este complejo frente a otros ya reportados, tenemos el sistema con BTP 20 mM y La³⁺ 2 mM, a 25°C y pH 9.3 con $k_{obs} = 4.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [3a], el cual es 2.6 veces mejor que el sistema con Bis-Tris 1 mM y La³⁺ 1mM a 25°C y pH 9.78 con $k_{obs} = 1.74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Así mismo podemos recalcar que la constante de velocidad observada en el sistema del acuo-ion de La³⁺ 2mM a pH 7 y 50 °C es de $5.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ [57b], esto nos dice que el complejo con Bis-Tris y La³⁺ es 31 veces mejor que el complejo sin ligante. Adicionalmente, el sistema (Zn²⁺)₂-L con ligante binucleante a 35°C y pH 9 con 2 mM de Metal tiene una $k_{obs} = 2.3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ [78], lo que nos dice que nuevamente nuestro sistema con La³⁺ es mejor; con una $k_{obs} = 1.74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ es 757 veces mayor que la del complejo con el centro metálico del bloque d.

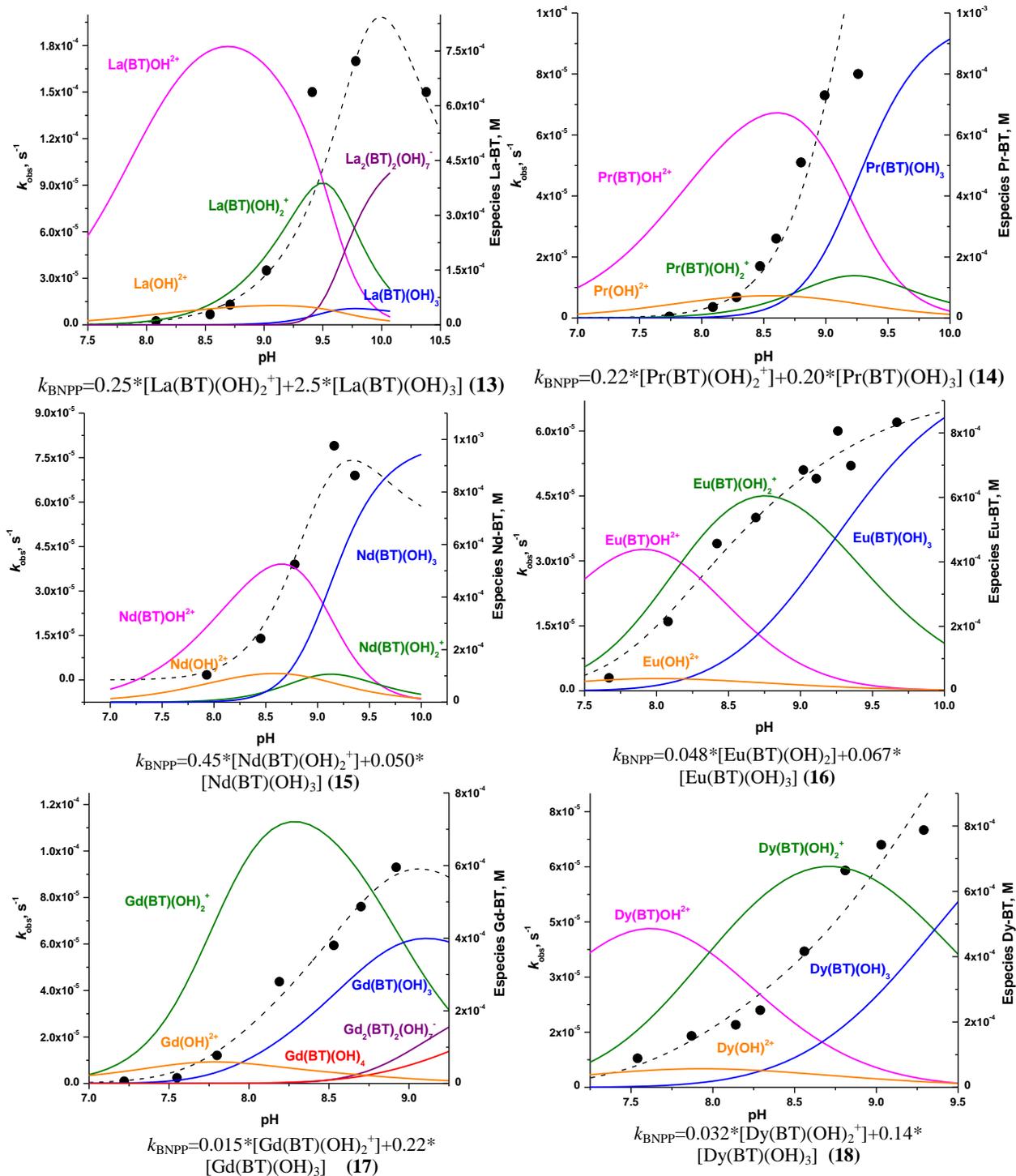


Figura 43. Diagrama de distribución de especies traslapada con los valores de k_{obs} y k_{cal} de Bis-Tris 1 mM, en presencia de diferentes iones lantánidos(III) 1 mM, NaCl 47.5 mM y BNPP 5×10^{-5} M. Las líneas continuas representan la distribución de especies en las condiciones en que la cinética se realizó. Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} y la línea punteada a los valores de k_{cal} , calculadas a partir de ecuaciones particulares para cada metal (Ecuaciones 13-18).

5.4.3 Comparación entre los sustrato HPNPP y BNPP en el sistema Bis-Tris en presencia de metales lantánidos(III)

La hidrólisis de HPNPP y BNPP con diferentes centros metálicos mostró las siguientes tendencias La>Pr>Nd>Eu> Gd> Dy y La>Pr>Nd>Eu<Gd>Dy, respectivamente. Esta tendencia se observa en las constantes de velocidad observadas a pH 9 y en las constantes de segundo orden (que no dependen de pH) para especies ML(OH)₂. Para dar una explicación a la tendencia de hidrólisis de HPNPP y BNPP, la acidez de los centros metálicos juega un papel importante, al ser más ácido el metal, éste atrae la densidad electrónica del oxígeno del grupo hidroxilo dejando a este menos nucleofílico para el posterior ataque al enlace fosfodiéster ^[3a]; esto explica la tendencia de BNPP la cual coincide con el pK_a del metal el cual es La>Pr>Nd>Eu<Gd>Dy. En la hidrólisis de HPNPP el Gd³⁺ tiene menor reactividad que el Eu³⁺, siendo Gd³⁺ el menos ácido de los dos; se esperaría que quitara menos densidad electrónica al oxígeno y que fuera más reactivo, sin embargo, analizando la contribución de la especie más activa (no se toma en cuenta la especie binuclear de Gd³⁺ debido a que se confirmó que a pH 9 la especie activa era mononuclear (Figura A3 en anexos)) M(BT)(OH)₃, la cual tiene más grupos nucleófilos, podemos observar que es menor para Gd³⁺ que para Eu³⁺ lo que explica dicha tendencia.

Para poder seguir analizando los dos sustratos, HPNPP y BNPP se construyó la tabla 7, donde se calculó el efecto catalítico para cada metal y ambos sustratos a pH 9, se analiza que el efecto catalítico con 1mM del complejo lantánido-BT fue por arriba de 10³ para HPNPP y de 10⁶ para BNPP a pH 9, es decir, para todos los metales lantánidos la eficiencia catalítica comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea es 1000 veces mayor para BNPP que para HPNPP.

Se mostró que para ambos sustratos las especies cinéticamente activas son hidroxocomplejos metálicos del tipo ML(OH)_n, con n=1, 2 y/o 3 y n=1 y 2 para HPNPP y BNPP, respectivamente. Por lo general, las constantes de velocidad para especies trihidroxo se comportan de manera poco regular, lo que puede atribuirse a una estabilidad menor de los complejos a altos valores de pH. La misma existencia de estos complejos que corresponden a un hidróxido metálico neutro es sorprendente, y en realidad estos complejos pueden tener un ligante desprotonado en lugar de un tercer anión hidroxilo. Por esta razón a continuación se consideran solamente resultados para mono- y dihidroxocomplejos.

Tabla 7. Efecto catalítico de los complejos de Bis-Tris y diferentes iones lantánidos para HPNPP y BNPP.

Efecto catalítico		
pH =9	HPNPP	BNPP
La	815	3.33×10^5
Pr	1370	7.87×10^5
Nd	948	5.99×10^5
Eu	715	4.98×10^5
Gd	618	9.57×10^5
Dy	337	6.18×10^5

Las tendencias en reactividad catalítica de complejos de lantánidos con Bis-Tris pueden resumirse de la siguiente manera.

1. Las especies monohidroxo $ML(OH)$ son reactivas solo con HPNPP y la reactividad varia poco con constantes de velocidad para los extremos de la serie La^{3+} y Dy^{3+} muy cercanas.
2. Las especies dihidroxo $ML(OH)_2$ son reactivas tanto con HPNPP como con BNPP con tendencia de reactividad mayor para metales con números atómicos más bajos.
3. Las constantes catalíticas para especies $ML(OH)_2$ con HPNPP son en promedio solo un orden de magnitud mayores que con BNPP a pesar de que la velocidad de hidrólisis alcalina de HPNPP es 10^4 veces mayor que la de BNPP.

La interpretación de estas observaciones es importante porque está relacionada con detalles de mecanismos de catálisis, la comprensión de los cuales es indispensable para el desarrollo de nucleasas químicas. En primer lugar, observamos importantes diferencias entre el comportamiento de HPNPP y BNPP (modelos de ARN y ADN, respectivamente). El mecanismo intrínseco de la ruptura de estos sustratos es diferente: en el caso de HPNPP, la etapa limitante es la transesterificación que ocurre después de la desprotonación rápida y reversible del grupo OH del sustrato, generando un alcoxo anión como un nucleófilo interno (Figura 44-A), pero en el caso de BNPP el hidroxio anión es el nucleófilo que directamente ataca el grupo fosforil del sustrato (Figura 44-B).

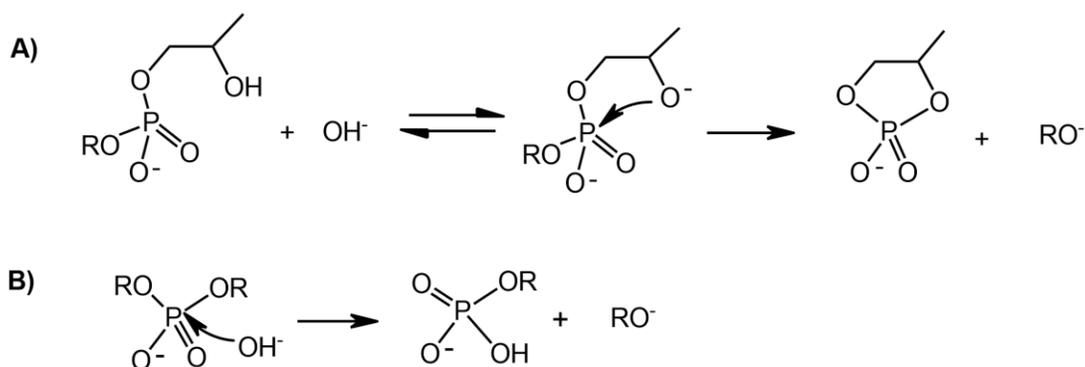


Figura 44. Esquema del mecanismo de ruptura de **A)** HPNPP y **B)** BNPP.

En acuerdo con esto, el papel del catión metálico es diferente. Usualmente consideran que en el caso de HPNPP el catión estabiliza el estado de transición que tiene estructura de un fosforano dianiónico, mediante la coordinación con átomos de oxígeno del grupo fosforil ^[87] (Figura 45-A). En el caso de BNPP el mecanismo usual es el ataque nucleofílico del fosfato por parte de hidróxido coordinado (Figura 45-B).

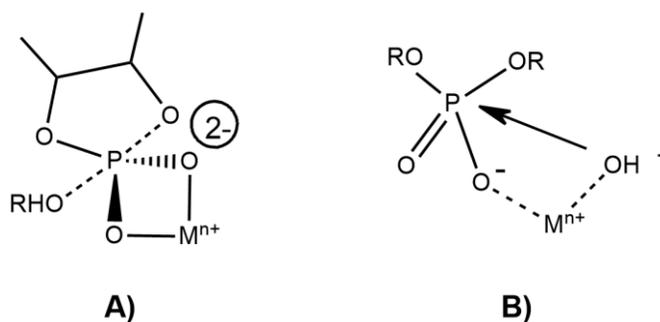
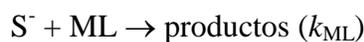
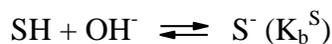


Figura 45. Papel del catión metálico en **A)** HPNPP y **B)** BNPP.

La diferencia importante es que en el caso A el nucleófilo no está coordinado al metal, pero en el caso B sí. Esta coordinación puede bajar notablemente la reactividad nucleofílica del hidróxido y entonces solo el segundo anión hidroxilo con mayor basicidad puede ser suficientemente reactivo. En acuerdo con este punto de vista, la reactividad disminuye para lantánidos más pesados con mayor densidad de la carga positiva.

Otro aspecto importante es que a pesar de que en el mecanismo A participa el ion metálico sin OH^- coordinado, mientras que en B participa un hidroxocomplejo, cinéticamente ambos casos corresponden a la misma “especie activa” que es el complejo $\text{ML}(\text{OH})$. El esquema cinético formal para la ruptura catalítica de HPNPP a través del mecanismo A tiene la siguiente forma (donde SH es HPNPP neutro y S^- su forma desprotonada, ver figura 44-A):



En acuerdo con este esquema la ley de velocidad es

$$v = k_{\text{ML}}[\text{ML}][\text{S}^-] = k_{\text{ML}}[\text{ML}]\text{K}_b^{\text{S}}[\text{SH}][\text{OH}^-]$$

pero ML y OH⁻ están en equilibrio de formación del hidroxocomplejo:



y por esto el producto de concentraciones de ML y OH⁻ es indistinguible con una especie ML(OH), es decir

$$v = k_{\text{ML}}(\text{K}_b^{\text{S}}/\text{K}_b^{\text{ML}})[\text{ML}(\text{OH})][\text{SH}] = k_{\text{ML}(\text{OH})}[\text{ML}(\text{OH})][\text{SH}]$$

y entonces

$$k_{\text{ML}(\text{OH})} = k_{\text{ML}}(\text{K}_b^{\text{S}}/\text{K}_b^{\text{ML}}) \quad (19)$$

De esta manera vemos que la contribución de la ruta catalítica con participación de ML(OH) en la ruptura de HPNPP está en acuerdo con un mecanismo generalmente aceptado para este sustrato. La dependencia débil de $k_{\text{ML}(\text{OH})}$ del tipo de catión probablemente es el resultado de la compensación entre los cambios en k_{ML} y K_b^{ML} , cada una de las cuales debe crecer para lantánidos más pesados. Por otro lado, la ruta catalítica con participación de ML(OH)₂ en la ruptura de HPNPP no tiene una interpretación clara. Esta ruta no se observa para complejos de lantánidos con ligantes macrocíclicos como catalizadores ^[88] y el segundo anión OH⁻ no puede participar como un nucleófilo en el mecanismo A. Probablemente el efecto de coordinación del segundo OH⁻ propicia una distorsión de la esfera de coordinación del lantánido que optimiza su interacción con el grupo fosforilo en el estado de transición de la reacción.

La mayor eficiencia de catálisis en la ruptura de BNPP comparando con HPNPP es un fenómeno característico para lantánidos reportado también en trabajos anteriores ^[48]. Hay pocos datos que permiten comparar la actividad de complejos de otros metales respecto de estos dos sustratos, pero al menos para una serie de complejos de Zn²⁺ fue observado casi el mismo efecto de aceleración en la hidrólisis de HPNPP y BNPP ^[89]. También se observó la misma eficiencia de catálisis con cationes de metales alcalinoterreos ^[87]. Con los resultados de esta tesis podemos concluir que la preferencia de lantánidos a un análogo de ADN es un fenómeno general que aparentemente está relacionado con peculiaridades de química de coordinación, y se necesitan estudios adicionales para una mayor comprensión.

5.5 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) derivados de Ciclodextrinas

Se realizaron pruebas cinéticas para probar la reactividad del centro metálico Eu^{3+} en presencia de las ciclodextrinas en la hidrólisis de HPNPP. Las ciclodextrinas (CD) estudiadas fueron α , β , γ y 2hidroxipropil- β ciclodextrina (hpCD). El estudio se realizó en presencia del amortiguador TRIS 50 mM al ver que éste interfiere en menor medida en la reactividad (estudios previos reportados). La concentración de las CDs y Eu^{3+} fue de 1mM, ajustándose todas las celdas a pH 8. En la figura 46 se tiene la gráfica de la absorbancia vs el tiempo de las diferentes ciclodextrinas con Eu^{3+} y las constantes de velocidad observadas en la hidrólisis de HPNPP; se puede observar que el sistema más reactivo se obtiene utilizando β -CD como ligante, seguido por hpCD, α y γ CD con k_{obs} de 2.14×10^{-3} , 1.7×10^{-3} , 1.08×10^{-3} y $9.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Debido a estos resultados se prosiguió a realizar pruebas cinéticas utilizando β -CD y diferentes metales lantánidos(III) estudiando HPNPP y BNPP como sustratos modelos de ARN y ADN, respectivamente.

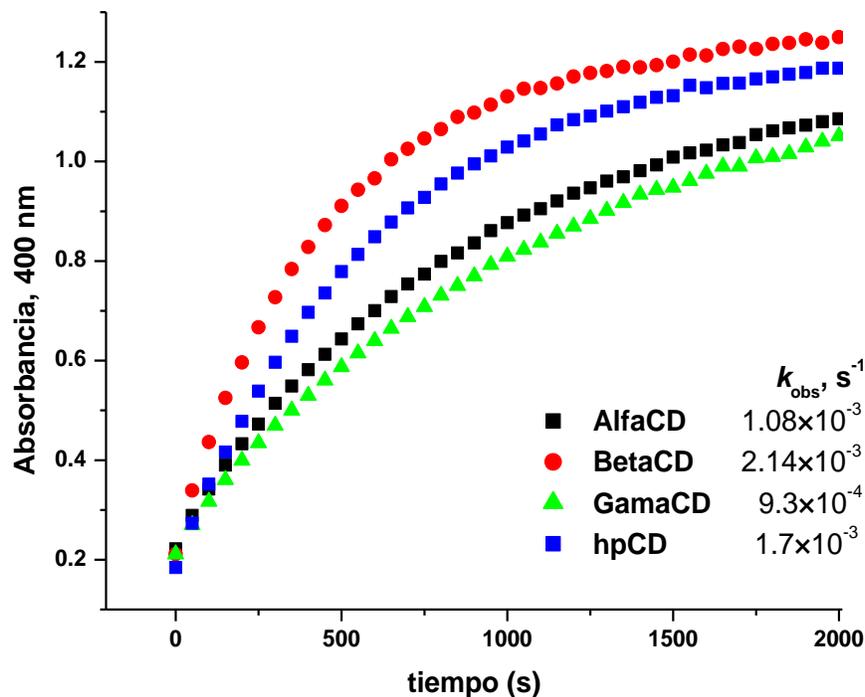


Figura 46. Gráfica de absorbancia a 400 nm vs tiempo de la hidrólisis de HPNPP utilizando diferentes ciclodextrinas 1 mM y Eu^{3+} 1 mM como centro metálico en amortiguador TRIS 50 mM a pH 8 y sus constantes de velocidad observadas.

Para poder escoger la relación M:L a estudiar con relación 1:1 se prosiguió a realizar una prueba a pH fijo de 8, manteniendo la concentración del metal igual a la del ligante ($[M]=[L]$) pero variando la concentración total, utilizando Eu^{3+} como centro metálico. La figura 47-A y B muestra las gráficas de k_{obs} vs $\log [\text{Eu}^{3+}]$ con los sustratos análogos de ARN y ADN, respectivamente; ambas muestran dos pendientes, para HPNPP se tienen pendientes de 1.95 ± 0.05 y 0.88 ± 0.07 , las concentraciones utilizadas correspondientes a la primera pendiente son valores de 0.5 a 1.25 mM, mientras que la pendiente de 0.88 se obtuvo con concentraciones de 1.5 a 2.5 mM; para BNPP se observa una pendiente de 2.18 ± 0.17 con concentración de metal de 0.5 a 1 mM y una pendiente de 1.17 ± 0.05 utilizando concentraciones de 1.25 a 2.5 mM de metal y ligante. Esto quiere decir que dependiendo de la concentración total de metal y ligante se favorece la formación de complejos binucleares o mononucleares; de tal manera que los últimos son predominantes a bajas concentraciones y no tienen actividad catalítica. Para hacer el estudio de la k_{obs} con respecto a la variación de pH se propuso trabajar con concentración total de 2 mM de ligante y de metal ya que para ambos sustratos se observó que a esta concentración se tenía orden uno con respecto al metal y ligante.

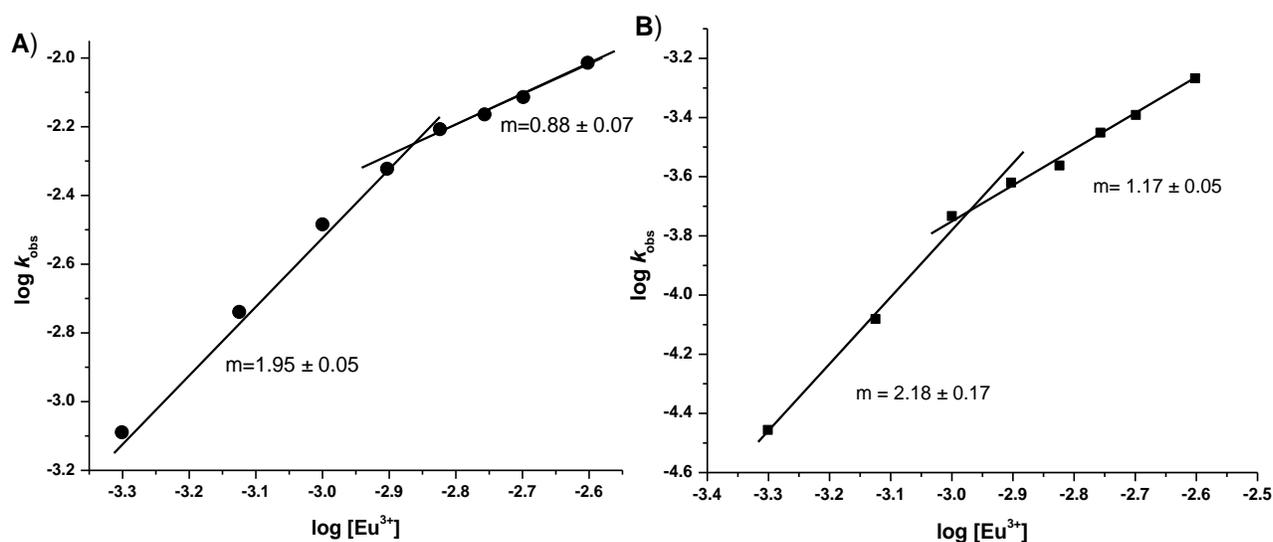


Figura 47. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de A) HPNPP y B) BNPP vs el logaritmo de la concentración de $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ en relación 1:1 con β -CD en agua, a pH 8.0 y 25°C .

5.5.1 Hidrólisis de HPNPP y BNPP por hidroxocomplejos de lantánidos(III) y β -Ciclodextrina

En la figura 48-A y B se graficaron los perfiles de pH de las constantes observadas para los diferentes metales lantánidos en la presencia de β -CD 2:2 (mM) con HPNPP y BNPP. Para ambos sustratos y para los diferentes lantánidos los perfiles muestran que a medida en que aumenta el pH incrementa la k_{obs} . Con HPNPP y BNPP a pH 8, se observa que la reactividad aumenta conforme incrementa el número atómico del metal estudiado; es decir, la constante de velocidad observada sigue el siguiente orden: La < Pr < Nd < Eu < Gd > Dy. Para HPNPP se observa que la constante de velocidad observada para el sistema con Dy³⁺ es 1.94 veces mayor que la de Eu³⁺ y 27 veces mayor que la de La³⁺, mientras que en la hidrólisis de BNPP la constante de velocidad observada para el sistema con Gd³⁺ es 1.43, 1.77 y 74.6 veces mayor que la de Dy³⁺, Eu³⁺ y La³⁺, respectivamente.

Una posible explicación de esta tendencia es que a medida en la que aumenta el número atómico, el centro metálico se vuelve más ácido, más pequeño y más oxofílico; por lo que más grupos OH estarían coordinados al centro metálico y estos podrían generar el ataque nucleofílico y así romper el enlace fosfodiéster (recordemos la tendencia del pK_a del metal el cual es La > Pr > Nd > Eu < Gd > Dy).

También podemos observar que los perfiles cinéticos con los diferentes iones lantánidos siguen la misma tendencia (perfiles paralelos), esto sugiere que los hidroxocomplejos presentes en disolución en esta serie de iones metálicos son los mismos.

Con el fin de poder conocer cuáles eran las especies en los sistemas M³⁺- β -CD, se prosiguió a caracterizar el sistema Eu³⁺- β -CD. Se realizaron titulaciones potenciométricas a partir de las cuales se estableció el diagrama de distribución de especies correspondiente en el intervalo de pH de 7 a 9 y los resultados se traslaparon con las constantes de velocidad observadas con el sustrato HPNPP y BNPP. En la figura 49 podemos observar que k_{obs} con HPNPP sólo depende de una especie; la especie activa es el polihidroxocomplejo binuclear Eu₂CD₂(OH)₆; por medio del método de regresiones múltiples pudimos obtener la constante de segundo orden $k_2 = 50.83 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Ecuación 20).

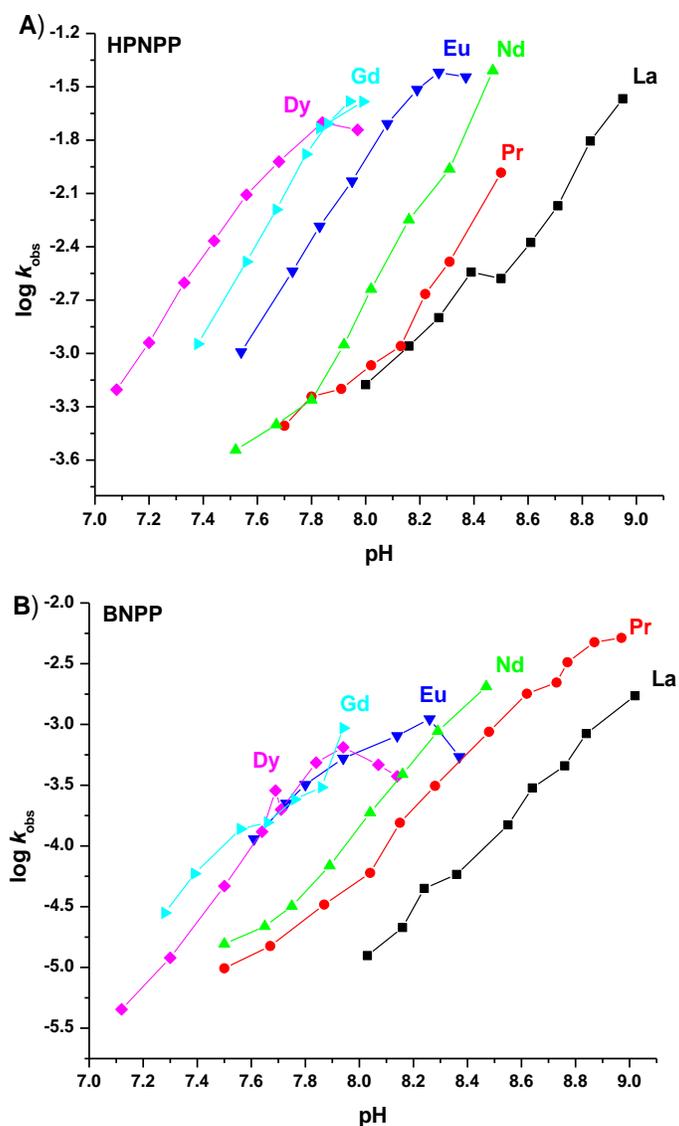


Figura 48. Constantes de velocidad observada vs pH de **A)** HPNPP y **B)** BNPP para diferentes iones lantánidos(III) en presencia de β -CD como ligante con relación M:L igual a 2:2, Tris 50 mM en agua y a 25°C (datos cinéticos de la tabla A2 en anexos).

Por otro lado, con BNPP podemos observar que las especies activas son los siguientes polihidroxocomplejos: $\text{EuCD}(\text{OH})$ y $\text{Eu}_2\text{CD}_2(\text{OH})_6$ con constantes de segundo orden de 0.64 y $1.57 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (Ecuación 21).

$$k_{\text{HPNPP}} = 50.83[\text{Eu}_2\text{CD}_2(\text{OH})_6] \quad (20)$$

$$k_{\text{BNPP}} = 0.64[\text{EuCD}(\text{OH})] + 1.57[\text{Eu}_2\text{CD}_2(\text{OH})_6] \quad (21)$$

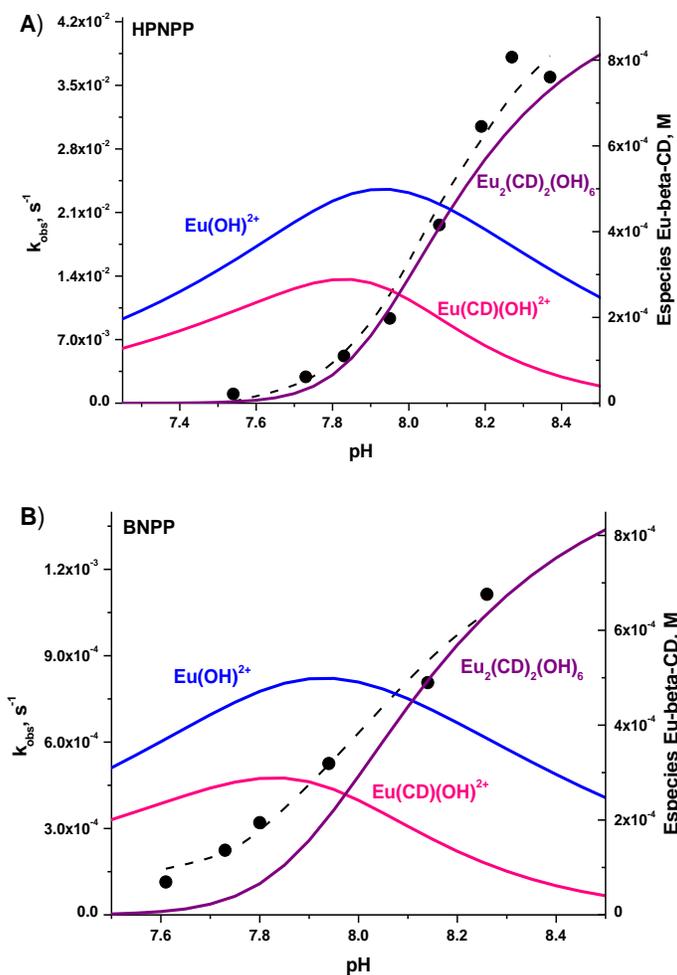


Figura 49. Diagrama de distribución de especies traslapada con los valores de k_{obs} y k_{cal} de β -CD 2 mM, Eu^{3+} 2 mM, TRIS 50 mM, en presencia de **A)** HPNPP y **B)** BNPP 5×10^{-5} M. Las líneas continuas representan la distribución de especies en las condiciones en que la cinética se realizó. Los puntos corresponden a los valores de k_{obs} y la línea punteada a los valores de k_{cal} calculada con las ecuaciones 21 y 22.

Estos resultados están en acuerdo con los perfiles de concentración (figura 46), comprobando una mayor actividad catalítica de complejos binucleares. La formación de polihidroxocomplejos binucleares del tipo $M_2CD_2(OH)_n$ puede ser una posible explicación de porque la actividad catalítica para CDs fue mejor que para los complejos con Bis-Tris o para aquellos con ligantes derivados del ácido picolínico; porque como vimos en los antecedentes, los complejos binucleares de lantánidos por lo general son más activos que los mononucleares ya que aumentan la estabilidad del intermediario y los grupos salientes.

Para poder seguir analizando los dos sustratos, HPNPP y BNPP se construyó la tabla 8, donde se calculó el efecto catalítico para cada metal y ambos sustratos a pH 8. Se analiza que para todos los metales lantánidos el efecto catalítico con 2 mM del complejo lantánido- β -CD fue por arriba de 10^5 para HPNPP y de 10^8 para BNPP; es decir, la eficiencia catalítica comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea es nuevamente 1000 veces mayor para BNPP que para HPNPP.

Tabla 8. Efecto catalítico de los complejos M^{3+} - β -CD con diferentes iones lantánidos con BNPP y HPNPP a pH 8.

Efecto catalítico		
pH =8	HPNPP	BNPP
La	6.67×10^3	1.25×10^6
Pr	8.57×10^3	6×10^6
Nd	2.3×10^4	1.88×10^7
Eu	9.33×10^4	5.26×10^7
Gd	2.61×10^5	9.32×10^7
Dy	1.81×10^5	6.48×10^7

Para poder saber que tan reactivo es el sistema con Pr^{3+} - β -CD (con el cual se obtuvieron los mejores valores de k_{obs} , ver tabla A2 en anexos) en presencia de HPNPP, lo comparamos con otros sistemas ya reportados con el mismo sustrato. El complejo binuclear $Zn_2(L_2O)$ [31] de Iranzo *et al.* ha presentado la mejor actividad catalítica hasta el momento, con una $k_c = 0.71 M^{-1} s^{-1}$ a pH 10.05 y 25°C; resultó ser menos activa que el sistema Pr^{3+} - β -CD 2: 2 (mM) con $k_{obs} = 0.0539 s^{-1}$ a 25°C y pH 8.9 ya que a esta misma concentración del catalizador tiene k_{obs} de solo $0.00142 s^{-1}$. Por otro lado, la k_{cat} con el sistema $(Cu^{2+})_3$ -L, con ligante trinucleante bpy, fue de $0.0143 s^{-1}$ en medio acuoso, 25°C y pH 7 [71], esto nos dice que el complejo Pr^{3+} - β -CD es 3.8 veces mejor que este sistema. Comparándolo con el sistema con $(Zn^{2+})_2$ -L con $k_{cat} = 1.52 \times 10^{-3} s^{-1}$, ligante binucleante con dos puentes 2 propanol [72], a 25°C, pH 7.98 y en 65%EtOH/H₂O, nuestro sistema Pr^{3+} - β -CD es 35.5 veces mejor que el reportado con Zn^{2+} .

Así mismo, utilizando BNPP como sustrato, tenemos que el mejor sistema catalítico fue con Pr^{3+} - β -CD, con una k_{obs} de $0.005 s^{-1}$ a pH 8.97, medio acuoso y 25°C. El sistema con el acuo-ion

Ce^{4+} [75] resulta ser sólo 5.2 veces mejor que nuestro sistema. El complejo La^{3+} - L con L=BTP [3a], ligante mononucleante a pH 9.3 y 25 °C tiene una k_{obs} de $4.5 \times 10^{-4} s^{-1}$, esto quiere decir que nuestro sistema es 11 veces mejor que este sistema. Para finalizar compararemos el complejo $(La^{3+})_2$ - L₂ [48] con una k_{obs} de $0.0015 s^{-1}$ utilizando 10 mM Buffer Tris-HCl a 25°C, pH 9.2 y 2 mM; el sistema Pr^{3+} - β -CD es alrededor de tres veces mejor que este complejo.

5.5.2 Espectros de RMN 1H de β -Ciclodextrina con metales lantánidos(III)

Para comprobar que hay interacción entre β -CD y el metal, se obtuvieron los espectros de RMN 1H de β -CD con y sin la presencia de Eu^{3+} y Nd^{3+} ; en la figura 50-A tenemos el espectro de β -CD 5 mM (espectro rojo) traslapado con el de Eu^{3+} - β -CD (4:5 mM) en presencia de buffer TRIS 10 mM para mantener el pH fijo de 8.4 (espectro azul). Podemos ver que dos señales correspondientes a los protones 3,4 y 5 de la estructura de glucopiranososa (estructura) se desplazan a frecuencias más altas, esto es debido a que el metal atrae densidad electrónica de β -CD lo cual hace un efecto de desprotección haciendo que se requiera de menor energía para excitar los spins magnéticos.

Por otro lado, en la figura 50-B tenemos el espectro de β -CD (espectro rojo) traslapado con Nd^{3+} - β -CD (6.8:5 mM) a pH de 8 ajustado con amortiguador TRIS 10 mM (espectro azul). Podemos observar que las señales 3,4, 5 de la estructura de glucopiranososa se desplazaron a frecuencias más altas y que la señal 2 se desplazó a frecuencias más bajas; este desplazamiento a frecuencias bajas se debe a que la excitación de spin requiere mayor energía porque el átomo se encuentra protegido (hay mayor densidad electrónica).

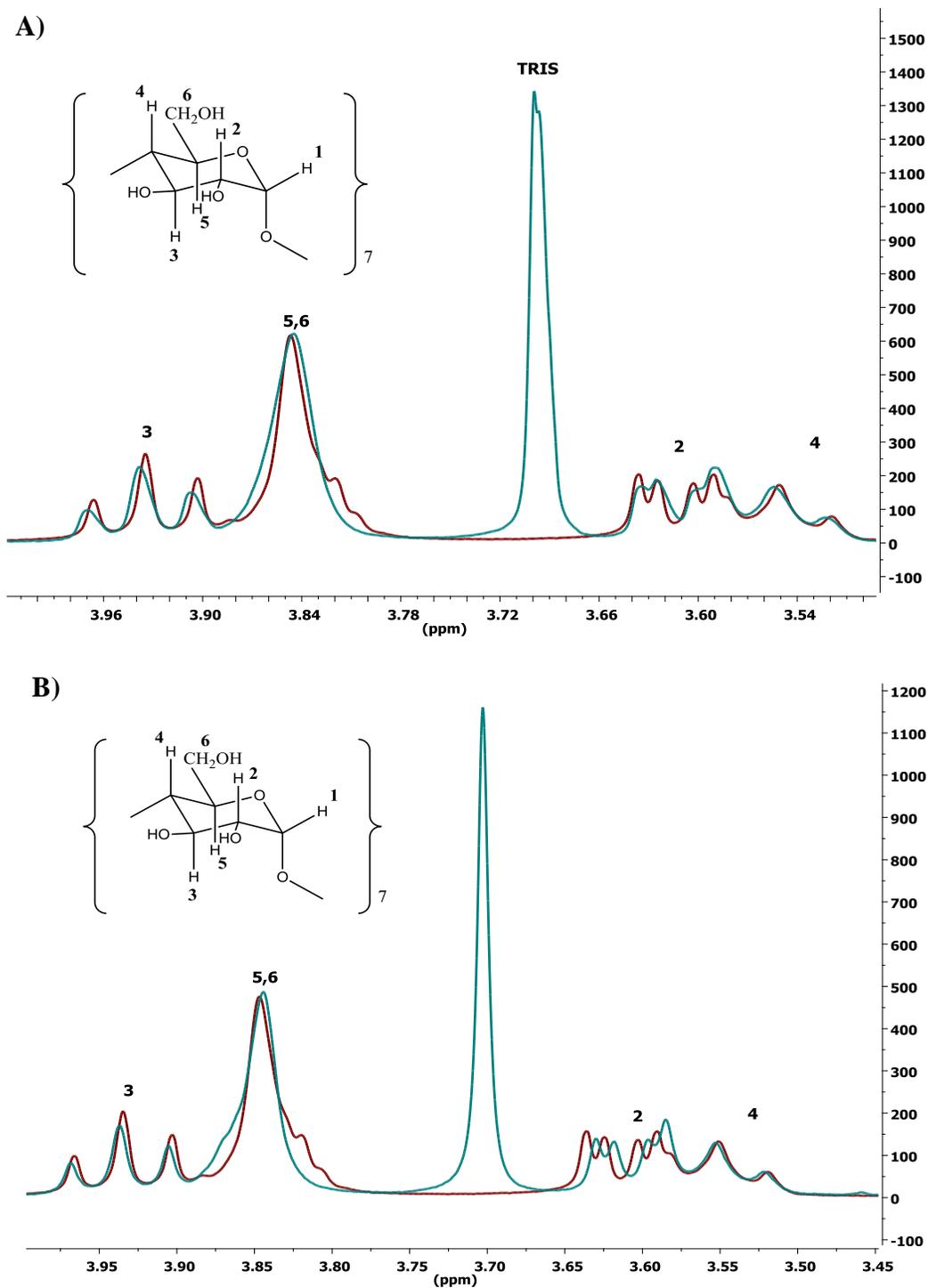


Figura 50. Espectro de RMN ^1H de **A)** β -CD (5 mM) (espectro rojo) traslapado con β -CD (5 mM), TRIS (10 mM) y Eu^{3+} (4 mM) (espectro azul) **B)** β -CD (5 mM) (espectro rojo) traslapado con β -CD (4.3 mM), TRIS (10 mM) y Nd^{3+} (6.8 mM) (espectro azul). *La estructura de la glucopiranososa se encuentra en A) y B) y los protones se enumeran de acuerdo a las señales en el espectro de β -CD (espectro rojo).

5.5.3 Titulación de β -Ciclodextrina por HPNPP y BNPP por ^1H RMN

Para poder saber si el sustrato tenía asociación con β -CD se tituló la ciclodextrina con HPNPP y con BNPP por ^1H RMN. De las titulaciones se analizaron los espectros y se escogieron las señales en las cuales se observaba mayor cambio en el desplazamiento (Tabla 9-A y 9-B para HPNPP y BNPP, respectivamente). Se construyeron gráficas del desplazamiento de la señal vs la concentración de HPNPP ó BNPP (Figura 51-A y 51-B). Con HPNPP no se pudo calcular una constante de asociación debido a que las gráficas mostraron un perfil casi lineal, por lo que se sugiere la asociación muy débil de β -CD con HPNPP. Por otro lado, con el sustrato BNPP de cada señal de la tabla 9-B se pudo obtener valores de constantes de asociación; se realizó el promedio de éstas y se obtuvo una K de 382 M^{-1} . Con este dato podemos obtener la concentración de $[\beta\text{-CD-S}]$ en las condiciones cinéticas en las que se trabajaron; utilizando $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ de sustrato y 2 mM de β -CD, se tiene que $[\beta\text{-CD-S}] = 2 \times 10^{-5}\text{ M}$; esto nos dice que el 40% del sustrato se encuentra de la forma $\beta\text{-CD-S}$ y por lo tanto 60% está libre.

Tabla 9. Desplazamientos de las señales de β -CD (2mM) al titular la muestra con HPNPP y BNPP.

A)

[HPNPP]	$\delta(1)$	$\delta(2)$	$\delta(3)$
0	3.956	3.987	3.924
0.00102	3.945	3.976	3.913
0.00197	3.934	3.965	3.902
0.00284	3.924	3.955	3.892
0.00366	3.909	3.942	3.879
0.0044	3.902	3.932	3.868

B)

[BNPP]	$\delta(1)$	$\delta(2)$	$\delta(3)$
0	3.987	3.956	3.924
0.00102	3.976	3.945	3.913
0.00197	3.965	3.934	3.902
0.00284	3.955	3.924	3.892
0.00366	3.942	3.909	3.879
0.0044	3.932	3.902	3.868

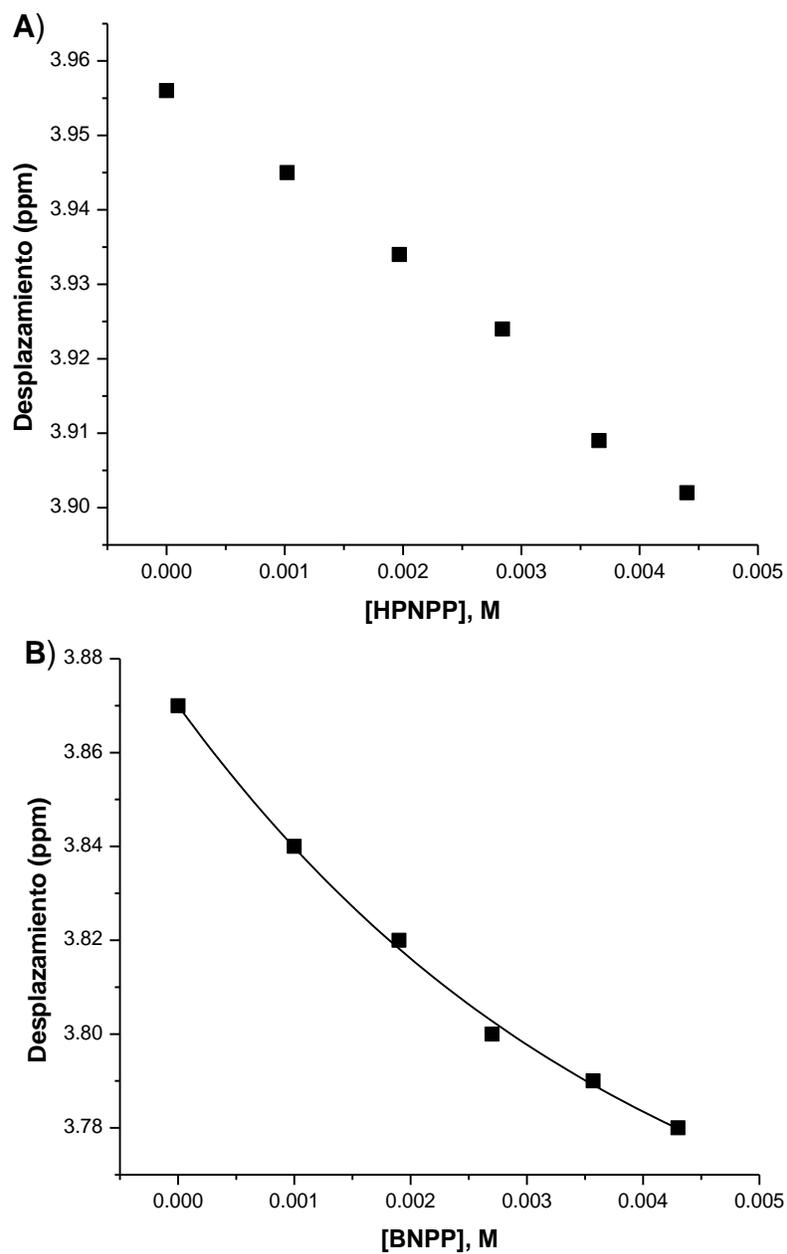


Figura 51. Gráficas de la titulación de β -CD (2mM) con sustrato. Se graficó el desplazamiento de las señales vs la concentración (M) añadida de **A)** HPNPP y **B)** BNPP.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudiaron diferentes ligantes como derivados de ácido picolínico, TRIS y ciclodextrinas para explorar su actividad catalítica en presencia de metales lantánidos(III) para el desarrollo de fosfodiesterasas artificiales. Se estudiaron sistemas metal-ligante con los sustratos HPNPP y BNPP, modelos de ARN y ADN, respectivamente.

Entre los ligantes derivados de ácido picolínico que se estudiaron, el ligante APCA presentó una mejor actividad catalítica en presencia de Eu^{3+} y HPNPP como sustrato. Las especies activas del sistema fueron $\text{ML}(\text{OH})$ y $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_5$ con constantes de segundo orden (k_2) de 2.9 y 3 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente.

De los ligantes derivados de TRIS, Bis-Tris fue estudiado a detalle (en presencia de La^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} y Dy^{3+}) debido a que los resultados obtenidos por titulaciones potenciométricas mostraron la formación de complejos mononucleares de lantánidos(III) notablemente estables de composición $\text{ML}(\text{OH})_n$ con $n=0-3$. Los resultados cinéticos y potenciométricos mostraron que las especies cinéticamente activas en la hidrólisis de HPNPP fueron hidroxocomplejos del tipo $\text{ML}(\text{OH})_n$ con $n=1, 2$ ó 3 mientras que utilizando BNPP fueron las especies con $n=2$ ó 3 ; se observa una k_2 10 veces mayor con HPNPP que con BNPP para las mismas especies. Sin embargo, el efecto catalítico con 1mM del complejo lantánido-BT fue por arriba de 10^3 para HPNPP y de 10^6 para BNPP a pH 9; en otras palabras, la eficiencia catalítica comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea fue 1000 veces mayor para BNPP que para HPNPP a este pH.

Menos estables, pero más reactivos fueron los complejos formados con ciclodextrinas (CDs) como ligantes. De las CDs nativas y modificadas la que mejores resultados dio fue β -CD. De diagramas de distribución de especies y datos cinéticos con β -CD y Eu^{3+} se observó que solo hay una especie activa con el sustrato HPNPP; dicha especie es polinuclear $\text{Eu}_2\text{CD}_2(\text{OH})_6$ con una k_2 de 50.83 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por otro lado, con BNPP se observaron dos especies activas; $\text{EuCD}(\text{OH})$ y $\text{Eu}_2\text{CD}_2(\text{OH})_6$ con k_2 de 0.64 y 1.57 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. El efecto catalítico con 2 mM del complejo lantánido- β -CD fue por arriba de 10^5 para HPNPP y de 10^8 para BNPP a pH 8; por lo que la eficiencia catalítica comparada con la velocidad de hidrólisis espontánea fue 1000 veces mayor para BNPP que para HPNPP a este pH.

Una posible razón de porque la actividad catalítica para CDs fue mejor que la obtenida con los complejos con Bis-Tris es la naturaleza binuclear del polihidroxocomplejo formado, ya que se tiene mayor reactividad cuando existen complejos binucleares del tipo $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_n$, debido a que tienen un mayor número de grupo hidroxilos nucleofílicos y dos metales que cooperan en la estabilización del estado de transición del enlace fosfodiéster para su posterior ruptura.

7. ANEXOS

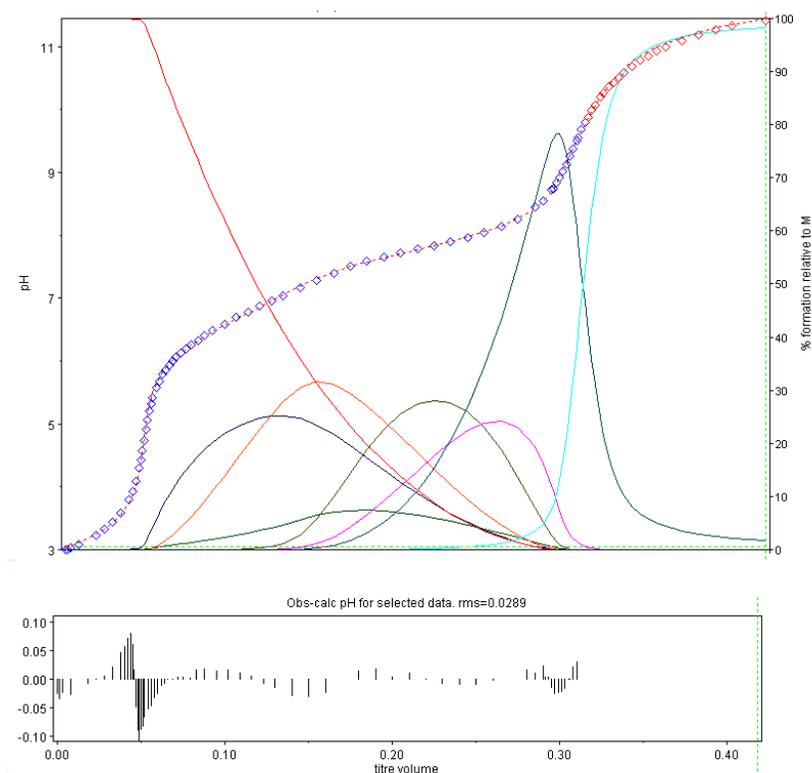


Figura A1 Ajuste por HYPERQUAD a la titulación de APCA con Eu^{3+} en concentración de 2.5 mM y 1 mM, respectivamente en NaCl a 25°C.

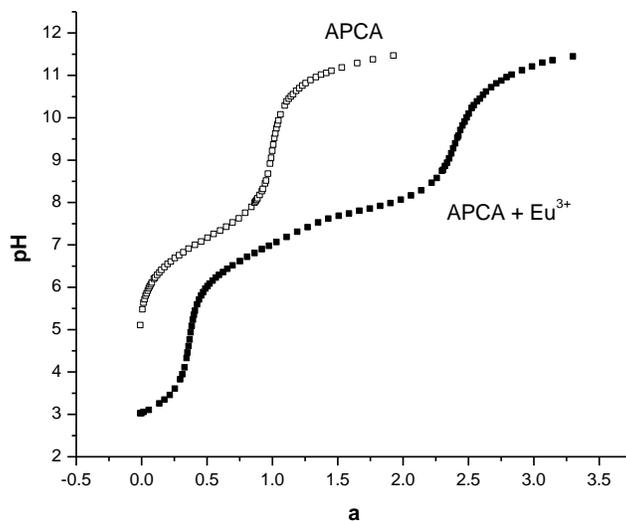


Figura A2. Curvas de titulación potenciométrica de APCA 2.5 mM (cuadros blancos) y de APCA 2.5 mM con Eu^{3+} 1mM (cuadros negros) con NaOH a 25°C, fuerza iónica de 0.05 M por adición de NaCl, “a” es el número de equivalentes de NaOH.

Tabla A1. Constantes de velocidad observadas de Bis-Tris 1 mM con diferentes centros metálicos de iones de lantánidos(III) 1 mM en presencia de HPNPP y BNPP.

HPNPP											
La		Pr		Nd		Eu		Gd		Dy	
pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}
7.38	3.09E-04	7.68	1.43E-04	7.4	6.80E-05	7.88	2.50E-04	7.07	6.80E-05	7.73	1.60E-04
7.81	5.09E-04	7.93	1.90E-04	7.87	2.00E-04	8.03	3.00E-04	7.25	9.60E-05	8.05	1.80E-04
8.26	6.90E-04	8.22	4.75E-04	8.23	4.20E-04	8.38	4.30E-04	7.4	1.20E-04	8.26	2.00E-04
8.84	6.62E-04	8.45	6.90E-04	8.71	7.70E-04	8.44	4.60E-04	7.59	1.60E-04	8.55	2.45E-04
8.71	6.19E-04	8.62	9.70E-04	9.07	0.00104	8.77	5.50E-04	7.72	2.90E-04	8.75	3.60E-04
9.28	0.00113	8.91	0.00127	9.22	0.00102	9.15	7.90E-04	7.74	2.90E-04	8.94	5.10E-04
9.5	0.00256	9.22	0.0013	9.49	0.00104	9.43	8.80E-04	7.81	3.10E-04	9.19	6.90E-04
		9.47	0.00124	9.61	0.00106	9.65	0.00104	7.92	3.50E-04	9.26	6.50E-04
								8.17	4.30E-04		
								8.31	4.70E-04		
								8.52	4.80E-04		
								8.74	5.10E-04		
								8.84	6.10E-04		
								9.47	7.60E-04		
								9.54	6.60E-04		

BNPP											
La		Pr		Nd		Eu		Gd		Dy	
pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}
8.08	2.31E-06	7.74	4.60E-07	7.93	1.70E-06	7.67	3.00E-06	7.22	9.98E-07	7.54	7.90E-06
8.54	6.80E-06	8.09	3.60E-06	8.45	1.40E-05	8.08	1.60E-05	7.55	2.45E-06	7.87	1.40E-05
8.71	1.30E-05	8.28	6.80E-06	8.78	3.90E-05	8.42	3.40E-05	7.8	1.21E-05	8.14	1.70E-05
9.02	3.47E-05	8.47	1.70E-05	9.16	7.90E-05	8.69	4.00E-05	8.19	4.38E-05	8.29	2.10E-05
9.41	1.54E-04	8.6	2.60E-05	9.36	6.90E-05	9.02	5.10E-05	8.43	8.39E-05	8.56	3.70E-05
9.78	1.74E-04	8.8	5.10E-05	9.55	6.00E-05	9.11	4.90E-05	8.53	5.94E-05	8.81	5.90E-05
10.38	1.47E-04	8.99	7.30E-05	9.63	5.60E-05	9.26	6.00E-05	8.7	7.61E-05	9.03	6.60E-05
		9.26	8.00E-05			9.35	5.20E-05	8.92	9.30E-05	9.29	7.00E-05
						9.23	8.70E-05				
						9.67	6.20E-05				

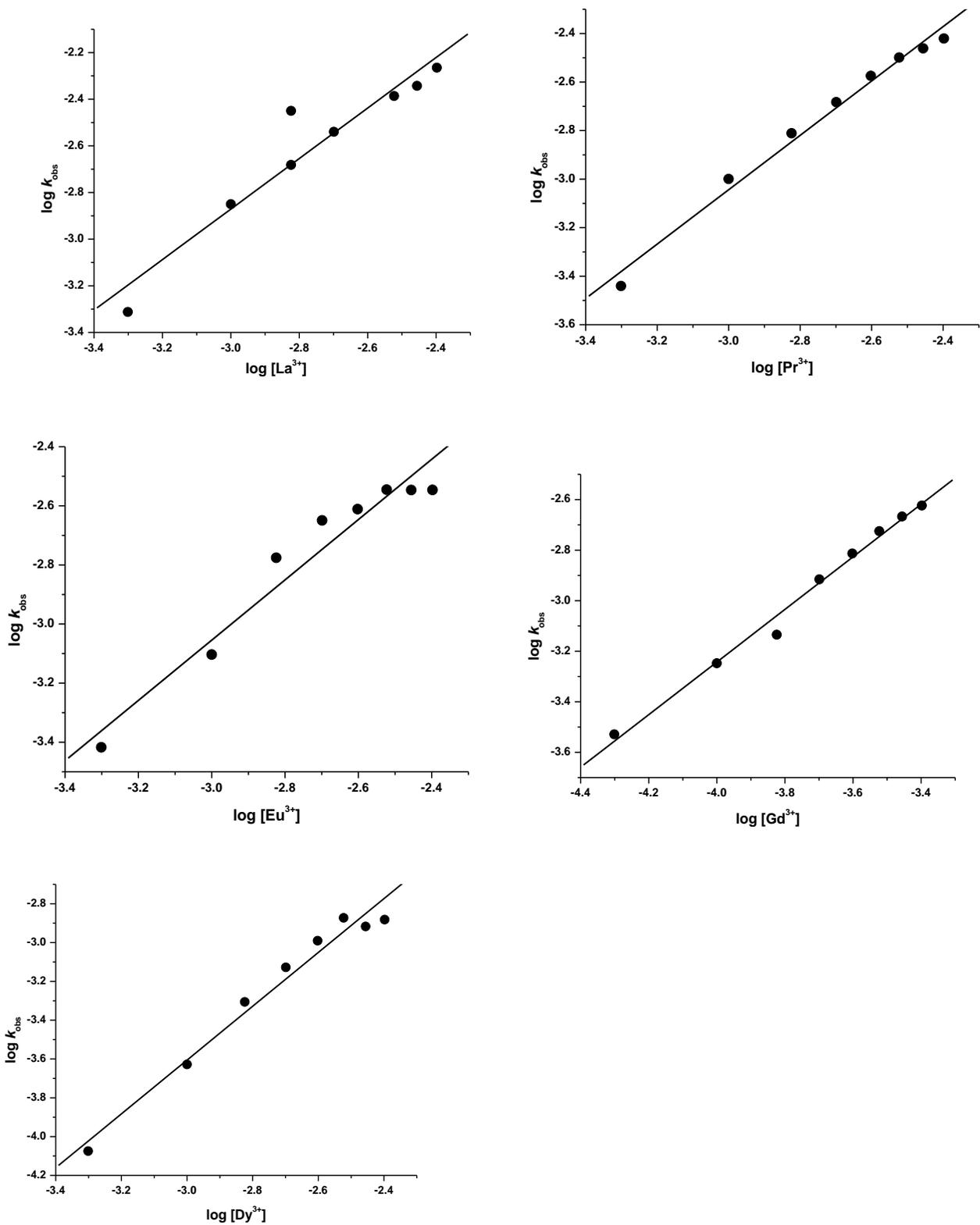


Figura A3. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de HPNPP vs el logaritmo de la concentración de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en relación 1:1 con Bis-Tris en agua y a 25°C .

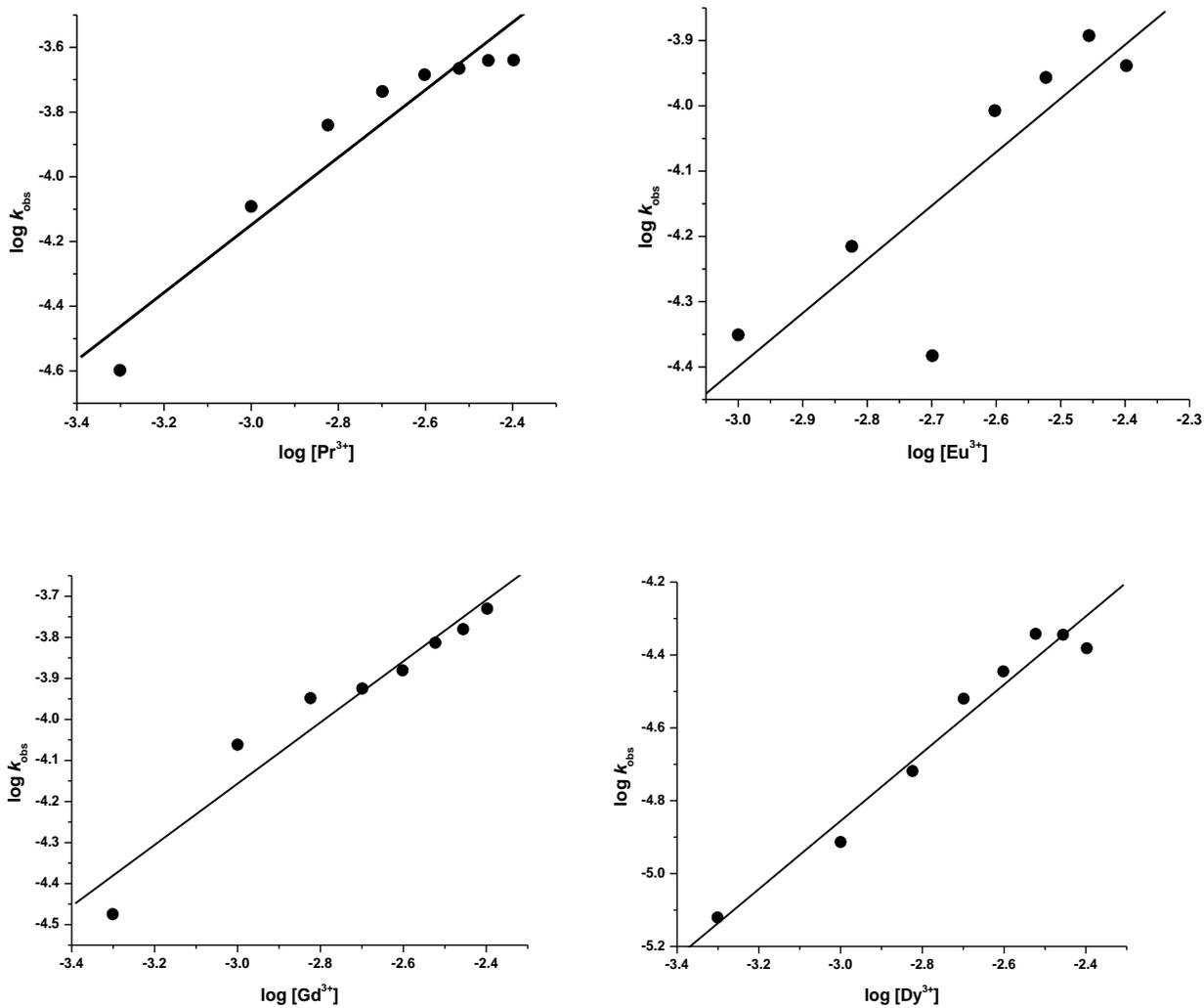


Figura A4. Log de las constantes de velocidad observadas k_{obs} para la hidrólisis de BNPP vs el logaritmo de la concentración de $\text{La}(\text{ClO}_4)_3$ en relación 1:1 con Bis-Tris en agua y a 25°C.

Tabla A2. Constantes de velocidad observadas de β -CD 2 mM con diferentes centros metálicos lantánidos(III) 2 mM en presencia de HPNPP y BNPP.

HPNPP											
La		Pr		Nd		Eu		Gd		Dy	
pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}	pH	k_{obs}
8	6.67E-04	7.7	3.92E-04	7.52	2.86E-04	7.54	1.02E-03	7.38	1.13E-03	7.08	6.25E-04
8.16	1.10E-03	7.8	5.72E-04	7.67	3.98E-04	7.73	2.90E-03	7.56	3.28E-03	7.2	1.15E-03
8.27	1.59E-03	7.91	6.32E-04	7.8	5.48E-04	7.83	5.19E-03	7.67	6.45E-03	7.33	2.50E-03
8.39	2.87E-03	8.02	8.57E-04	7.92	1.12E-03	7.95	9.33E-03	7.78	1.32E-02	7.44	4.30E-03
8.5	2.64E-03	8.13	1.10E-03	8.02	2.30E-03	8.08	1.96E-02	7.86	1.96E-02	7.56	7.81E-03
8.61	4.21E-03	8.22	2.16E-03	8.16	5.65E-03	8.19	3.05E-02	7.94	2.62E-02	7.68	1.20E-02
8.71	6.77E-03	8.31	3.28E-03	8.31	1.09E-02	8.27	3.81E-02	7.99	2.61E-02	7.84	1.99E-02
8.83	0.01567	8.5	1.04E-02	8.47	0.03901	8.37	3.59E-02	7.83	1.85E-02	7.97	1.81E-02
8.95	0.02709	8.66	0.02187								
		8.75	0.02525								
		8.9	0.05389								

BNPP											
La		Pr		Nd		Eu		Gd		Dy	
pH	k_{obs}										
8.03	1.25E-05	7.5	9.83E-06	7.5	1.56E-05	7.61	1.14E-04	7.28	2.81E-05	7.69	2.86E-04
8.16	2.13E-05	7.67	1.50E-05	7.65	2.18E-05	7.73	2.24E-04	7.39	5.91E-05	7.84	4.85E-04
8.24	4.47E-05	7.87	3.29E-05	7.75	3.19E-05	7.8	3.20E-04	7.66	1.56E-04	7.94	6.48E-04
8.36	5.82E-05	8.04	6.00E-05	7.89	6.86E-05	7.94	5.26E-04	7.76	2.42E-04	8.07	4.65E-04
8.55	1.49E-04	8.15	1.55E-04	8.04	1.88E-04	8.14	8.06E-04	7.86	3.04E-04	8.21	4.82E-04
8.64	3.00E-04	8.28	3.12E-04	8.16	3.88E-04	8.26	1.11E-03	7.56	1.38E-04	8.35	2.71E-04
8.76	4.57E-04	8.48	8.71E-04	8.29	8.79E-04	8.37	5.42E-04	7.94	9.32E-04	8.14	3.74E-04
8.84	8.41E-04	8.62	1.79E-03	8.47	0.00205					7.12	4.52E-06
9.02	0.00172	8.73	0.00221							7.3	1.20E-05
		8.77	0.00325							7.5	4.67E-05
		8.87	0.00476							7.64	1.31E-04
		8.97	0.00515							7.71	1.99E-04

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Lim and S. J. Franklin, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2004**, *61*, 2184-2188.
- [2] L. C. Thompson, *Inorg. Chem.*, **1964**, *3*, 1319-1321.
- [3] a) P. Gómez-Tagle and A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 3786-3796; b) S. J. Oh, Y. S. Choi, S. Hwangbo, S. Bae, J. K. Ku and J. W. Park, *Chem. Commun.*, **1998**, 2189.
- [4] M. Yashiro, S. Miyama, T. Takarada and M. Komiyama, *J. Inclus. Phenom. Mol.*, **1994**, *17*, 393-397.
- [5] a) A. J. Cozzone, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1988**, *42*, 97-125; b) C. Chang and R. C. Stewart, *Plant. Physiol.*, **1998**, *117*, 723-731.
- [6] D. Desbouis, I. P. Troitsky, M. J. Belousoff, L. Spiccia and B. Graham, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 897-937.
- [7] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams and R. Wolfenden, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 4052-4055.
- [8] M. A. Zenkova, N. G. Beloglazova and M. A. Zenkova, *Nucleic Acids and Molecular Biology: Artificial Nucleases*, **2004**, *13*, 189-222.
- [9] a) D. M. Brown and A. R. Todd, *Annu. Rev. Biochem.*, **1955**, *24*, 311-338; b) H. Lonnberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 1687-1703; c) T. M. Devlin, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Editorial Reverté, S. A., **2004**, p. 1204.
- [10] A. S. Mildvan, *Proteins*, **1997**, *29*, 401-416.
- [11] J. A. Cowan, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1067-1088.
- [12] T. Nishino and K. Morikawa, *Oncogene*, **2002**, *21*, 9022-9032.
- [13] R. Yuan, *Annu. Rev. Biochem.*, **1981**, *50*, 285-319.
- [14] a) E. A. Galburt and B. L. Stoddard, *Biochemistry-US*, **2002**, *41*, 13851-13860; b) C. Liu and L. Wang, *Dalton Trans.*, **2009**, 227-239.
- [15] J. F. Davies, 2nd, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan and D. A. Matthews, *Science*, **1991**, *252*, 88-95.
- [16] E. E. Kim and H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.*, **1991**, *218*, 449-464.
- [17] R. S. Cox, G. Schenk, N. Mitic, L. R. Gahan and A. C. Hengge, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9550-9551.

- [18] a) N. Strater, T. Klabunde, P. Tucker, H. Witzel and B. Krebs, *Science*, **1995**, 268, 1489-1492; b) T. Klabunde, N. Strater, R. Frohlich, H. Witzel and B. Krebs, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 259, 737-748.
- [19] A. A. Neverov, Z. L. Lu, C. I. Maxwell, M. F. Mohamed, C. J. White, J. S. Tsang and R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 16398-16405.
- [20] a) Y. A. Schneider HJ, **2003**, 40, 369-462; b) Z. M. A., *Nucleic Acids and Molecular Biology: Artificial Nucleases*, Springer, **2004**.
- [21] J. K. B. A.M. Pyle, in: S.J. Lippard (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, **2007**.
- [22] a) J. R. Morrow, *Comment. Inorg. Chem.*, **2008**, 29, 169-188; b) S. Shinoda, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 1825-1835.
- [23] a) O. Taran, F. Medrano and A. K. Yatsimirsky, *Dalton Trans*, **2008**, 6609-6618; b) I. S. Lombardo in *Estabilización y reactividad fosfoestereolítica de hidroxocomplejos metálicos en presencia de disolventes dipolares apróticos*, **2010**, p. 131.
- [24] D. R. Jones, L. F. Lindoy and A. M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 7327-7336.
- [25] M. J. Belousoff, L. Tjioe, B. Graham and L. Spiccia, *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 8641-8651.
- [26] a) J. N. Burstyn and K. A. Deal, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3585-3586; b) K. A. Deal and J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 2792-2798; c) K. A. Deal, A. C. Hengge and J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 1713-1718; d) E. L. Hegg, K. A. Deal, L. L. Kiessling and J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 1715-1718.
- [27] E. L. Hegg and J. N. Burstyn, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 173, 133-165.
- [28] K. M. Deck, T. A. Tseng and J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 669-677.
- [29] W. H. Chapman and R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5462-5469.
- [30] M. Leivers and R. Breslow, *Bioorg. Chem.*, **2001**, 29, 345-356.
- [31] O. Iranzo, A. Y. Kovalevsky, J. R. Morrow and J. P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 1988-1993.
- [32] a) B. K. Takasaki and J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9337; b) H. J. Schneider, J. Rammo and R. Hettich, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 1716; c) A. Roigk, O. V. Yescheulova, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, S. P. Gromov and H. J. Schneider, *Org. Lett.*, **1999**, 1, 833; d) R. A. Moss and W. Jiang, *Langmuir*, **2000**, 16, 49; e) J. R. Morrow, L. A. Buttrely and K. A. Berback, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 16; f) J. R. Morrow, K. Aures and D. Epstein, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2431; g) M. Komiyama, *J. Biochem.*, **1995**, 118, 665; h) A. J. Kirby and M. Younas, *J. Chem. Soc. B*, **1970**, 510; i) P. E. Jurek, A. M. Jurek and A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 1016; j) P. Hurst, B. K. Takasaki and J. Chin, *J. Am.*

Chem. Soc., **1996**, *118*, 9982; k) L. L. Chappell, J. D. A. Voss, J. W. Horrocks, W. De and J. R. Morrow, *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*, 3989.

[33] a) K. Bracken, R. A. Moss and K. G. Ragunathan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 9323; b) B. K. Takasaki and J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1121.

[34] R. A. Moss, J. Zhang and K. Bracken, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1997**, 1639.

[35] a) R. A. Moss, J. Zhang and K. Bracken, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1529; b) E. Stulz and C. Leumann, *Chem. Commun.*, **1999**, 239.

[36] a) J.C. G. Bünzli. a. G. R. Choppin (Eds). *Elsevier, Amsterdam*, **1989**, 432; b) F. Arnaud-Neu, *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, *23*, 235-241.

[37] C. F. Baes, Jr. and R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, **1976**.

[38] R. M. Smith and A. E. Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, **1976**.

[39] a) J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter and O. K. Medhi, *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, OXFORD ALFAOMEGA, **1997**; b) G. D. B. R. H. Klungness, *Polyhedron*, **2000**, *19*, 99-107.

[40] a) S. J. Oh, K. H. Song, D. Whang, K. Kim, T. H. Yoon, H. Moon and J. W. Park, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 3780-3785; b) S. J. Oh, K. H. Song and J. W. Park, *Chem. Commun.*, **1995**, 575-576; c) Q. Sun, J. Lu, J. L. Li, L. Jiang, W. Gu, X. Liu, J. L. Tian and S. P. Yan, *Applied Organometallic Chemistry*, **2014**, *28*, 259-266.

[41] J. R. Morrow, L. A. Buttrey, V. M. Shelton and K. A. Berback, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 1903-1905.

[42] D. Magda, S. Crofts, A. Lin, D. Miles, M. Wright and J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 2293-2294.

[43] K. Matsumura, M. Endo and M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **1994**, 2019-2020.

[44] K. G. Ragunathan and H.-J. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 1219-1221.

[45] a) B. F. Baker, H. Khalili, N. Wei and J. R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 8749-8755; b) S. Amin, D. A. Voss, W. D. Horrocks and J. R. Morrow, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 7466-7467.

[46] M. Komiyama, N. Takeda and H. Shigekawa, *Chem. Commun.*, **1999**, 1443-1451.

[47] F. Medrano, A. Calderon and A. K. Yatsimirsky, *Chem. Commun. (Camb)*, **2003**, 1968-1970.

[48] F. Aguilar-Perez, P. Gomez-Tagle, E. Collado-Fregoso and A. K. Yatsimirsky, *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 9502-9517.

- [49] W. Li, X.-L. Wang, X.-Y. Song, L.-C. Li, D.-Z. Liao and Z.-H. Jiang, *J. Mol. Struct.*, **2008**, 885, 1-6.
- [50] a) L. J. Charbonniere, N. Weibel, C. Estournes, C. Leuvrey and R. Ziessel, *New J. Chem.*, **2004**, 28, 777-781; b) N. Chatterton, Y. Bretonnière, J. Pécaut and M. Mazzanti, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2005**, 44, 7595-7598.
- [51] D. Rama Mohana Rao, N. Rawat, R. M. Sawant, D. Manna, T. K. Ghanty and B. S. Tomar, *J. Chem. Thermodyn.*, **2012**, 55, 67-74.
- [52] J.-M. Pfefferlé and J.-C. G. Bünzli, *Helv. Chim. Acta.*, **1989**, 72, 1487-1494.
- [53] P. Gomez-Tagle and A. K. Yatsimirsky, *Dalton Trans.*, **2001**, 2663-2670.
- [54] S. Jin Oh, Y.-S. Choi, S. Hwangbo, S. Chul Bae, J. Kang Ku and J. Won Park, *Chem. Commun.*, **1998**, 2189-2190.
- [55] B. K. Takasaki and J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 8582-8585.
- [56] P. Gómez-Tagle and A. K. Yatsimirsky, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 2957.
- [57] a) K. O. A. Chin and J. R. Morrow, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 5036; b) A. Roigk, R. Hettich and H. J. Schneider, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 751.
- [58] C. S. Allen, C. L. Chuang, M. Cornebise and J. W. Canary, *Inorg. Chim. Acta.*, **1995**, 239, 29.
- [59] A. Roigk, R. Hettich and H.-J. Schneider, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 751-756.
- [60] S. J. Oh, K. H. Song, D. Whang, K. Kim, T. H. Yoon, H. Moon and J. W. Park, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 3780.
- [61] J. Chin, M. Banaszczyk, V. Jubian and X. Zou, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 186-190.
- [62] a) R. Bergonzi, L. Fabbrizzi, M. Licchelli and C. Mangano, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 770, 31-16; b) A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher and T. E. Rice, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1515-1566.
- [63] a) C. M. Rudzinski, W. K. Hartmann and D. G. Nocera, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 171, 115-123; b) J. Szejtli, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1743-1754.
- [64] J. F. Stoddart and R. Zarzycki, *Recl. Trav. Chim. Pay. B.*, **1988**, 107, 515-528.
- [65] Y. Wang, S. Mendoza and A. E. Kaifer, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 317-320.
- [66] a) S. Li and W. C. Purdy, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1457-1470; b) S. G. Z. G.H. Zhao, J.Z. Gao, J.W. Kang, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1997**, 106, 197.
- [67] E. Norkus, *J. Incl. Phenom. Macro.*, **2009**, 65, 237-248.

- [68] N. Fatin-Rouge and J.-C. G. Bünzli, *Inorg. Chim. Acta.*, **1999**, 293, 53-60.
- [69] P. Klüfers, H. Piotrowski and J. Uhlendorf, *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 601-608.
- [70] a) P. Hu, G. F. Liu, L. N. Ji and Z. W. Mao, *Chem. Commun. (Camb)*, **2012**, 48, 5515-5517; b) M. Zhao, L. Zhang, H. Y. Chen, H. L. Wang, L. N. Ji and Z. W. Mao, *Chem. Commun. (Camb)*, **2010**, 46, 6497-6499.
- [71] S. Takebayashi, M. Ikeda, M. Takeuchi and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **2004**, 420-421.
- [72] K. R. Gajda T., Jancso A., *Eur. J., Inorg. Chem.*, **2000**, 1635.
- [73] P. Molenveld, W. M. G. Stikvoort, H. Kooijman, A. L. Spek, J. F. J. Engbersen and D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3896-3906.
- [74] K. Selmecezi, C. Michel, A. Milet, I. Gautier-Luneau, C. Philouze, J.-L. Pierre, D. Schnieders, A. Rompel and C. Belle, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 9093-9106.
- [75] K. Bracken, R. A. Moss and K. G. Ragunathan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9323-9324.
- [76] J. R. Morrow and W. C. Trogler, *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 3387-3394.
- [77] T. Gajda, Y. Dupre, I. Torok, J. Harmer, A. Schweiger, J. Sander, D. Kuppert and K. Hegetschweiler, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 4918-4927.
- [78] A. Benchini, E. Berni, A. Bianchi, V. Fedi, C. Giorgi, P. Paoletti and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 6323.
- [79] P. E. Jurek and A. E. Martell, *Inorg. Chim. Acta.*, **1999**, 287, 47.
- [80] D. M. Brown and D. A. Usher, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 6558-6564.
- [81] S. J. Lyle and M. M. Rahman, *Talanta*, **1963**, 10, 1177.
- [82] S. J. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, 5, 201-208.
- [83] A. K. Yatsimirsky, *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, 249, 1997-2011.
- [84] L. E. Kapinos and H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta.*, **2002**, 337, 131-142.
- [85] K. Nicholson and S. Wood, *J. Solution Chem.*, **2002**, 31, 703-717.
- [86] a) G. Parkin, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 699-768; b) H. Vahrenkamp, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 598-596.
- [87] D. O. Corona-Martinez, P. Gomez-Tagle and A. K. Yatsimirsky, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 9110-9119.
- [88] K. Nwe, C. M. Andolina and J. R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 14861-14871.
- [89] L. Bonfá, M. Gatos, F. Mancin, P. Tecilla and U. Tonellato, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 3943-3949.