

Tesis Doctoral

Complejos de hierro no hémico con nitroxilo y sus precursores: síntesis, caracterización y reactividad

Montenegro, Andrea Constanza

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Montenegro, Andrea Constanza. (2011). Complejos de hierro no hémico con nitroxilo y sus precursores: síntesis, caracterización y reactividad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Montenegro, Andrea Constanza. "Complejos de hierro no hémico con nitroxilo y sus precursores: síntesis, caracterización y reactividad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad De Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Qca. Analítica y Química Física

**Complejos de hierro no hémico con nitroxilo y sus
precursores: síntesis, caracterización y reactividad**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: Química Inorgánica, Qca. Analítica y Química Física

Andrea Constanza Montenegro

Directores de tesis: José A. Olabe

Sara E. Bari

Buenos Aires, 2011

Tengamos ideales elevados y pensemos en alcanzar grandes cosas, porque como la vida rebaja siempre y no se logra sino una parte de lo que se ansía, soñando muy alto alcanzaremos mucho más. Para una voluntad firme, nada es imposible, no hay fácil ni difícil; fácil es lo que ya sabemos hacer, difícil, lo que aún no hemos aprendido a hacer bien”.

Bernardo Houssay

A mi mamá Gladis y a mi Martin

Complejos de Hierro no Hémico con Nitroxilo y sus Precursores: Síntesis, Caracterización y Reactividad

En este trabajo de Tesis se ha estudiado la química de coordinación de nitroxilo (HNO/NO⁻) en la plataforma de [Fe^{II}(CN)₅]³⁻, como sistema modelo de procesos enzimáticos que involucran transformaciones redox en moléculas nitrogenadas pequeñas (desde nitratos hasta amoníaco) que operan en los ciclos naturales del nitrógeno. Como ruta de síntesis, se realizó la reducción por dos electrones del anión nitroprusiato, [Fe^{II}(CN)₅NO]²⁻, utilizando ditionito (S₂O₄²⁻) como reductor. El nuevo complejo, [Fe^{II}(CN)₅HNO]³⁻, fue caracterizado en solución por combinación de técnicas espectroscópicas (UV-visible, FT-IR/ATR, RMN ¹H y Raman resonante). Se determinaron el potencial de reducción de la cupla Fe^{III}/Fe^{II} por voltametría cíclica ($E = 0,44$ V), y el $pK_a = 7,7$ del par ácido-base Fe^{II}(HNO)/Fe^{II}(NO⁻) mediante titulación por RMN ¹H. Los estudios de reactividad de [Fe^{II}(CN)₅HNO]³⁻ frente al ditionito muestran que es reducible hasta [Fe^{II}(CN)₅NH₃]³⁻. Ambas especies coordinadas, HNO y NO⁻, reaccionan diferenciadamente frente a oxidantes. Mientras que el complejo de HNO se comporta como un reductor entre débil y moderado, el complejo desprotonado es un reductor muy fuerte.

Se estudió también la reactividad del fármaco hidroxiurea (HU, H₂NCONHOH) frente a complejos [Fe^{II/III}(CN)₅]^{3-/2-}, ya que su actividad farmacológica podría estar asociada con la capacidad dadora de HNO/NO⁻, o de NO, en reacciones mediadas por complejos de hierro. La HU generó un nuevo complejo estable por reacción con [Fe^{II}(CN)₅H₂O]³⁻, en presencia de oxidantes, que fue aislado como sólido de fórmula Na₃[Fe(CN)₅(NOCONH₂)]·2H₂O, y caracterizado en solución por técnicas espectroscópicas diversas. El ligando es la nitrosoformamida, que funciona como un dador de HNO/NO⁻, por hidrólisis alcalina, frente a aceptores selectivos, por vía de un mecanismo que resulta similar a los observados en medios biorelevantes.

Palabras claves: compuestos nitrosilados de hierro – nitroxilo – hidroxiurea, nitrosoformamida – cianoferratos.

Nitroxyl Iron Complexes and their Precursors: Synthesis, Characterization and Reactivity

We have studied the coordination chemistry of nitroxyl (HNO/NO⁻) on the [Fe^{II}(CN)₅]³⁻ platform, as a model system for enzymatic processes of the nitrogen cycle that involve the redox transformations of nitrogen-containing small molecules (from nitrate to ammonia). The synthetic strategy consisted in the two electron reduction of the nitroprusside anion, [Fe(CN)₅NO]²⁻, using dithionite (S₂O₄²⁻) as the reducing agent. The new complex, [Fe^{II}(CN)₅HNO]³⁻, was characterized in solution by combination of spectroscopic techniques (UV-vis, FT-IR/ATR, ¹H RMN and resonance Raman). The redox potential of the Fe^{III}/Fe^{II} couple was determined by cyclic voltametry (*E* = 0,44 V), and a p*K*_a = 7,7 for Fe^{II}(HNO)/Fe^{II}(NO⁻) was estimated, following the acid- base titration by ¹H RMN. Further reduction of [Fe^{II}(CN)₅HNO]³⁻ with dithionite showed the formation of [Fe^{II}(CN)₅NH₃]³⁻. Coordinated HNO or NO⁻ exhibit a different chemical profile toward oxidants: while the HNO complex is a weak or mild reductant, the NO⁻ complex is a strong reducing agent.

The chemical reactivity of the drug hydroxyurea (HU, H₂NCONHOH) toward [Fe^{II/III}(CN)₅]^{3-/2-} complexes was also explored, as its pharmacological activity is supposed to be associated with the release of HNO/NO⁻ or NO, assisted by iron complexes. A new and stable complex was obtained by the reaction of HU with [Fe^{II}(CN)₅H₂O]³⁻, in the presence of oxidants. The solid Na₃[Fe^{II}(CN)₅(NOCONH₂)]·2H₂O was isolated and characterized, and the spectroscopic properties of the [Fe^{II}(CN)₅NH₂CONO]³⁻ ion were investigated. After alkaline hydrolysis of the latter complex, the C-nitrosoformamide ligand behaves as a HNO/NO⁻ donor, through a mechanism that resembles the one proposed in biorelevant conditions.

Key words: nitrosyl complexes – nitroxyl – hydroxyurea – nitrosoformamide – cyanoferrates.

Índice

Capítulo 1 – Introducción	1
1.1. La especie nitroxilo HNO/NO ⁻ . Descripción electrónica y algunas propiedades fisicoquímicas.	3
1.2. El nitroxilo libre: síntesis y biosíntesis	5
1.2.1 Obtención de HNO/NO ⁻	5
1.2.2 Formación de HNO/NO a nivel biológico	5
1.3. Reactividad del nitroxilo libre	7
1.3.1 Equilibrio ácido–base de las especies nitroxiladas	7
1.3.2 Reacción de dimerización del ¹ HNO	9
1.3.3 Reacción de HNO con O ₂	9
1.3.4 Reacción de HNO con NO [•]	10
1.3.5 Reacción de HNO con tioles	11
1.4. Coordinación del nitroxilo en metales de transición	11
1.4.1 Propiedades generales de enlace en los nitrosilos coordinados	11
1.4.2 Complejos con el anión NO ⁻	13
1.4.3 Complejos con HNO	14
1.5. Reactividad del nitroxilo coordinado	17
1.6. Los complejos de nitroxilo a nivel biológico. Interconversiones redox	19
1.6.1 Ciclo del nitrógeno	19
1.6.2 Las óxido nítrico reductasas (NOR)	20
1.6.3 La guanilato ciclasa	23
1.7. Bibliografía	23
Capítulo 2 – Reducción del [Fe^{II}(CN)₅NO]²⁻ por dos electrones: Formación de nitroxilo Coordinado	
2.1 Propiedades del ion nitroprusiato, [Fe ^{II} (CN) ₅ NO] ²⁻	28
2.2 Ensayos preliminares	28
2.3 Estequiometría de la reacción de reducción del [Fe ^{II} (CN) ₅ NO] ²⁻	31
2.4 Caracterización espectroscópica de P ₄₄₅	33
2.4.1 RMN ¹ H	36
2.4.2 FTIR / ATR	36
2.4.2.1 Espectros FTIR/ATR en solución	38
2.4.2.2 Espectros de FTIR en fase sólida	38
2.4.3 Espectroscopía UV- visible	41

2.4.4 Raman Resonante	42
2.5. Bibliografía	44
Capítulo 3 – Reactividad de los complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ (I) y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{4-}$ (II)	47
3.1 Equilibrio ácido-base de (I) – Titulación (^1H RMN)	48
3.2 Descomposición del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$, (I). Destino del ligando HNO	51
3.3 Reactividad fotoquímica de (I). Estudio preliminar por espectroscopía UV-visible, a pH 6.	53
3.4 Reactividad de (I) frente a reductores: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (SDT), pH 6	54
3.5 Reactividad de (I) frente a oxidantes, pH 6: $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, y metilviológeno (1,1-Dimetil-4,4'-bipiridina, MV^{2+}).	58
3.5.1 Reacción de (I) con $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ a pH 6	59
3.5.2 Reacción de (I) con nitroprusiato, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, a pH 6	64
3.5.3 Reacción de (I) con metilviológeno, MV^{2+} , a pH 6	65
3.6 Estabilidad y Reactividad del complejo nitroxilado $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{4-}$, pH 10	65
3.6.1 Determinación cualitativa de la reactividad fotoquímica de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{X}]^{n-}$, pH 10.	67
3.6.2 Reacción de (II) con $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, pH 10	68
3.6.3 Reacción de (II) con nitroprusiato, $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, pH 10	70
3.6.4 Reacción de (II) con metilviológeno, pH 10	71
3.7 Bibliografía	72
Capítulo 4 – Reactividad del fármaco hidroxiiurea coordinado al pentacianoferrato: un precursor de nitroxilo?	74
4.1 Propiedades de la hidroxiiurea	74
4.1.1 Antecedentes farmacológicos	74
4.1.2 Vías de descomposición oxidativa de la hidroxiiurea	75
4.1.3 Oxidación química de la HU	76
4.1.4 Oxidación biológica de la hidroxiiurea	77
4.2 La hidroxiiurea coordinada en las plataformas pentacianoferrato	78
4.2.1 Aislamiento y caracterización del complejo P_{465}	78
4.2.2 Estequiometría de la reacción de HU y $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$	80
4.2.3 Espectroscopía UV-visible del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$	82
4.2.4 Registros de espectroscopía de resonancia paramagnética adquiridos durante la síntesis de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$	83

4.2.5 Mecanismo de reacción postulado para la oxidación de HU por el complejo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$. Estabilidad del complejo $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{acilnitroso})$	84
4.3. Reactividad química del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$	85
4.3.1 Descomposición espontánea e inducida por agregado de base (pH 9 y 10).	85
4.3.2 Descomposición espontánea del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ por agregado de base ($11 < \text{pH} < 13$).	88
4.4 Bibliografía	92
Capítulo 5– Parte Experimental	
5.1 Materiales	95
5.2 Técnicas Espectroscópicas y métodos analíticos	96
5.3 Reducción química del anión nitroprusiato	100
5.4 Cuantificación de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$	100
5.5 Espectro de FTIR en fase sólida de (I)	101
5.6 Estimación del potencial rédox en el complejo (I)	101
5.7 Experimentos preliminares para la obtención de complejo acilnitroso a partir de hidroxiiurea (HU) y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ en presencia de oxidantes.	103
5.8 Determinación de NH_3 liberado por el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$	103
5.9 Determinación de CO_2 liberado por el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$	103
5.10 Determinación de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ en los productos de descomposición del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$	104
5.11 Bibliografía	104
Capítulo 6– Conclusiones	106

Capítulo 1

Introducción

En este trabajo de Tesis se propone estudiar aspectos de estructura electrónica y de reactividad en la química de coordinación del nitroxilo (HNO) en condiciones biológicamente relevantes, esto es, en soluciones acuosas a pH fisiológico, y mediante la selección de complejos de $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$, como modelo de sus potenciales destinos bioquímicos.

El HNO es una molécula que contiene al átomo de N en el estado de oxidación +1, y por ende opera como intermediaria en los ciclos del N, pudiendo ser oxidada o reducida. Es conocida hace años, aunque ha comenzado a ser adecuadamente caracterizada mucho más recientemente. Es una especie muy reactiva en solución acuosa, que conduce rápidamente a la formación de N_2O por dimerización/deshidratación. La química de coordinación del HNO y de su especie desprotonada, NO^- , ha sido bastante estudiada en varios metales de transición, aunque muy limitadamente con hierro y en soluciones acuosas. En esos iones complejos, ambas especies pueden resultar notoriamente estables, según el caso. En años más recientes, el interés en las especies nitroxiladas ha adquirido mucha importancia, en paralelo con la explosión de investigaciones relacionadas con la bioquímica del óxido nítrico, NO, así como en los estudios mecanísticos acerca del funcionamiento de las enzimas nitrificantes y desnitrificantes que operan en los suelos.

Para disponer de modelos adecuados en fase acuosa, se ha propuesto la preparación y caracterización de un ion complejo de HNO coordinado a una plataforma de pentacianoferrato(II), $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5]^{3-}$. La estrategia diseñada se basó en la disponibilidad de un precursor accesible, el ion nitroprusiato, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, cuya química ha sido estudiada intensamente en años recientes, en particular relacionada con su utilización como agente hipotensivo. La idea central consistió en evaluar la factibilidad de reducir al nitroprusiato mediante 2 electrones con un reductor adecuado, y estudiar la reactividad del producto. La plataforma de pentacianoferrato(II) ha sido utilizada en una serie de complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{n-}$, para los cuales han sido bien descriptos varios compuestos que contienen diferentes ligandos L nitrogenados ($\text{L} = \text{NH}_3, \text{N}_2\text{H}_4, \text{NH}_2\text{OH}, \text{NO}^+, \text{NO}_2^-$), todos ellos muy relevantes en la discusión mecanística de las enzimas que participan del ciclo del nitrógeno. Los complejos de $\text{L} = \text{HNO}/\text{NO}^-$ adquieren así un rol estratégico en este marco más amplio.

Complementariamente, y siendo que el HNO puede también generarse por oxidación, se consideró el uso de hidroxihidrea, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHOH}$, un fármaco empleado en varias quimioterapias, el que se coordinaría a centros metálicos (por ej.: a la plataforma pentacianoferrato(II)) y un proceso oxidativo terminaría en la liberación de HNO, en condiciones controladas, al medio acuoso.

En el contexto anterior, en este primer capítulo se introduce como antecedente un resumen de las propiedades generales de la molécula HNO, sus métodos de obtención *in vitro* y las controversias sobre su generación endógena, sus propiedades fisicoquímicas y reactividad química. Se analiza la obtención y características estructurales de complejos de metales de transición conteniendo al HNO o al NO^- , y la eventual participación de ellos en el ciclo del nitrógeno, o como intermediario en otros procesos enzimáticos.

El capítulo 2 introduce las propiedades de la familia de complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{n-}$, donde L es un ligando nitrogenado, para presentar y discutir el procedimiento experimental desarrollado para la obtención de un complejo de $\text{L} = \text{HNO}$. Finalmente, este capítulo presenta las evidencias químicas y espectroscópicas para caracterizar el nuevo complejo de HNO y las comparaciones con otros complejos relacionados.

En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos para diferentes formas de reactividad del nuevo complejo de HNO, a saber: su desprotonación, la estabilidad en solución acuosa de los complejos nitroxilados (que incluye estudios fotoquímicos) y sus reacciones frente a reductores y oxidantes.

En el capítulo 4 se investigan aspectos de la química de coordinación de la hidroxihidrea en la misma plataforma de pentacianoferrato(II), luego de una presentación general acerca de sus propiedades farmacológicas, dentro de las cuales se destaca su tendencia a la generación endógena de NO y/o de HNO.

El capítulo 5 resume las diferentes metodologías experimentales, de validez general, que hemos utilizado en el trabajo. Los detalles más específicos acerca de algunas técnicas de medida se presentan, por el contrario, en los capítulos anteriores correspondientes.

Finalmente, el capítulo 6 resume las conclusiones del trabajo y sus perspectivas de avance. Las referencias bibliográficas se agrupan al final de cada capítulo.

1.1 La especie nitroxilo HNO/NO⁻. Descripción electrónica y algunas propiedades fisicoquímicas.

El nitroxilo, también denominado hidruro de nitrosilo, o azanona (HNO),^{1, 2, 3} es el producto de la reducción por un electrón del ubicuo óxido nítrico (NO^{*}), y resulta ser la especie más simple que contiene al nitrógeno en estado de oxidación +1. La especie es conocida desde el siglo XIX y, a pesar de ello, diversos aspectos fisicoquímicos, de su reactividad química y de sus roles bioquímicos resultan hoy todavía controversiales o bien desconocidos.⁴ En la Figura 1.1 se describe a la molécula HNO con sus parámetros geométricos (molécula angular con doble enlace N=O), y frecuencias características en el IR.⁵

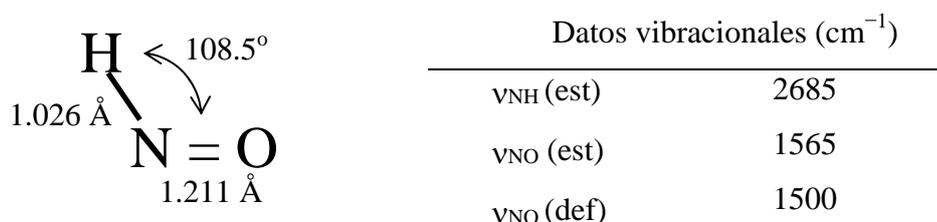


Figura 1.1 Datos estructurales y vibracionales para el HNO libre.

Al desprotonar HNO se genera el anión nitroxilo, NO⁻, el cual resulta ser isoelectrónico con el O₂ y, por ende, con posibilidades de acceder a los estados triplete (estado fundamental) y singlete (estado excitado). Si bien el ¹HNO es la forma más estable, el ³NOH también es una forma accesible a partir de la protonación del ³NO⁻, presentando al protón unido al átomo más electronegativo. Ambas formas han sido detectadas espectroscópicamente,^{6, 7} y la barrera energética que las separa es \approx 20-23 kcal/mol.⁸ De igual manera, las especies ³NO⁻ y ¹NO⁻ presentan una barrera energética de \approx 17-21 kcal/mol (Figura 1.2).

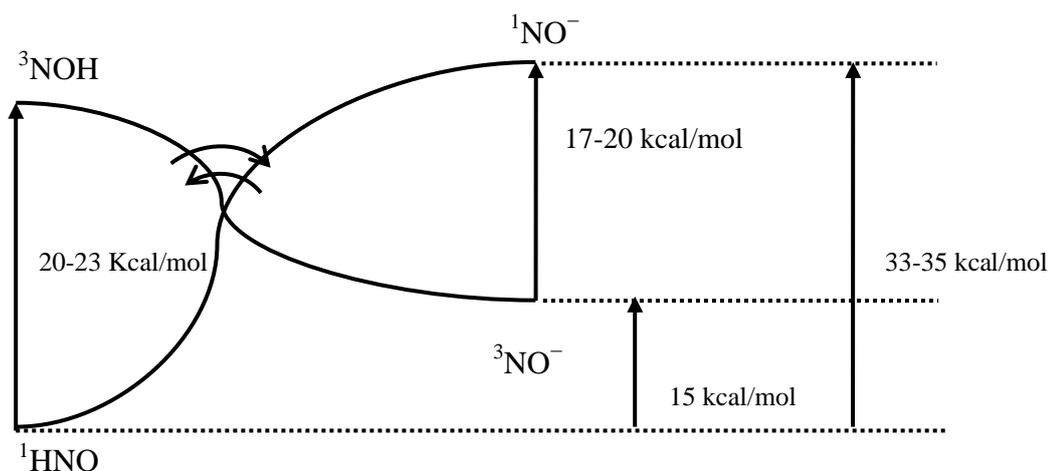


Figura 1.2 Diferentes conformaciones de espín para la especie nitroxilo (HNO y su base conjugada NO⁻)

Es sabido que la entidad diatómica NO admite otras especies accesibles con diferente número de electrones, con estructuras y reactividades bien diferenciadas, que pueden interconvertirse entre ellas. Una de ellas es el famoso óxido nítrico, NO[•], otra es el catión nitrosonio, NO⁺ y otra es el anión nitroxilo, NO⁻, Ec. 1.1.



Las distancias N-O y frecuencias de vibración ν_{NO} para las tres especies se presentan en Tabla 1.1.

Molécula	Estado de oxidación del N	Orden de enlace	Distancia NO (Å)	ν_{NO} (cm ⁻¹)	Ref.
Nitrosonio, NO ⁺	+3	3	1,06	2377	⁹
Óxido nítrico, NO [•]	+2	2.5	1,15	1875	⁹
Nitroxilo, NO ⁻	+1	2	1,26	1470	¹⁰

Tabla 1.1 Comparación de las distancias de enlace y ν_{NO} para las especies NO⁺, NO[•] y NO⁻

Se observa que las distancias N-O y las frecuencias de estiramiento ν_{NO} crecen y decrecen, respectivamente, al descender en la tabla, reflejando los órdenes de enlace

decrecientes y la mayor población electrónica en los respectivos orbitales antienlazantes.

1.2 El nitroxilo libre: síntesis y biosíntesis

1.2.1 Obtención de HNO/NO⁻

Una de las primeras referencias acerca del HNO lo identifica como producto de la descomposición del trioxodinitrato de sodio, Na₂N₂O₃, conocido como sal de Angeli, (Ec. 1.2).¹¹



Otras vías de obtención comprenden la reacción de átomos de hidrógeno con óxido nítrico, congelando los productos a baja temperatura,¹² y la fotólisis aeróbica de amoníaco. Estas reacciones inorgánicas son significativas en estudios atmosféricos.¹³ La detección infrarroja de HNO,^{7a} fue lograda por fotólisis de nitrito de metilo en una matriz de argón. A comienzos de los 70, dos grupos investigaron independientemente la radiólisis pulsada de NO en solución acuosa,^{4a, b} observando que adicionaba rápidamente al electrón hidratado o al átomo de hidrógeno, formando NO⁻ y HNO, respectivamente.¹⁴ Más recientemente el HNO ha sido generado por fotólisis del trioxodinitrato,^{4d} brindando la información actualmente aceptada sobre el diagrama de energías de la Figura 1.1 y el punto de partida para la reconsideración del pK_a HNO/NO⁻ y del E° (HNO/NO[•]), que se discutirá más adelante.

1.2.2 Formación de HNO/NO⁻ a nivel biológico

Las óxido nítrico sintetasas (NOS) son un conjunto de enzimas que sintetizan NO y citrulina a partir de L-arginina. El sitio de reacción contiene un porfirinato de hierro(III). En una primera etapa, se forma el intermediario N-hidroxi-L-arginina, que contiene al grupo RNHOH, un eficiente dador de HNO en compuestos sintéticos. Ha sido sugerido que la obtención de NO puede estar intermediada por el HNO, o bien que las NOS pueden producir HNO, además de NO.¹⁵ La producción alternativa de HNO

ocurriría en condiciones de deficiencia del cofactor tetrahidrobiopterina (H₄B);¹⁶ la reducción del sustrato L-arginina llevaría a la obtención de HNO (Figura 1.3).

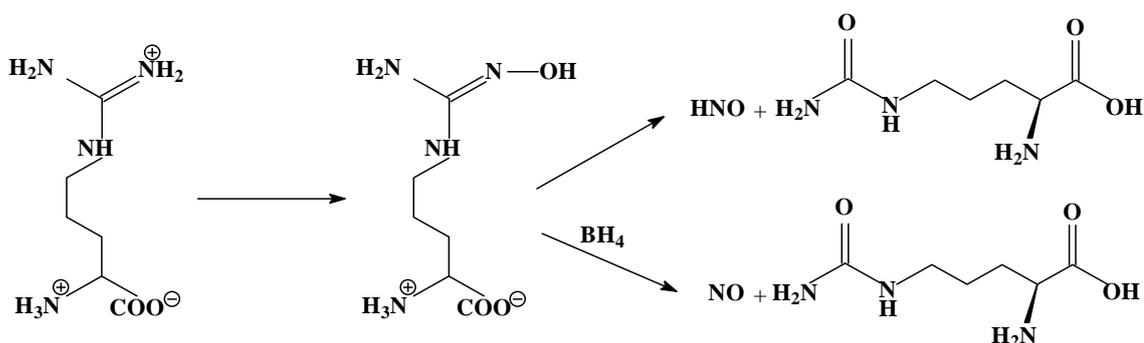


Figura 1.3 Esquema propuesto para la obtención de HNO o NO a partir de arginina. Mecanismo de acción de las óxido nítrico sintasas.

Existen evidencias de experimentos *in vitro* en favor de esta hipótesis, como la detección de óxido nítrico, N₂O, e hidroxilamina, NH₂OH,^{15b, 17} así como de la forma Fe^{II}(NO) de las NOS.^{15a} También ha sido sugerido, en base a estudios con modelos sintéticos, que la N-hidroxi-L-arginina puede disociarse del sitio activo de la NOS formando HNO en presencia de ciertos oxidantes.¹⁸

Han sido sugeridas otras vías para la formación de HNO que no dependen directamente de la enzima NOS. Los tioles (RSH), compuestos presentes en concentraciones considerables en medios biológicos, pueden reaccionar con S-nitrosotioles (R'SNO) en un proceso redox que conduce a la formación de HNO y del disulfuro correspondiente, RSSR' (Ec. 1.3).¹⁹ A su vez, el HNO formado puede reaccionar con S-nitrosotioles o tioles, para formar NO o NH₂OH como productos nitrogenados, y sulfinamidas que conducen a la formación de ácidos sulfinicos (Ecs. 1.3–1.6).





Estos productos azufrados, RSNONH₂, provenientes de la reacción de tioles con HNO, a diferencia de los nitrosotioles, resultan irreversibles. La NH₂OH endógena podría ser también precursora de HNO,²⁰ así como diversas enzimas o metaloproteínas que contienen metales de transición coordinados en sus sitios activos, o ciertos oxidantes biológicos, los cuales pueden catalizar la reducción de NO• a HNO, como por ejemplo las Cu/Zn/Mn-SOD's (superóxido dismutasas),²¹ el citocromo c,²² el ubiquinol,^{23, 24} o la xantina oxidasa.²⁵

A pesar de las diversas vías potenciales para la formación endógena de HNO, a la fecha no hay evidencia de la formación *in vivo* de esta especie, ya que la cuantificación está limitada por la evolución de los métodos para su detección directa.

1.3 Reactividad del nitroxilo libre

La Figura 1.2 constituye un punto de partida para la interpretación de la reactividad de las especies de nitroxilo. En esta sección, se describen la reacción de desprotonación del HNO, y aspectos de la reactividad frente a moléculas pequeñas de relevancia biológica: O₂, NO•, tioles, metaloproteínas y metales.

1.3.1 Equilibrio ácido–base de las especies nitroxiladas

Un aspecto singular y fascinante de la química del HNO es su desprotonación, Ec. 1.7.



El valor inicialmente aceptado del pK_a del ¹HNO era de 4,7.^{4a} Esto se traducía en que, a pH fisiológico, más del 99% de la especie nitroxilo presente sería la forma NO⁻. A partir de este valor se determinó un potencial de reducción de 0,39 V para la cupla NO•/³NO⁻, que indica que la reducción del NO debería resultar muy favorable, en

comparación con la reducción del O₂ (-0,16 V). Este valor, sin embargo, no podía explicar porqué el NO• no resultaba significativamente reducido a pH fisiológico. Bartberger M.D. y cols.,^{4c} (mediante cálculos mecano-cuánticos, voltametría cíclica y espectrofotometría de la reducción del viológeno), además de Shafirovich y Lymar,^{4d} (mediante experimentos de radiólisis pulsada), reportaron la revisión de los valores de pK_a y de potenciales redox a comienzos del siglo XXI, según se detalla en la Figura 1.4. El nuevo valor de pK_a = 11,6 para dar el ³NO⁻, indica que la forma predominante en condiciones fisiológicas es el ¹HNO, una molécula pequeña y neutra capaz de atravesar membranas. Un segundo valor de pK_a = 23 está en acuerdo con la elevada basicidad esperada para la forma ¹NO⁻. La Figura 1.4 resume la información reportada desde 1970 sobre los valores de pK_a y potencial redox.^{4a, d, 26}

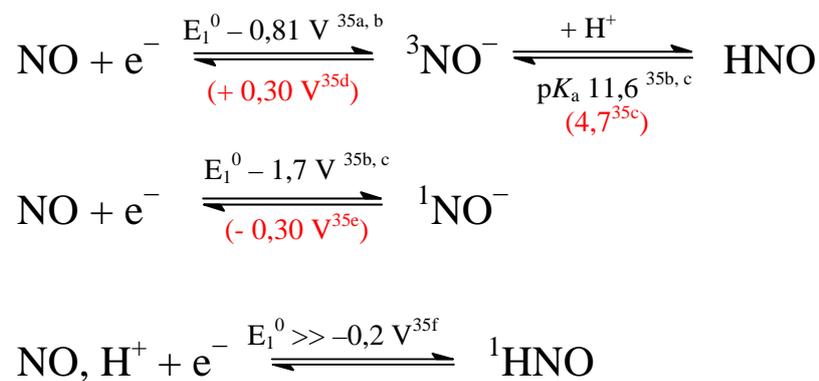


Figura 1.4 Potenciales de reducción NO/NO⁻ y pK_a HNO/NO⁻. Entre paréntesis se consignan los valores anteriormente reportados.

Los valores negativos para los potenciales de reducción de un electrón para ambas cuplas NO•/³NO⁻ y NO•, H⁺/¹HNO indican que la reducción directa por un electrón del NO• implica un proceso de transferencia de electrones que no es probable que ocurra bajo condiciones biológicas.²⁷ Además, los valores indican que el NO y el HNO podrían coexistir en condiciones fisiológicas, por lo que los resultados de experimentos bioquímicos obtenidos por suministro de dadores de HNO no se explicarían por conversión a NO•, sino por la acción propia del HNO. Como consecuencia, los valores actualmente aceptados para la constante de equilibrio ácido-base y el potencial de

reducción $\text{NO}^\bullet/\text{}^3\text{NO}^-$ brindan una nueva perspectiva sobre los potenciales destinos bioquímicos de la especie.

1.3.2 Reacción de dimerización del ^1HNO

La rápida dimerización del HNO genera ácido hiponitroso, $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$, un intermediario lábil que deshidrata para producir N_2O (Ec. 1.8).^{28,29}



La constante de dimerización inicialmente aceptada, $k_{\text{dim}} = 1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH 7, 25 °C),²⁹ fue corregida recientemente, $k_{\text{dim}} = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^{4d} La diferencia es clave a la hora de evaluar la presencia de HNO en medios aeróbicos. Debido a las dificultades en la detección directa de HNO en los sistemas biológicos, la reacción de dimerización se ha utilizado ampliamente como método indirecto, ya que el N_2O se puede detectar por cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas, o por técnicas de FT-IR.³⁰

1.3.3 Reacción de HNO con O_2

Esta reacción, muy relevante a nivel biológico, ha generado controversias. Interesantemente, si bien el uso de cantidades controladas de trioxodinitrato ha presentado resultados benéficos en situaciones de recuperación post-isquémica,³¹ las elevadas concentraciones de HNO han causado citotoxicidad en condiciones aeróbicas,³¹ e inducen daño oxidativo del ADN.³²

En el estado fundamental, el $^3\text{NO}^-$ reacciona con O_2 para generar peroxinitrito, OONO^- .³³ Esta reacción (Ec. 1.9) es isoelectrónica a la reacción del NO con el anión superóxido (O_2^-), Ec. 1.10. Ambas reacciones presentan constantes de velocidades cercanas al valor difusional, de $2,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $4-7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente:



Sin embargo, estudios realizados por Miranda K. y cols. indican que la reacción del HNO con O₂ genera un potente oxidante de dos electrones,^{26f, 27} cuyo perfil de reacción sería distinto al del OONO⁻. En concordancia, si la descomposición aeróbica de la sal de Angeli formara peroxinitritos, por descomposición se obtendría NO₃⁻, lo cual no fue verificado. Se han realizado cálculos teóricos para predecir los potenciales productos de la reacción entre HNO y O₂.³⁴

Aunque se considera que la posible generación de oxidantes juega un papel poco probable en la bioquímica del HNO endógeno, debido a la alta reactividad y la concentración celular de otros objetivos biológicos (ej., tioles), la reacción del HNO con O₂ (cuya estequiometría aún es dudosa) sigue siendo uno de los enigmas más significativos e importantes en el campo de la química y la biología del HNO.

1.3.4 Reacción de HNO con NO[•]

La evaluación de subproductos en la obtención del ³NO⁻, por reducción de NO mediante radiólisis pulsada, mostró que a medida que se forma la especie reducida, ésta reacciona secuencialmente con el reactivo en exceso para dar N₂O₂⁻ y N₃O₃⁻. La última especie se descompone formando N₂O y NO₂⁻ (Ecs. 1.11 a 1.14).^{4a, 35} Esta reactividad excluye la posibilidad de sintetizar sales de anión nitroxilo a través de la reducción directa del NO[•], porque a medida que se forma el anión este reaccionaría rápidamente con el exceso de NO[•].



La reacción del HNO con el NO[•] (Ec. 1.14) también fue estudiada mediante flash-fotólisis del trioxodinitrato, como dador *in situ* del HNO; esta reacción presenta una constante de velocidad $k = 5,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^{4d}



Las reacciones de HNO/NO^- con NO^\bullet pueden tener interés biológico ó farmacológico, ya que ambas especies pueden estar presentes al mismo tiempo. De hecho, el nitroxilo puede ser capaz de atenuar las acciones del NO^\bullet (y viceversa).²⁷

1.3.5 Reacción de HNO con tioles

Uno de los aspectos más importantes y biológicamente relevantes de la química de HNO es su capacidad para reaccionar como electrófilo frente a tioles. El producto inicial de esta reacción es la N-hidroxisulfonamida, la cual como se ha dicho anteriormente (sección 1.2.2), puede reaccionar con exceso de tior generando hidroxilamina y el correspondiente disulfuro, o se puede reordenar y formar sulfinamida (reacción irreversible).^{19, 36} Por ejemplo, el glutatión se considera un objetivo celular primario del HNO,³⁷ aunque muchos de los productos de reacción no son fáciles de controlar o cuantificar.¹⁹ La reacción con tioles ha sido utilizada para distinguir el HNO del NO^\bullet , porque el HNO es mucho más reactivo.³⁸

1.4 Coordinación del nitroxilo en metales de transición

Se ha visto en 1.2 que la generación de HNO en las NOS's implica una coordinación del sustrato en el centro de hierro, y la subsiguiente reactividad. Esto se manifiesta también en otras enzimas y compuestos modelo. Ello evidencia la necesidad de reforzar los estudios de la química de coordinación de HNO/NO^- en metales de transición, que es un objetivo central de esta Tesis. Por ello se anticipa una breve descripción del enlace coordinativo.

1.4.1 Propiedades generales de enlace en los nitrosilos coordinados

En la sección 1.1 se han presentado las especies nitrosiladas en cualquiera de las tres formas redox (NO^+ , NO^\bullet , NO^-). En 1974, J.H. Enemark y R.D. Feltham elaboraron un formalismo para describir la naturaleza covalente de la unión del grupo nitrosilo al metal M.³⁹ Se considera la distribución electrónica total en el fragmento, $\{\text{MNO}\}$, sin definir de antemano la densidad electrónica real sobre M o NO, ni tampoco especificar

la naturaleza de los coligandos. Los complejos son clasificados como especies $\{MNO\}^n$, donde n es el número total de electrones asociados con los orbitales d del metal o con los orbitales π^* del ligando NO. Nótese que la descripción no especifica *a priori* estados de oxidación para el metal, ni para el grupo nitrosilo, aunque estos suelen usarse a título de aproximación.

Luego de resolver estructuras cristalinas en numerosos compuestos nitrosilados,⁴⁰ se ha encontrado que los fragmentos $\{MNO\}$ pueden ser lineales o angulares (Figura 1.5). Esto se racionaliza en términos del número de coordinación, del número total de electrones (n) y el ordenamiento de los orbitales moleculares (Figura 1.6).

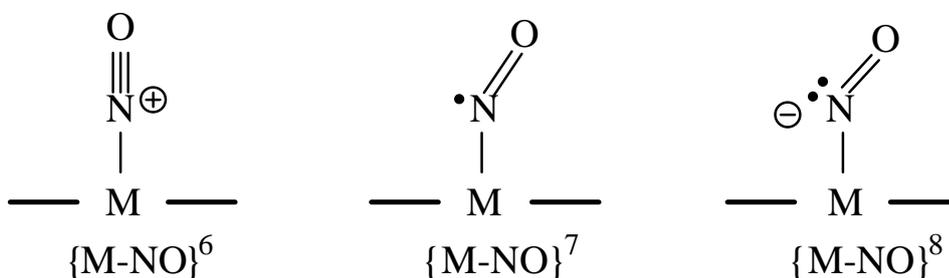


Figura 1.5 Dependencia del ángulo MNO con la configuración electrónica. Geometría lineal y angular de $\{MNO\}^n$, $n=6, 7, 8$.

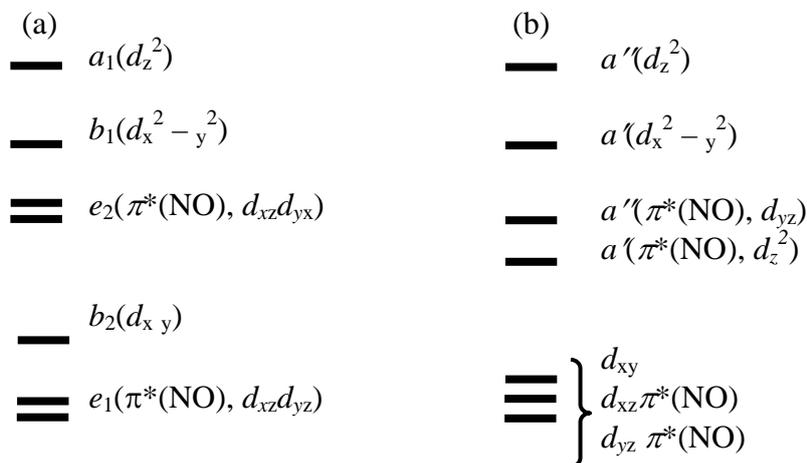


Figura 1.6 Ordenamiento de orbitales moleculares en complejos hexacoordinados $\{MNO\}^n$. a) situación lineal para $n \leq 6$ y b) situación angular $n = 7$ u 8 .

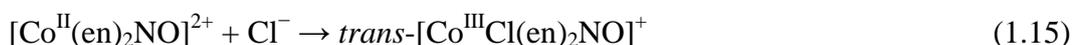
La mayoría de los complejos mononitrosilados $\{MNO\}^n$ son hexacoordinados, y son los más relevantes para este trabajo. Si el número n está entre 0 y 6, la Figura 1.6a ubica los electrones en los orbitales moleculares más bajos e_1 y b_2 , presentando una

geometría lineal (Figura 1.5). Así, para $n = 6$, se obtiene una configuración $(e_1)^4(b_2)^2(e_2)^0$. Al agregar un electrón se genera el fragmento $\{MNO\}^7$, con la configuración electrónica $(e_1)^4(b_2)^2(e_2)^1$. La eliminación de la degeneración en el orbital e guía a una nueva distribución geométrica (Figuras. 1.5b y 1.6), con un ángulo MNO menor que para $n = 6$. Finalmente, la adición de otro electrón genera el fragmento $\{MNO\}^8$, con la configuración electrónica $(e_1)^4(b_2)^2(e_2)^2$. El ángulo para esta distribución es aún menor que para $n = 7$.

En la base de este formalismo se basa la idea de que la geometría y estructura electrónica en los complejos está principalmente determinada por el fragmento $\{MNO\}^n$. Los coligandos, aunque no aparecen en esta descripción, sí determinan variaciones menores aunque significativas en la densidad electrónica de M o del grupo NO, tal como se aprecia en los valores de ν_{NO} para complejos similares con $n = 6-8$, que siguen las mismas tendencias que se aprecian en los nitrosilos libres (Tabla 1.1).

1.4.2 Complejos con el anión NO^-

Los complejos que contienen NO^- han sido estudiados en especies hexa- y pentacoordinadas.⁴⁰ Las preparaciones iniciales implicaron la adición de ligandos monoaniónicos (NCS^- , Cl^- , Br^- , etc.) a complejos $\{MNO\}^6$ pentacoordinados, generando productos que implicaban una conversión formal del fragmento $M^{II}-NO^+$ ($n = 6$) a $M^{III}-NO^-$ ($n = 8$). Esta estrategia resultó exitosa con complejos de Co(II). Una reacción representativa se muestra en la Ec. 1.15.⁴¹ Igual estrategia se aplicó a otros complejos análogos de Co^{II} con derivados de arsina (das = o-fenilenobis dimetilarsina, $C_6H_4[As(CH_3)_2]_2$).



La Tabla 1.2 incluye resultados de complejos seleccionados. Nótese que la nitrosilcobalamina (NOCbl) es hexacoordinada, mientras que la $[CoNO(oep)]$ es pentacoordinada, probablemente por la fuerte labilización *trans* inducida por el NO^- . Se incluyen en la tabla los dos únicos complejos nitroxilados de hierro caracterizados al momento: el $[Fe^{II}(cyclam-ac)NO]$ (cyclam-ac: monoanión pentadentado 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1-ácido acético), y el $[Co(C_5H_5)_2]^+[Fe(TFPPBr_8)NO]^-$

(TFPPBr₈: 2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-[Tetrakis-(pentafluorofenil)] porfirina). El primero de ellos se obtuvo por reducción electroquímica del análogo [Fe(cyclam-ac)NO]⁺ en acetonitrilo. La identificación de NO⁻ se logró por análisis IR, Mössbauer (¹⁵N y ¹⁸O), y mediante cálculos DFT.⁴²

Por su parte, Doctorovich F.A. y cols.⁴³ obtuvieron el segundo complejo a partir de la reducción monoelectrónica del [Fe(TFPPBr₈)NO], usando como reductor al cobaltoceno. El producto fue caracterizado por FT-IR, RMN ¹H y ¹⁵N, y por cálculos de DFT, confirmando inequívocamente la presencia del NO⁻, que es descrito como singlete, Fe^{II}(¹NO⁻), en el complejo. En la Tabla 1.2 se resumen los resultados alcanzados.

Complejo {MNO} ⁸	ν_{NO} (cm ⁻¹)	$d_{\text{M-N}}$ (Å)	$d_{\text{N-O}}$ (Å)	$\angle\text{MNO}$ (°)	Ref.
[Fe ^{II} NO(cyclam-ac)]	1271	1.75	1.26	122.4	⁴²
NOCl(Co ^{III} NO ⁻)		1.93	1.18	117.4	⁴⁴
Co ^{III} NO(oep)		1.84	1.16	122.7	⁴⁵
[Co ^{III} (das) ₂ (NCS)NO] ⁺	1587	1.85	1.18	132	⁴⁶
[Co ^{III} Cl(en) ₂ NO] ⁺	1611	1.82	1.043	124.4(11)	⁴¹
[Fe ^{II} (TFPPBr ₈)NO] ⁻	1547	1.79	1.20	1.23	⁴³

Tabla 1.2 Complejos de metales de transición {MNO}⁸ conteniendo NO⁻.

Como puede apreciarse en la Tabla 1.2, los valores de ν_{NO} dependen del tipo de fragmento, particularmente del número de oxidación formal del metal. Sin perjuicio del valor de los resultados anteriores, ambos complejos de hierro son insolubles en agua, limitando su relevancia bioinorgánica.

1.4.3 Complejos con HNO

Los pocos complejos con **HNO** bien caracterizados han sido preparados en su gran mayoría en medio orgánico, y suelen ser sensibles al aire y al agua, con muy baja solubilidad en este solvente. Contienen en general metales de transición d⁶ de bajo espín, principalmente de los períodos 4 a 5.

En la Figura 1.7 se muestran diversas estrategias de obtención, con una variedad de precursores. Las reacciones pueden ser oxidativas o reductivas, o bien por vía de una sustitución directa sobre el metal.

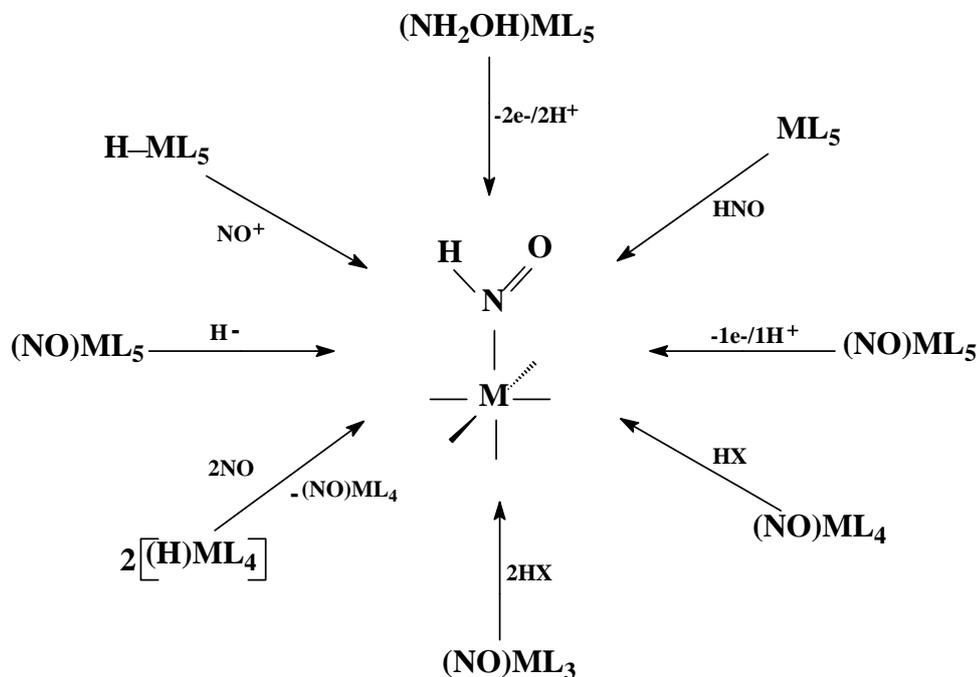
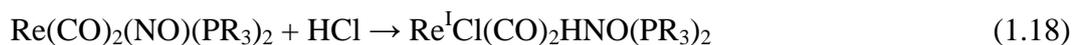
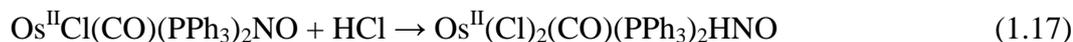


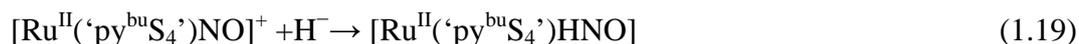
Figura 1.7 Métodos de obtención de complejos con ligando HNO. M puede ser Fe(II), Ru(II), Os(II), Ir(III), Re(I), etc.

A continuación se explicitan algunas reacciones típicas de síntesis.

En base a antecedentes de Roper R. y cols.,⁴⁷ Hillhouse G.L. y cols.,⁴⁸ aislaron y caracterizaron complejos de iridio, osmio y renio, Ecs. 1.16-1.18.⁴⁷



Sellmann D. y cols.⁴⁹ reportaron el primer complejo de rutenio, $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{'py}^{\text{bu}}\text{S}_4')\text{HNO}]$, preparado por reducción del $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{'py}^{\text{bu}}\text{S}_4')\text{NO}]^+$ mediante NaBH_4 , en metanol (Ec. 1.19).



Richter-Addo G. y cols.⁵⁰ obtuvieron la primer metaloporfirina, $[\text{Ru}(\text{ttp})(1\text{-MeIm})\text{HNO}]$ (ttp = dianión tetratolilporfirinato; 1-MeIm = 1-metilimidazol), por adición de hidruro al complejo catiónico de nitrosilo, en metanol. El aducto de HNO es moderadamente estable como sólido, pero descompone en solución de CDCl_3 bajo atmósfera de N_2 . Recientemente Doctorovich F.A. y cols.,⁵¹ sintetizaron el complejo $[\text{Ir}^{\text{III}}\text{Cl}_5\text{HNO}]^{2-}$, mediante ataque de hidruro al $[\text{IrCl}_5\text{NO}]^-$, en acetonitrilo. El complejo es estable pero tiende a labilizar el cloruro *trans* o incluso el *cis*.

También han sido evaluadas hemoproteínas comoceptoras de nitroxilo. Así, la mioglobina y la hemoglobina, ancladas a la superficie de electrodos, son capaces de reducir NO a HNO, formando compuestos estables.⁵² Esta estrategia permitió aislar un complejo de mioglobina-HNO, $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$.⁵³ El aislamiento del aducto $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$ permitió una completa caracterización espectroscópica de la unión $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-HNO}$. El aducto se obtuvo por diversas estrategias sintéticas: reducción química (Cr^{II}) o electroquímica de Mb-NO,⁵⁴ reacción de desoximioglobina con dadores de nitroxilo, como el ácido metansulfohidroxámico.⁵⁵ El aducto $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$ permitió obtener una completa descripción del enlace $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-HNO}$: se obtuvo información espectroscópica y estructural por combinación de técnicas UV-visible, FTIR, RMN ^1H , resonancia Raman y absorción de rayos X (EXAFS y XANES).⁸⁰ La alta estabilidad del complejo (escala de meses, en anaerobiosis) fue atribuida a la formación de un puente de hidrógeno entre el HNO coordinado y la histidina 64 de la cavidad distal de mioglobina, de acuerdo con los datos obtenidos por RMN ^1H .⁵⁷

En la Tabla 1.3 se muestran ejemplos de complejos de HNO con sus propiedades de enlace y espectroscópicas. Sólo se han incluidos aquellos en que se dispone de la señal de RMN para la caracterización.

Complejos con HNO n = 8	^1H RMN	ν_{NO} (cm^{-1})	$d_{\text{M-N}}$ (Å°)	$d_{\text{N-O}}$ (Å°)	$\angle\text{MNO}$ ($^\circ$)	Ref.
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{py}^{\text{bu}}\text{S}_4)\text{HNO}]$	19.56	1358 1378	1.875(7)	1.242(9)	130.0(6)	⁴⁹
$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{ttp})(1\text{-MeIm})\text{HNO}]$	13.64	1380				⁵⁰
$[\text{Re}^{\text{I}}\text{Cl}(\text{CO})_2\text{HNO}(\text{PPh}_3)_2]$	22.66	1376				⁵⁸
$[\text{Os}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2\text{HNO}]$	21.2	1410	1.915(6)	1.193(7)	136.9(6)	⁵⁹
$[\text{Ir}^{\text{III}}\text{HCl}_2(\text{PPh}_3)_2\text{HNO}]$	22.75	1493	1.879(7)	1.235(11)	129.8(7)	⁴⁸
$[\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}]$	14.8	1385	1.82	1.24	131	⁵⁶

Tabla 1.3 Complejos de HNO. Las determinaciones fueron realizadas en solventes orgánicos, a excepción de la $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$, que fue estudiada en medio acuoso.

1.5. Reactividad del nitroxilo coordinado

Los estudios de reactividad de las especies coordinadas, HNO y NO^- , estuvieron y siguen estando limitados por la disponibilidad de complejos adecuados y bien caracterizados. Aunque varios de ellos lo son, tal como surge de lo que hemos presentado anteriormente como antecedente, la relevancia biológica es limitada, pues comprenden estudios en soluciones no-acuosas. Aparte, las referencias en estos medios acerca de las reactividades son fragmentarias y no sistematizadas, aunque resulta evidente que el HNO puede convertirse a especies oxidadas (NO , NO_2^-) o reducidas (NH_2OH) manteniendo su coordinación al metal. Por ello, en esta sección no nos referiremos en detalle a los estudios de reactividad en medios no-acuosos.

Los trabajos en solución acuosa se limitan a la $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$ y a los que surgen del presente trabajo de Tesis. En función de los resultados existentes, son notorias las carencias. La más notoria es que la especie de NO^- no ha sido bien descrita todavía en solución acuosa en complejo alguno, por lo cual cualquier estudio de reactividad resulta ambiguo. Nos referimos aquí a los aspectos que consideraremos cruciales en la reactividad de ambas especies coordinadas de nitroxilo.

a) Estabilidad del ligando. En los complejos de HNO, P.J Farmer⁸⁸ ha destacado la notoria estabilidad del complejo Mb^{II}HNO, que se mantiene aparentemente inalterado durante meses en medios anaeróbicos y en el intervalo de pH 6-10. No ha sido reportada la formación de N₂O, y de ello se deduce que la constante de disociación de HNO es aún menor que $k = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C. La estabilidad del aducto Mb^{II}HNO no se ve afectada por CO, tal como se ha observado en algunos complejos de HNO en medios no-acuosos, donde aparentemente el CO o el nitrosobenceno reemplazan al HNO disociativamente.

b) Coordinación: El HNO no es estable frente a porfirinatos de Fe(III), formando Fe^{II}NO por nitrosilación reductiva.⁴³ Sin embargo, el HNO libre es atrapado por la desoximioglobina, generando una vía adicional directa para la formación de Mb^{II}HNO. Esta reacción ocurre en competencia con la dimerización del HNO.

c) Reacciones redox frente a diversos reactivos. El O₂ descompone a la Mb^{II}HNO generando met-Mb (Mb^{III}). Notoriamente, la Mb^{II}HNO es oxidada también por el metilviológeno, MV²⁺, generando Mb^{II}NO, sugiriendo que es fuertemente reductora.⁵⁴ No han sido reportadas las reacciones con otros oxidantes, ni con reductores. Hay que hacer notar que sólo muy recientemente han sido reportados estudios de reacciones redox del HNO libre.⁶⁰ En cuanto a la especie NO⁻ coordinada, surgen las mismas carencias, aunque la literatura registra el hecho de que ella sea apreciablemente más reductora que el HNO coordinado.⁶¹ Debe remarcarse que el Fe^{II}NO⁻ es un singlete,⁴³ a diferencia del ³NO⁻ libre. En cuanto a las reacción de Mb^{II}HNO frente a NO o NO₂⁻, en exceso de ambos reactivos ocurre la conversión a Mb^{II}NO. Esto ocurre en pocos minutos en atmósfera de NO, mientras que la reacción es más lenta para el NO₂⁻ y, aparentemente, resulta pH dependiente.⁵⁵

Los enunciados anteriores constituyen un importante antecedente del presente trabajo y generan expectativa acerca de los estudios de reactividad que se presentan más adelante.

1.6 Los complejos de nitroxilo a nivel biológico. Interconversiones redox

1.6.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno (N) se presenta en la naturaleza en una amplia variedad de formas químicas, que involucran estados de oxidación desde +V a -III, pudiendo aparecer tanto en materia orgánica como inorgánica. Las formas orgánicas del N están presentes en los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, humus, etc. Muchas especies de N inorgánico contienen enlaces N-O y participan de ciclos de procesos biológicos.⁶² La Figura 1.8 describe las interconversiones entre estas especies.

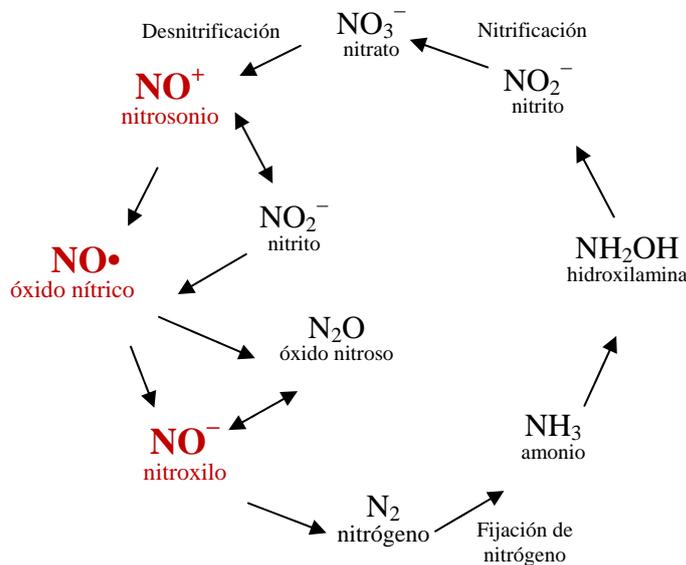


Figura 1.8 Ciclo inorgánico del nitrógeno.

Se destaca el rol de las tres especies redox del grupo nitrosilo, en el marco de su intervención en procesos que involucran la conversión de nitratos en amoníaco, o viceversa. Las diversas reacciones del ciclo son catalizadas por complejas metaloenzimas con características espectroscópicas y estructurales únicas. En las desnitrificaciones bacterianas que convierten NO_3^- en N_2 ,⁶³ se pueden distinguir 4 procesos consecutivos: 1) NO_3^- reductasa (NAR), una enzima que contiene Mo, que se transforma en NO_2^- mediante un proceso de transferencia de grupo “oxo”. 2) NO_2^- reductasa (NIR), que transforma NO_2^- en NO ; existen formas con Fe (del tipo citocromo cd_1) y con Cu. En las enzimas de hierro, el paso inicial está determinado por la coordinación del NO_2^- al Fe(II), bajo forma de NO^+ , seguida de la reducción y

subsiguiente liberación del NO. 3) óxido nítrico (NO) reductasa (NOR), que convierte NO en N₂O. 4) N₂O reductasa, que convierte N₂O en N₂. Los mecanismos que operan en los procesos redox son difíciles de dilucidar, y constituyen actualmente un área muy importante de investigación. Se han obtenido estructuras cristalinas en varias de las enzimas,⁶⁴ que han facilitado el estudio de mecanismos. Una manera de abordar esta problemática es el trabajo con modelos biomiméticos, apoyándose en determinaciones espectroscópicas diversas, estudios cinéticos, y cálculos computacionales. Precisamente, nuestro trabajo de Tesis comprende el uso de un ion complejo modelo, a partir del cual podrían verificarse transformaciones comparables a las que ocurren en las enzimas, comprendiendo a las tres especies redox-interconvertibles del fragmento {FeNO}ⁿ (n = 6, 7, 8).

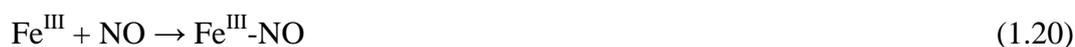
La Figura 1.8 no es completa, pues no se explicitan las diferentes especies ácido-base, y están ausentes sustancias como la hidracina, N₂H₄, que interviene en algunos procesos, por ej. en la oxidación de amoníaco a N₂.⁶³ Han sido verificados otros procesos en ciertas bacterias que conducen a la formación de NH₃ a partir de NO₃⁻ o NO₂⁻, en lugar de N₂. Uno de ellos es la llamada amonificación, con liberación del producto al medio. Otro proceso está mediado por ciertas nitrito reductasas asimilatorias de plantas y bacterias que convierten NO₂⁻ en NH₃ (proceso con 6 electrones) cuyo destino es incorporarse en rutas biosintéticas.⁶⁵ Tampoco se detallan en la Figura 1.5 las especies radicalarias que se postulan en los mecanismos de dichos procesos (NH₂[•], NHOH[•], etc).

A continuación, nos limitaremos a una breve descripción del estado actual en las investigaciones sobre el mecanismo de las NO-reductasas, pues son los sistemas más relacionados con el objetivo de este trabajo, el cual está también relacionado con la conversión de NO en NO⁻(HNO).

1.6.2 Las óxido nítrico reductasas (NOR)

Siendo el N₂O el producto de reducción monoelectrónica del NO durante la actividad enzimática, las enzimas NOR son singulares en las desnitrificaciones, por cuanto debe formarse una nueva unión N-N. Las NOR contienen hemo en su estructura y pertenecen a la familia de las citocromo-P₄₅₀s. Sin embargo, las P₄₅₀(NO_r) presentan diferencias claves respecto de las más famosas mono-oxigenasas P₄₅₀: una red de

puentes de hidrógeno que facilitarían la migración de protón y una zona de densidad de carga positiva, que funcionaría como sitio de unión del reductor NADH.⁶⁶ Mediante las estructuras cristalinas de formas salvajes y mutadas de estas P₄₅₀(NO_r), comparadas en presencia y ausencia del nucleótido reductor, se ha puesto en evidencia un cambio conformacional causado por la unión del NADH, previo a la transferencia de hidruro al sitio activo hemo-NO a través del canal de protones.⁶⁷ Esta transferencia de hidruro, que involucra la transferencia de dos electrones, no sería posible frente a un aceptor de un electrón (por ej.: el hierro hémico), sin la asistencia de otra molécula aceptora (por ej.: una flavoproteína). Sin embargo, la transferencia de hidruro de NADH o NADPH a las P₄₅₀(NO_r) no requeriría de otro aceptor redox. Se ha postulado el siguiente mecanismo de reacción para este proceso (Ecs. 1.20, 1.21 y 1.22).⁶⁸



La naturaleza del complejo intermediario ha sido propuesta en base a información espectroscópica obtenida de experimentos realizados sobre la enzima con agregado de nucleótido reductor y de un ligero exceso de NO.⁶⁹ El mecanismo propuesto contempla la distribución de densidad de carga en el complejo enzima-sustrato, según se muestra en la Figura 1.9:

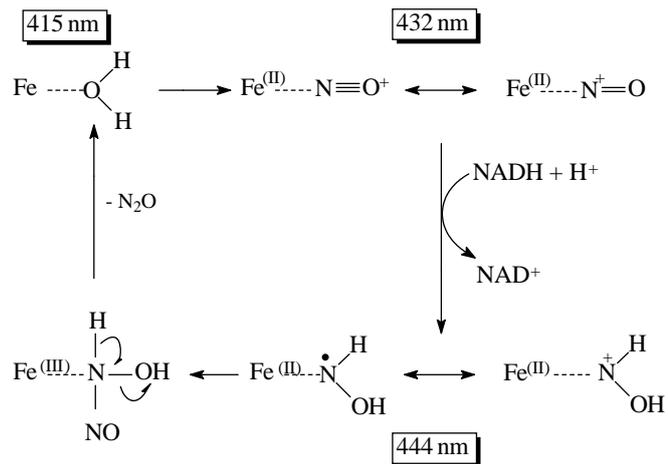


Figura 1.9 Mecanismo propuesto para el ciclo catalítico de la reducción de NO mediada por P₄₅₀(NOR), dependiente de NADH. (Falta NO –H₂O (flecha 1) y NO (flecha 5))

Para que este mecanismo resulte operativo, la matriz proteica debe proveer el entorno adecuado para acomodar al nucleótido reductor (Figura 1.10), en las proximidades del sitio activo.

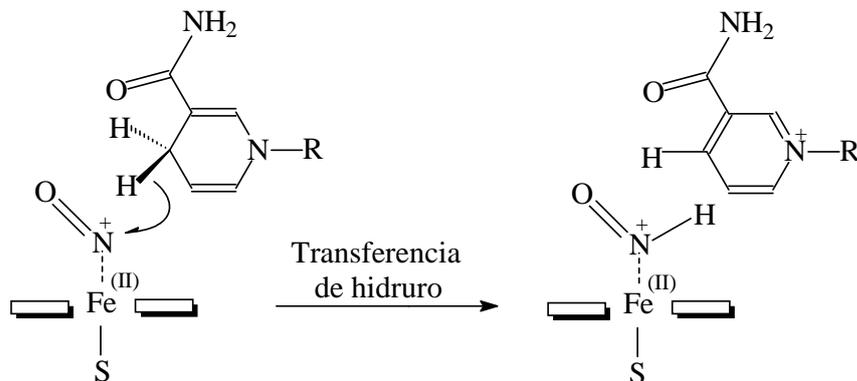


Figura 1.10 Mecanismo propuesto para la transferencia de hidruro en P₄₅₀(NOR) y formación del complejo intermediario. La transferencia de hidruro ocurre sobre una forma mesomérica del complejo Fe^{III}-NO. El complejo intermediario sería un Fe^{II}-(HNO).

En la Figura 1.10 está representada la estructura del posible intermediario Fe^{II}(HNO) obtenido por adición de hidruro a Fe^{II}NO⁺.⁶⁹ Sin embargo, a la fecha no hay evidencia directa del mismo, aunque existen estudios computacionales y modelos biomiméticos⁷⁰ que permiten evaluar su estabilidad y predecir sus propiedades espectroscópicas.⁷¹

1.6.3 La guanilato ciclasa

Estudios realizados con las tres formas nitrosiladas redox $-\text{NO}^+$, NO^\bullet y NO^- mostraron que únicamente el NO^\bullet puede activar de manera significativa a la guanilato ciclasa soluble (GCs) y provocar la relajación del músculo liso. Usando sal de Angeli y ácido bencenosulfhidroxámico como dadores de HNO/NO^- , no se observó activación de la enzima, indicando que en el medio de reacción el nitroxilo no sería oxidado a NO^\bullet .⁷²

Contrariamente, existen publicaciones recientes que señalan que el HNO podría activar el mecanismo de catálisis de la GCs, en forma adicional a la activación mediada por NO.⁷³ La activación de GCs por HNO, al igual que la activación por NO, ocurriría a través de la interacción con los grupos hemo en estado ferroso únicamente. En exceso de HNO la enzima sufriría inhibición por modificación irreversible de grupos tiol de cisteína. Otros experimentos mostraron que el reemplazo del grupo hemo por la protoporfirina IX (grupo hemo desmetalado) resulta en cierta activación, que sería atenuada por agregado de HNO.

Los resultados informados a la fecha respecto de la activación de GCs por HNO son controversiales. Hay evidencias importantes de la participación de HNO en un mecanismo regulatorio de GCs a través de interacción con grupos hemo y grupos tiol.⁷³ Estos últimos resultados colocarían al HNO en la categoría de *gasotransmisor*, al igual que el NO, el CO y el H_2S ,⁷⁴ y destacan la relevancia de comprender las características de la unión $\text{Fe}^{\text{II/III}}-\text{HNO}$.

1.7 Bibliografía

- [1] Koppenol, W.H. *Nitric Oxide* **2002**, 6, 96-98
- [2] Koppenol, W.H. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 437-476.
- [3] Connelly, N.G.; Damhus, T. *Nomenclature Of Inorganic Chemistry*. Iupac Royal Society Of Chemistry, **2005**, 300
- [4] a) Gratzel, M.; Taniguchi, S.; Henglein, A. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1970**, 74, 1003-1010; b) Seddon, W.A.; Fletcher, J.W.; Sopchyshyn, F.C. *Can. J. Chem.* **1973**, 51, 1123-1130; c) Bartberger, M.D.; Fukuto, J.M.; Houk, K.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2001**, 98, 2194-2198; d) Shafirovich, V.; Lyman, S.V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 7340-7345.
- [5] a) Dalby, F.W.; *Can. J. Phys.* **1958**, 36, 1336-1371; b) Clough, P.N.; Thrush, B.A.; Ramsay, D.A.; Stamper, J.G. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, 23, 155-156. c) Johns, J.W.C.; McKellar, A.R.W. *J. Chem. Phys.* **1977**. 66, 1217-1224.

- [6] a) Janaway, G.A.; Zhong, M.; Gatev, G.G.; Chabinye, M.L.; Brauman, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11697–11698, b) Janaway, G.A.; Brauman, J.I. *J. Phys. Chem. A.* **2000**, *104*, 1795–1797.
- [7] a) Brown, H.W.; Pimentel, G.C. *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 883–888; b) Dalby, F. *J. Phys.* **1968**, *23*, 136–143; c) Maier, G.; Reisenauer, H.P.; De Marco, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 108–110
- [8] a) Bruna, P. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *67*, 109–114, b) Guadagnini, R.; Schatz, G.C.; Walch, S.P.; *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 774–783; c) Luna, A.; Merch, M.; Srn, B.; Roos, O. *Chem. Phys.* **1995**, *196*, 437–445.
- [9] Stamler J.S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. *Science.* **1992**, 258.1898–1902
- [10] Richter-Addo/Legdizins, p.3
- [11] Angeli, A. *Gazz. Chim. Ital.* **1903**, *33*, 245.
- [12] Harteck, P., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, *66*, 423.
- [13] Cheskis, S.G.; Sarkisov, O.M.; *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *62*, 72
- [14] a) Stanbury, D.M. *Adv. Inorg. Chem.* **1989**, *33*, 69–138, b) Koppenol, W. H. *Methods Enzymol.* **1996**, *268*, 7–12.
- [15] a) Hobbs, A.J.; Fukuto, J.M.; Ignarro, L.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* **1994**, *91*, 10992–10996; b) Schmidt, H.H.; Hofmann, H.; Schindler, U.; Shutenko, Z.; Cunningham, D.; Feelisch, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 14492–14497; c) Adak, S.; Wang, Q.; Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33554–33561.
- [16] Wei, C.C.; Crane, B.R.; Stuehr, D.J. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2365–2383.
- [17] Ishimura, Y.; Gao, Y.T.; Panda, S.P.; Roman, L.J. Masters, B.S.; Weintraub, S.T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 543–549.
- [18] Cho, J.Y.; Dutton, A.; Miller, T.; Houk, K.N.; Fukuto, J.M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *417*, 65–76.
- [19] Wong, P.S.Y.; Hyun, J.; Fukuto, J.M.; Shirota, F.N.; DeMaster, E.G.; Nagasawa, H.T. *Biochemistry.* **1998**, *37*, 5362–5371.
- [20] a) Vidrio, H.; Medina, M. *Journal of Neural Transmission* **2007**, *114*, 863–865. b) Bonner, F.T.; Dzelzkalns, L.S.; Bonucci, J.A. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2487–2494.
- [21] Murphy, M.E.; Sies, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 10860–10864
- [22] Zhao, X.-J.; Sampath, V.; Caughey, W.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 1054–1060.
- [23] Poderoso, J.J.; Carreras, M.C.; Schopfer, F.; Lisdero, C.L.; Riobo, N.A.; Giulivi, C.; Boveris, A.D.; Boveris, A.; Cadenas, E. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 925–935.
- [24] Niketic, V.; Stojanovic, S.; Nikolic, A.; Spasic, M.; Michelson, A. M. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *27*, 992–996.
- [25] Saleem, M.; Ohshima, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 455–462
- [26] a) Benderskii, V.A.; Krivenko, A.G.; Ponomarev, E.A.; *Elektrokhimiya* **1990**, *26*, 318–325; b) Bartberger, M.D.; Ford, W.; Liu, E.; Miranda, K.M.; Switzer, C.; Fukuto, J.M.; Farmer, P.J.; Wink, D.A. Houk, K.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 10958–10963.; c) Stanbury, D.M. *Advances in Inorganic Chemistry* **1989**, *33*, 69–138. f) Miranda, K.M. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 433–455.
- [27] Fukuto, J.M.; Switzer, C.H.; Miranda, K. M.; Wink, D.A. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 3 35–355.
- [28] Kohout, F.C.; Lampe, F.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5795–5796.
- [29] Bazylnski, D.A.; Hollocher, T.C. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 4285–4288

- [30] a) Fukuto, J.M.; Jackson, M.I.; Kaludercic, N.; Paolocci, N. **2008**, *440*, 411-431; b) Boron, I.; Suárez, S.; Doctorovich, F.; Martí, M.; Bari, S.E. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1044-1049.
- [31] a) Choe, C.; Lewerenz, J.; Fischer, G.; Uliasz, T.; Espey, M.; Hummel, F.; King, S.; Schwedhelm, E.; Böger, R.; Gerloff, C.; Hewett, S.; Magnus, T. Donzelli, S. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1766-1773. b) Wink, D.A.; Feelish, M.; Fukuto, J.; Chistodoulou, D.; Jourdeuil, D.; Grisham, M.B.; Vodovotz, Y.; Cook, J.A.; Krishna, M.; Degraff W.G.; Kim, S.; Gamson J.; Mitchell B. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *351*, 66-674
- [32] Ohshima, H.; Gilibert, I.; Bianchini, F. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1305-1313.
- [33] Donald, C.E.; Hughes, M.N.; Thompson, J.M.; Bonner, F.T. *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2676-2677.
- [34] Guardia, C.M.; González, M.C.; Bari, S.E.; Estrin, D.A. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *463*, 112-116
- [35] a) Seddon, W.A.; Fletcher, J.; Sopchyshyn, F. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 1123-30. b) Seddon, W.A. *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 393-394.
- [36] Shoeman, D.; Nagasawa H. *Nitric Oxide* **1998**, *2*, 66-72.
- [37] Liochev, S.I.; Fridovich, I. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 1399-1404
- [38] Pino, R.; Feelisch, M. *Bioch. And Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 54-62.
- [39] Enemark, J.H.; Feltham, R.D. *Coord. Chem. Rev.* **1974**, *13*, 339-406
- [40] Feltham, R.D.; Enemark, J.H. *Topics Inorg. Organomet. Stereochem.* **1981**, *12*, 155-215.
- [41] Snyder, D.A.; Weaver, D.L., *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 2760-2767.
- [42] García, R.; Grapperhaus, C.A.; Bothe, E.; Bill, E.; Weyhermuller, T.; Neese, F.; Wieghardt, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5138-5153.
- [43] Pellegrino, J.; Bari, S.E.; Bikiel, D.; Doctorovich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 989-995.
- [44] Hannibal, L.; Smith, C. A.; Jacobsen, D. W.; Brasch, N. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5140-5143.
- [45] Ellison, M.K.; Scheidt, W.R. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 382-383
- [46] Enemark, J. H.; Feltham, R. D.; Riker-Nappier, J.; Bizot, K. F. *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 624-632
- [47] Roper, W.R.; Grundy, K.; Reed, C.A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1970**, 1501-1502.
- [48] Melenkivitz, R.; Hillhouse, G.L.; *Chem. Commun.* **2002**, 660-661.
- [49] Sellmann, D.; Gottschalk-Gaudig, T.; Haussinger, D.; Heinemann, F.W.; Hess, B.A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2099-2103.
- [50] Lee, J.; Richter-Addo, G.B. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1247-1250.
- [51] Escola, N.; Bikiel, D. E.; Baggio, R.; Di Salvo, F. Doctorovich, F. *Inorg. Chim. Acta.* **2011**, *374*, 528-539.
- [52] a) Lin, R.; Bayachou, M.; Greaves, J.; Farmer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12689-12690; b) Farmer, P.J.; Lin, R.; Bayachou, M. *Comm. Inorg. Chem.* **1998**, *20*, 101-120; c) Mimica, D.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *497*, 106-113, d) Zhou, Y. L.; Hu, N. F.; Zeng, Y. H.; Rusling, J. F. *Langmuir* **2002**, *18*, 211-219; e) Huang, R.; Hu, N. F. *Biophys. Chem.* **2003**, *104*, 199-208; f) Huang, R.; Hu, N. F. *Bioelectrochemistry* **2001**, *54*, 75-81; g) Liu, H.Y.; Wang, L.W.; Hu, N.F. *Electrochim. Acta* **2002**, *47*, 2515-2523.

- [53] Bayachou, M.; Lin, R.; Cho, W.; Farmer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9888-9893.
- [54] Lin, R.; Farmer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2393-2394.
- [55] Sulc, F.; Immoos, C.E.; Pervitsky, D.; Farmer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1096-1101.
- [56] Farmer, P.J.; Sulc, F. *J. Inorg Biochem.* **2005**, *99*, 166-184.
- [57] Sulc, F.; Ma, D.; Fleisher, E.; Farmer, P. J.; La Mar, G. N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 348-352.
- [58] a) Lamonica, G.; Freni, M.; Cenini, S.J.; *Organomet. Chem.* **1974**, *71*, 57-64 (b) Southern, J.S.; Green, M.T.; Hillhouse, G.L.; Guzei, I.A.; Rheingold, A.L. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6039-6046
- [59] Wilson, R.D.; Ibers, J.A. *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 336-343.
- [60] Jackson, M.L. *et al. Free. Rad. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1130-1139.
- [61] Miranda, K.M. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 433-455.
- [62] Chameides, W.L. *The Earth's Electrical Environment. Commission on Physical Sciences, Mathematics, and Applications (CPSMA)*. National Academies Press, 1986. Cap. 6, pag. 70-80.
- [63] Kartal, B.; Maalcke, W.J.; de Almeida, N.M.; Cirpus, I.; Gloerich, J.; Geerts, W.; Op den Camp, H.J.; Harhangi, H.R.; Janssen-Megens, E.M.; Francoijs, K.J.; Stunnenberg, H.G.; Keltjens, J.T.; Jetten, M.S.; Strous, M. *Nature*. Publicado en línea, Octubre **2011**.
- [64] Einsle, O.A.; Kroneck, P.M. *Biological Chemistry.* **2004**, *385*, 875-883.
- [65] Brittain, T.; Blackmore, R.; Greenwood, C.; Thomson, A. *J. Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 793-802.
- [66] a) Shimizu, H.; Park, S.; Lee, D.; Shoun, H.; Shiro, Y. *J Inorg Biochem.* **2000**, *81*, 191-205; b) Shimizu, H.; Park, S.Y.; Shiro, Y.; Adachi, S. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **2002**, *58*, 81-89.
- [67] Oshima, R.; Fushinobu, S.; Su, F.; Zhang, L.; Takaya, N.; Shoun, H. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 207-217.
- [68] Shimizu, H.; Obayashi, E.; Gomi, Y.; Arakawa H.; Sam- Yong P.; Nakamura, H.; Adachi, S. I.; Shoun, H.; Shiro, Y. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4816-4826.
- [69] Daiber, A.; Shoun, H.; Ullrich, V. *J. Inorg Biochem.* **2005**, *99*, 185-193.
- [70] Suzuki, N.; Higuchi, T.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Uchida, T.; Mukai, M.; Kitagawa, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12059-12060.
- [71] Lehnert, N.; Praneeth, V.K.; Paulat, F. *J. Comp. Chem.* **2006**, *27*, 1338-1351.
- [72] Dierks, E.A.; Burstyn, J.N. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 1593-1600.
- [73] Miller, T.W.; Cherney, M.M.; Lee, A. J.; Francoleon, N.E.; Farmer, P.J.; King, S.B.; Hobbs, A.J.; Miranda, K.M.; Burstyn, J.N.; Fukuto, J.M. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21788-21796.
- [74] Mustafa, A.K.; Gadalla, M.M.; Snyder S.H. *Sci. Signal.* **2009**, *2*, 68.

Capítulo 2

*Reducción del $[Fe^{II}(CN)_5NO]^{2-}$
por 2 electrones: Formación de nitroxilo
coordinado*

En este capítulo se presenta la preparación y caracterización de un nuevo complejo nitroxilado, utilizando la plataforma pentacianoferrato(II). Resulta conveniente anticipar las propiedades del reactivo utilizado, el ion nitroprusiato, cuya química es bastante conocida, y en el cual se ha previsto la reducción por 2 electrones del grupo NO^+ (nitrosonio).

2.1 Propiedades del ion nitroprusiato, $[Fe^{II}(CN)_5NO]^{2-}$

Este ion complejo pertenece al grupo $\{FeNO\}^6$, y formalmente contiene Fe(II) y el ligando NO^+ (nitrosonio). Por ende, es un interesante punto de partida para explorar la reducción del NO^+ , que en general puede lograrse por vía química o electroquímica, y en cuyo proceso se acepta que los electrones se alojan en orbitales antiligantes vacantes, conduciendo a reducciones predominantemente centradas en el nitrosilo.¹

El ion nitroprusiato (NP) es una droga comercial, que se sintetiza en el laboratorio mediante reacción de hexacianoferrato(II) con ácido nítrico. Es soluble en medios orgánicos o en agua, dependiendo del contraión. La sal sódica (SNP) tiene un lugar especial entre los complejos nitrosilados de hierro, como agente hipotensor altamente eficaz,² lo cual se atribuye a su acción dadora de NO. El NO activa la guanilato ciclasa en el músculo liso vascular mediante coordinación al Fe(II) de la enzima y labilización de su histidina *trans*; ello provoca aumento de la producción intracelular de cGMP, y relajación de la musculatura lisa de los vasos, con la consecuente vasodilatación.³ Los conocimientos adquiridos en la última década sobre la participación de la especie HNO/NO^- en la activación de la GCs, o en procesos metabólicos, así como sobre las características de la conversión de HNO en NO libres o coordinados, indican que la potencial formación de HNO a partir del suministro farmacológico de nitroprusiato resulta un tópico de interés.

El NP es notoriamente inerte respecto a la labilización térmica del NO^+ , pues la unión $Fe^{II}-NO^+$ es muy fuerte. Por ello, la actividad dadora del SNP presupone que debe haber una reducción del NO^+ coordinado a NO, seguida por la disociación de éste del Fe. Estas reacciones han sido estudiadas *in vitro*, y efectivamente el SNP reacciona con diversos reductores (Cr(II), tiolatos, HS^- , ditionito, etc.), siendo que el producto $[Fe^{II}(CN)_5NO]^{3-}$ (caracterizado por EPR e IR) puede disociar NO ($k \approx 10^{-5} s^{-1}$).¹

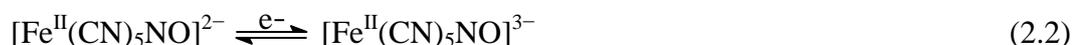
Notoriamente, la reducción del NP y posterior liberación de NO al medio ocurre fácilmente en presencia de luz visible-UV cercana, según la Ec. 2.1.

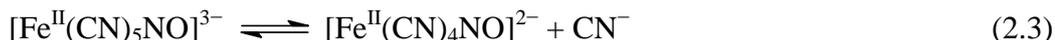


Esta reacción implica un proceso de transferencia de electrones intramolecular, con oxidación del metal y reducción de NO^+ . La formación de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}$ en el estado excitado facilita la rápida liberación de NO.⁴

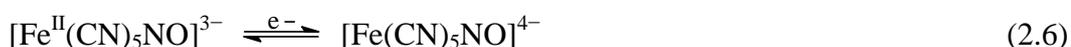
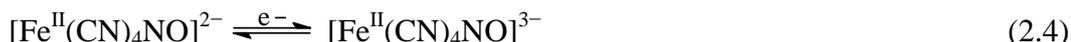
El carácter electrofílico del grupo $\{\text{FeNO}\}$ ⁶ en el NP facilita la reacción con varias especies nucleofílicas como el ion hidróxido,⁵ aminas,⁶ carbaniones,⁷ y tioles.⁸ Las reacciones con tioles son bastante rápidas ($k \approx 3-4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁸ En general, implican la adición del nucleófilo al grupo $\{\text{MNO}\}$, con posterior descomposición del aducto y eventual oxidación del nucleófilo. El principal producto de estas reacciones de adición/descomposición es el ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$, que presenta una enorme versatilidad sintética, pues debido a la labilidad del agua, puede generar una variedad de complejos estables del tipo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{n-}$ con ligandos $\text{L} = \text{NO}^+$, NO , NH_3 , py , pz , CN^- , NO_2^- , CO , etc. Muy importante es también el hecho de poder oxidar el Fe en estos complejos, generando los análogos $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{L}]^{(n-1)}$.¹ Así se comprende que aspiremos a generar el nuevo ligando NO^- (o HNO) en estos sistemas, contextualizando nuestro principal blanco de estudio. Es de notar que varios de los ligandos L que se estabilizan en la plataforma de pentacianoferrato son de directo interés en las interconversiones redox en los ciclos naturales.

Se han publicado muchos trabajos sobre la reducción electroquímica (polarografía, voltamperometría cíclica, coulombimetría) del SNP en soluciones acuosas.⁹ Empleando un cátodo de mercurio, se observaron dos reducciones sucesivas reversibles: para $-0,16 \text{ V}$ (NHE) a $\text{pH} > 6,5$, y para $-0,35 \text{ V}$, seguidas por una reducción irreversible multielectrónica en $-0,76 \text{ V}$ y otra a potenciales más negativos en $-1,1 \text{ V}$.⁹ El proceso que ocurre a $-0,16 \text{ V}$ a $\text{pH} > 6,5$ corresponde a la reducción por un electrón (Ec. 2.2). A $\text{pHs} < 6,5$ el potencial cambia porque el producto labiliza cianuros (Ec. 2.3)





Las demás ondas han sido asociadas con las reacciones 2.4 y 2.5 (potenciales a $-0,35$ V a $-0,76$ V). Esta última corresponde a un proceso de reducción por dos electrones. Finalmente la onda monoeléctronica centrada en $-1,1$ V se asocia a la Ec. 2.6.



Estos estudios electroquímicos presentan resultados complejos y difíciles de interpretar aisladamente. Complementando con estudios espectroscópicos, puede mostrarse que el producto de reducción por un electrón, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, es una especie estable a $\text{pH} > 9$.¹⁰ Sin embargo, a pHs menores, se genera una fracción creciente de la especie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_4\text{NO}]^{2-}$, pues existe un equilibrio entre las especies hexa- y pentacoordinada (Ec. 2.3). La especie generada por reducción de 2 electrones ha sido caracterizada ambiguamente, pero constituyó un antecedente valioso para nuestro actual trabajo.⁹ También se propuso la formación de un producto de reducción del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ por cuatro electrones, el ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NH}_2\text{OH}]^{3-}$, el cual ha sido reportado previamente por Olabe J.A. y cols.¹¹

Olabe J.A, Estrín D. y cols. predijeron teóricamente las propiedades espectroscópicas de la especie reducida por dos electrones.¹² Los espectros IR y UV de las especies estables $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$, fueron calculados usando técnicas DFT y ZINDO/S, respectivamente. El espectro UV-visible para el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ predice un valor para la banda MLCT ($\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$) de 460 nm. Las bandas FTIR se calculan en un rango entre 1338 y 1394 cm^{-1} para las ν_{NO} y entre 1955 y 2018 cm^{-1} para las ν_{CN} . Estos resultados teóricos impulsaron la elaboración de la estrategia experimental de este trabajo de Tesis.

2.2 Ensayos preliminares

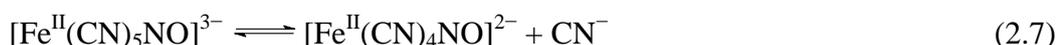
El punto de partida de los estudios de reducción del NP fue la observación directa y espectroscópica de la reacción frente al reductor ditionito ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$), en solución acuosa de pH 4 a 13 (Figura 2.1). La imagen muestra lo que se observa al completar el agregado de reactivo en cada caso.



Figura 2.1 Reducción del anión nitroprusiato con ditionito de sodio (1:1, relación molar) en ausencia de oxígeno, a pH 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13, de izquierda a derecha

La Figura 2.1 muestra soluciones de color azul o verde a pH 4 y 5. Entre pH 7-12, las soluciones presentan un máximo de intensidad variable en 445 nm. A pH 13, el agregado de ditionito lleva a la completa decoloración de la solución ($\lambda_{\text{max}} = 394 \text{ nm}$) del anión NP.

La reacción observada a pHs 4 y 5 ha sido muy bien caracterizada anteriormente,¹⁰ y responde a la descomposición del producto de reducción por un electrón del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$. El ligando NO de la especie reducida $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ induce la labilización del ligando CN^- en posición *trans*, formando la especie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_4\text{NO}]^{2-}$, de color azul. (Ec. 2.7).

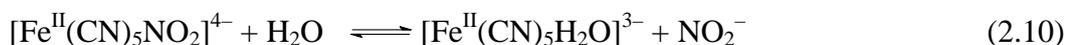


Las concentraciones relativas de las especies $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_4\text{NO}]^{2-}$ en solución acuosa son dependientes del pH.¹³ A pH ácido ($\text{pH} \ll 5$) la especie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_4\text{NO}]^{2-}$ es la predominante; su formación se debe a la eliminación de cianuro por protonación (Ec. 2.8).



A pH >8, predomina la especie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ en el equilibrio 2.7.

A pH 13, se obtuvo una solución incolora. Esto se debe a que el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ adiciona OH^- a este pH y forma el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}_2]^{2-}$ (Ec. 2.9) que se acuatiza según la Ec 2.10.⁵



El espectro de absorción del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ muestra un máximo de baja intensidad ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$, $\varepsilon = 640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

A $7 < \text{pH} < 12$ se observó la formación de un máximo en $\lambda = 445 \text{ nm}$. A pH 10 se obtuvo la máxima absorción, y una rápida descomposición que llevó sucesivamente a la obtención de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, y NP. A pH 7-8 se obtuvo un rendimiento 15-20% menor que a pH 10 en la formación del nuevo **P₄₄₅**; sin embargo, la estabilidad del complejo **P₄₄₅** resultó significativamente más alta que a pH alcalino, sin detectarse la descomposición oxidativa. Por su parte a pH 12 se formó sólo una pequeña cantidad del **P₄₄₅**, ya que a este pH operan también las Ecs 2.9 y 2.10.

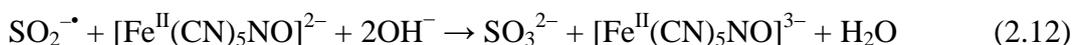
Dado que se advirtió que la reacción 2.7 disminuía el rendimiento de reacción,¹⁰ se realizaron ensayos a pH 10 con el agregado de cantidades variables de cianuro (CN^- /NP= 5:1, 20:1, 100:1, y en ausencia de cianuro). Los rendimientos máximos se obtuvieron con agregados de 5 a 20 veces de cianuro, respecto del NP. Cantidades mayores (100:1) condujeron a la formación de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$.

El rendimiento en la obtención del complejo **P₄₄₅** se vio favorecido por el agregado de un agente quelante, el EDTA (ácido etilendiaminotetracético). El EDTA, además de atrapar iones Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en la solución acuosa, atrapa otros iones metálicos (M^{n+}) provenientes de la descomposición térmica del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$, que se forma por la labilización del ligando NO del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$.

Estos ensayos preliminares permitieron elaborar un protocolo óptimo de obtención del **P₄₄₅** para abordar estudios de caracterización cuyos detalles experimentales se incluyen en el capítulo 5.

2.3 Estequiometría de la reacción de reducción del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$

El ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, SDT) es un reductor de dos electrones. Por ejemplo, frente a oxidantes monoelectrónicos (*viz.*, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$), su estequiometría de reacción es $[\text{S}_2\text{O}_4^{2-}]/[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}] = 1:2$.¹⁴ En este trabajo hemos verificado una estequiometría similar para la reacción con el ion NP, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, lo cual es consistente con el mecanismo postulado para la acción reductora del ditionito, Ecs. 2.11-2.12:



La Ec. 2.12 y la Figura 2.2 revelan la reducción monoelectrónica del NP, generando $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ ($\lambda_{\text{max}} = 348 \text{ nm}$ y 440 nm , $\epsilon = 3.5 \times 10^3$ y $5.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente),¹⁰ con un rendimiento del 90%. Es de notar que desde el comienzo de esta reacción se observó una ligera absorción en 445 nm , que luego decayó frente al agregado del resto de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, hasta que la especie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ alcanzara su máximo de absorción. Este hecho sugiere y anticipa que el $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ podría reducir por 2 electrones al inicio (445 nm), produciéndose rápidamente una comproporción del producto con el NP aun en exceso, generando el complejo de NO, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$. De ahí que se explorara la posibilidad de que $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ pudiera ser adicionalmente reducido por un exceso de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, visto que éste es un reductor fuerte. Efectivamente, la Ec. 2.13 y la Figura 2.3 muestran que el segundo equivalente convierte al $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ en una solución de color rojo anaranjado con $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$, que provisoriamente identificaremos como **P₄₄₅**.

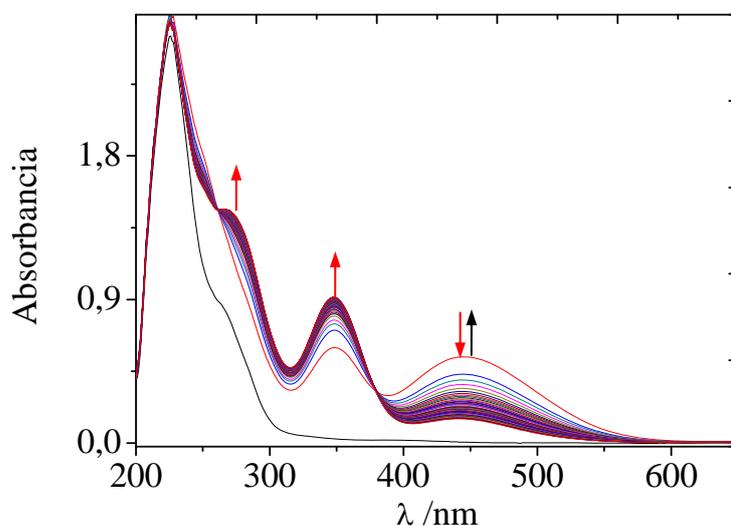
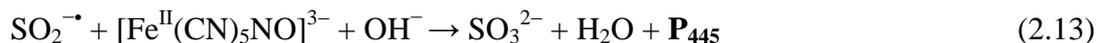


Figura 2.2 Espectros UV-visible durante el agregado del primer equivalente de reducción a la solución de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$. Formación de \mathbf{P}_{455} como intermediario y obtención de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$. $[\text{NP}] = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{CN}^-] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH 10; buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1\text{M}$ (NaCl); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

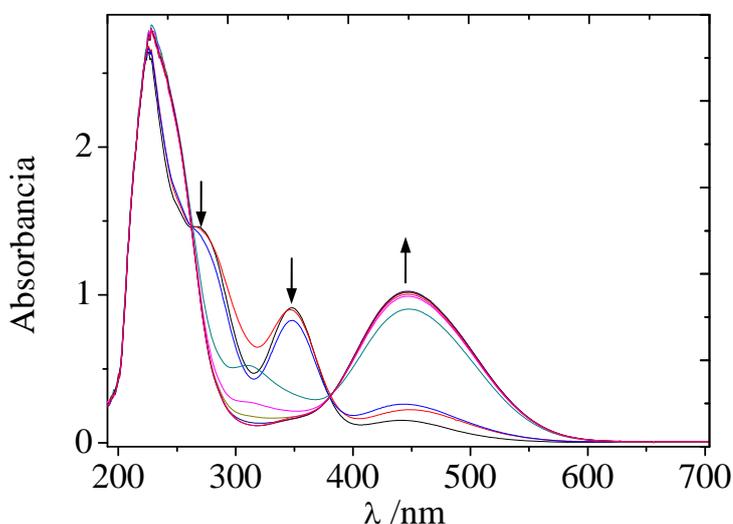


Figura 2.3 Espectros UV-visible durante el agregado del segundo equivalente de reducción a la solución de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$. Formación de \mathbf{P}_{455} . $[\text{NP}] = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{CN}^-] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH 10; buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1\text{M}$ (NaCl). $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

El complejo \mathbf{P}_{445} no resultó estable a pH 10. Por ello, una vez alcanzado el máximo de absorción en 445 nm se llevó rápidamente a pH 6-7 por agregado de HCl, lográndose una notable estabilización del mismo máximo en 445 nm. Previamente a

este agregado se añadió un ligero exceso de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ (5%), para mantener el ambiente reductor durante el cambio de pH y asegurar el máximo rendimiento en este paso clave. El exceso de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ se pone en evidencia por su absorbancia característica a 315 nm. Esta operación se visualiza en el espectro de la Figura. 2.4.

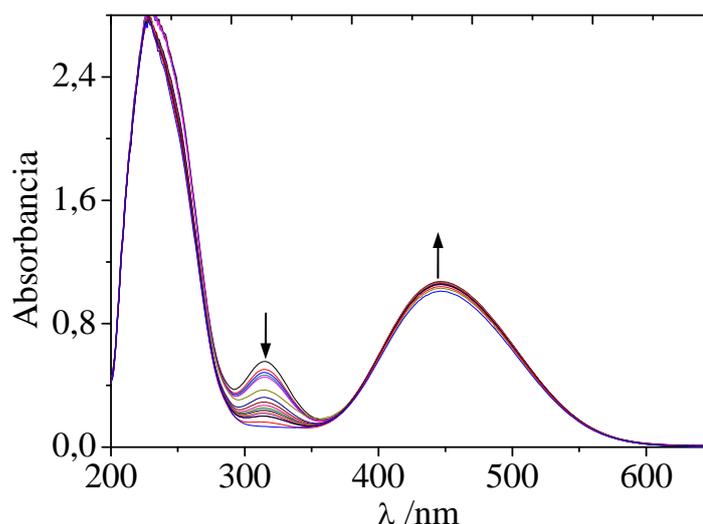
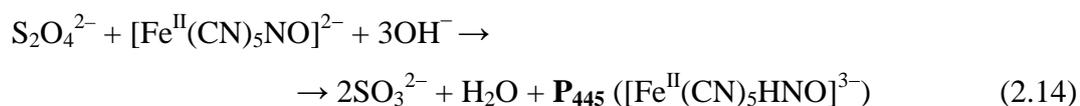


Figura 2.4 Espectros UV-visible que muestran la adición de un 5% de reductor. Formación de \mathbf{P}_{455} . $[\text{NP}] = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{CN}^-] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH 10; buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1\text{M}$ (NaCl). $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

De esta manera se obtuvieron los mejores rendimientos de \mathbf{P}_{445} , expresados por las absorbancias máximas a 445 nm. En consecuencia, la estequiometría de la reacción global de formación de \mathbf{P}_{445} queda expresada por la Ec. 2.14, y la Figura 2.5:



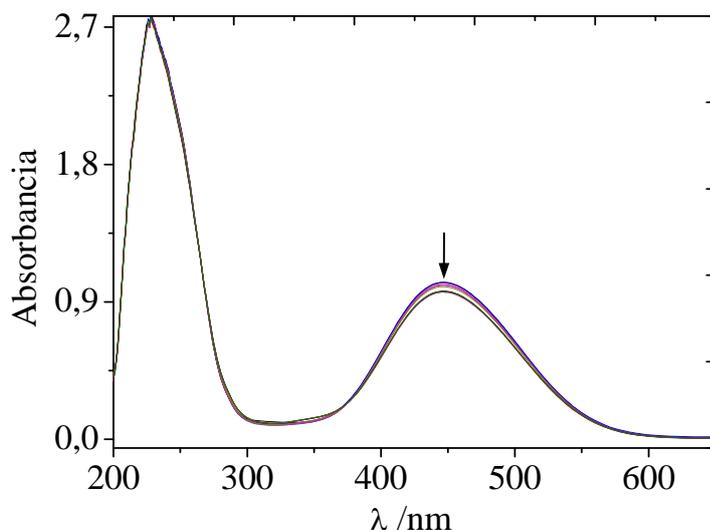


Figura 2.5 Espectros UV-visible que muestran la adición de HCl. $[\mathbf{P}_{445}] = 2,5 \times 10^{-4}$ M; $[\text{CN}^-] = 1,25 \times 10^{-3}$ M; pH 6-7; buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1$ M (NaCl). $T = 25,0$ °C.

En definitiva, y dado que el $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ y el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ reaccionan en relación molar 1:1 para formar la especie \mathbf{P}_{445} , podemos asignarla tentativamente como un miembro de la serie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{n-}$, donde L sería HNO, o eventualmente NO^- .

2.4 Caracterización espectroscópica de \mathbf{P}_{445}

2.4.1 RMN ^1H

En la Figura 2.6 se muestra el espectro de RMN ^1H (500MHz, solvente $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 75:25$) del complejo \mathbf{P}_{445} a pH 6, en el cual se aprecia una señal singlete a $\delta = 20,02$ ppm. Esta puede atribuirse al protón del grupo nitroxilo, HNO, sobre la base de haber identificado resonancias similares de protones a campos bajos para otros complejos metálicos que inequívocamente contienen este ligando (Tabla 2.1).¹⁵ Para confirmar la asignación anterior, se ha utilizado nitroprusiato enriquecido con ^{15}N , $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5^{15}\text{NO}]^{2-}$, como reactivo (Figura 2.6). El espectro de RMN ^1H del producto de reducción de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5^{15}\text{NO}]^{2-}$ mostró un doblete cuyo centro estaba ligeramente desplazado de la posición del singlete. La constante de acoplamiento medida es $J_{\text{N-H}} = 71,14$ Hz.

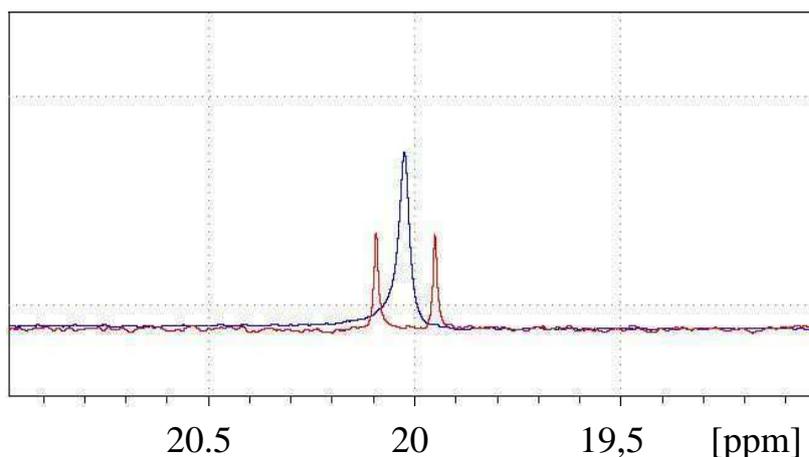


Figura 2.6 Espectro de RMN ^1H del complejo P_{445} obtenido a partir $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ en abundancia natural y enriquecido $[\text{Fe}(\text{CN})_5^{15}\text{NO}]^{2-}$. $[\text{P}_{445}] = 2,8 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{CN}^-]_{\text{inicial}} = 0,056 \text{ M}$; pH 6; buffer PO_4^{3-} 0,03 M; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl). $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fragmento que contiene el HNO	RMN ^1H		Ref.
	δ (ppm)	$J_{\text{N-H}}$ (Hz)	
$[\text{Ir}^{\text{III}}\text{HNO}(\text{H})(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$	22,75	77,6	16
$[\text{Os}^{\text{II}}\text{HNOCl}_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2]$	21,20	75	17
$[\text{Re}^{\text{I}}\text{HNOCl}(\text{CO})_2(\text{PPh}_3)_2]$	20,66	66,2	18
P_{445}	20,02	71,14	Este trabajo, 19
$[\text{Ru}^{\text{II}}\text{HNO}(\text{py}^{\text{bu}}\text{S}_4)]$	19,56	72,5	20
$\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$	14,80	72	21

Tabla 2.1 Complejos con HNO como ligando: comparación de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento entre ^{15}N y ^1H .

El valor de la constante $J_{\text{N-H}}$ está en el rango esperado para un protón que se une a un N con hibridación sp^2 , el cual está coordinado a un metal de transición. Dicho valor es similar al de otros complejos pseudo-octaédricos de metales de transición que tienen en su estructura al ligando HNO. Se incluyeron en la Tabla 2.1 los valores para el complejo de HNO con la mioglobina, $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$.²¹

El desplazamiento observado en el hidrógeno del complejo de nitroxilo P_{445} se debe a que el centro metálico retira densidad electrónica del entorno electrónico que

rodea al protón, quedando el átomo de hidrógeno menos protegido. La consecuencia es que el protón resuena a un campo magnético menor, o sea con alto valor de desplazamiento químico. Debe notarse que el valor de desplazamiento químico reportado para el protón de nitroxilo del complejo $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$ es inferior a los restantes y cercano al de un porfirinato de $\text{Ru}-\text{HNO}$,²² posiblemente por el apantallamiento del ligando porfirínico sobre el entorno del protón observado. Los experimentos de RMN ^1H proveen una evidencia concluyente que el ligando L coordinado al fragmento $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5]^{3-}$ contiene el grupo HNO, discriminando así respecto a la posibilidad que esté presente el nitroxilo desprotonado, NO^- . En adelante, como se indica en la Tabla 2.1, identificaremos a **P₄₄₅** como el ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$.

2.4.2 FTIR / ATR

2.4.2.1 Espectros FTIR/ATR en solución

Los espectros ATR/FTIR de **P₄₄₅** en abundancia isotópica natural, muestran que al completar el agregado de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ (1:1mol) se observa la desaparición de las frecuencias de estiramiento características del ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ ($\nu_{\text{NO}} = 1938 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{CN}} = 2143 \text{ cm}^{-1}$),²³ en paralelo con la formación de nuevas bandas en 1384 y 2086/2040 cm^{-1} . Al marcar con ^{15}N se observó un corrimiento del pico de 1384 \rightarrow 1352 cm^{-1} (Figura 2.6). Este corrimiento isotópico de $\approx -30 \text{ cm}^{-1}$ apoya su asignación al estiramiento ν_{NO} . El valor concuerda con las frecuencias reportadas para otros complejos similares del tipo $[\text{M}^{\text{II}}\text{X}_5\text{HNO}]^x$ (Tabla 2.2),^{13, 24, 16, 25} siendo que ν_{NO} es notoriamente más baja que en los complejos nitrosilados más oxidados. En la Tabla 2.2 puede verse que la naturaleza del metal y de los coligandos influyen sobre ν_{NO} , en un rango alrededor de 1350-1400 cm^{-1} para M(II) y valores mayores para M(III).

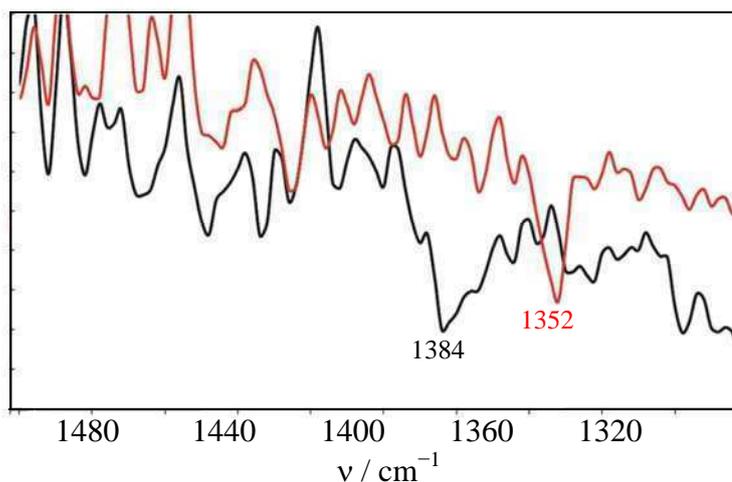


Figura 2.7 Espectro FTIR/ATR (zona ampliada en la ν_{NO} , cristal de germanio) del complejo **P₄₄₅** en abundancia natural y enriquecido con ^{15}N . $[\text{P}_{445}] = 2,8 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{CN}^-]_{\text{inicial}} = 0,056 \text{ M}$; pH 6; buffer PO_4^{3-} 0,03 M; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl). $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Compuesto	IR (ν_{NO}) (cm^{-1})	Ref.
$[\text{Os}^{\text{II}}\text{HNO}(\text{CO})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)_2]$	1410	17a
$[\text{Ir}^{\text{III}}\text{HNO}(\text{H})(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$	1493	16
$[\text{Ru}^{\text{II}}\text{HNO}(\text{py}^{\text{bu}}\text{S}_4)]$	1358	20
$[\text{Re}^{\text{I}}\text{HNO}(\text{CO})_2\text{Cl}(\text{PPh}_3)_2]$	1376	18
P₄₄₅	1384	Este trabajo, 19
$\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$	1385	24

Tabla 2.2 Frecuencias IR (ν_{NO}) para complejos del tipo $[\text{MX}_5\text{HNO}]^x$

Los valores de ν_{CN} en $2086/2040 \text{ cm}^{-1}$ merecen un comentario. Si bien el primer pico es razonablemente asignable al ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ (pues los estiramientos de cianuro suelen aparecer a mayores frecuencias cuanto más aceptor π sea el sexto ligando L) el pico de 2040 cm^{-1} es llamativamente similar al que se reporta para el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$. Visto que para la obtención de estos espectros es necesario trabajar en soluciones concentradas, es posible que dicha banda provenga de un reordenamiento de los cianuros luego de dimerizaciones y labilizaciones. Esa banda también podría corresponder a un dímero (II, II) puentado por cianuros.

Analícemos ahora el espectro IR comparando con otros $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, que incluyen a los complejos nitrosilados más oxidados, listados en la Tabla 2.3. En líneas generales los complejos listados presentan vibraciones en la zona de 2080 a 2100 cm^{-1} , que se asignan a los modos axiales y ecuatoriales de ν_{CN} y no sufren corrimiento con ^{15}N . Las vibraciones en la zona de 1300 a 1900 cm^{-1} están asociadas a modos de estiramiento del enlace N–O. La tendencia de las frecuencias ν_{NO} en la conversión de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ (1945 cm^{-1}) a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ (1648 cm^{-1}) y a **P₄₄₅** (1380 cm^{-1}) refleja que las reducciones sucesivas están centradas en el grupo nitrosilo. Corresponde también comparar la frecuencia del HNO coordinado (1380 cm^{-1}) con la del HNO libre (1510 cm^{-1}), lo cual es consistente con un carácter de aceptor π del ligando HNO en el complejo de Fe^{II} .

Compuesto	ν / cm^{-1}	Asignación	Ref.
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$	2142	ν_{CN}	13
	1936	ν_{NO}	
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$	2088	ν_{CN}	13
	1648	ν_{NO}	
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}]^{3-}$	2080	ν_{CN}	10
	1400	ν_{NO}	
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}/\text{NO}]^{3-/4-}$ Cálculos teóricos	1955-	ν_{CN} ν_{NO}	12
	2018		
	1338-		
	1394		
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NOSEt})]^{3-}$	1380	ν_{NO}	13
P₄₄₅ Sólido (FTIR)	2097	ν_{CN}	Este trabajo
	1383	ν_{NO}	
P₄₄₅ , pH 6 Solución (ATR)	2086	ν_{CN}	Este trabajo, 19
	2040	ν_{CN}	
	1384	ν_{NO}	
P₄₄₅ , pH 6 Solución (Raman Resonante)	2100	ν_{CN}	Este trabajo, 19
	1380	ν_{NO}	
	1304	ν_{NO}	
	1214	-	

Tabla 2.3 Comparación de ν_{NO} y ν_{CN} para diferentes especies nitrosiladas: NO^+ , NO^\bullet , NO^-/HNO , $\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$, NOSEt coordinadas al fragmento $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5]^{3-}$ con los valores obtenidos para **P₄₄₅** por distintas técnicas.

El ligando HNO puede considerarse similar al grupo de los aril y alquilynitrosos, RNO. Por ello en la Tabla 2.3 también se incluyó al ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}]^{3-}$. La Figura 2.8 muestra las analogías estructurales, que también alcanzan a los complejos análogos con nitrosotiolatos, M-N(O)SR.

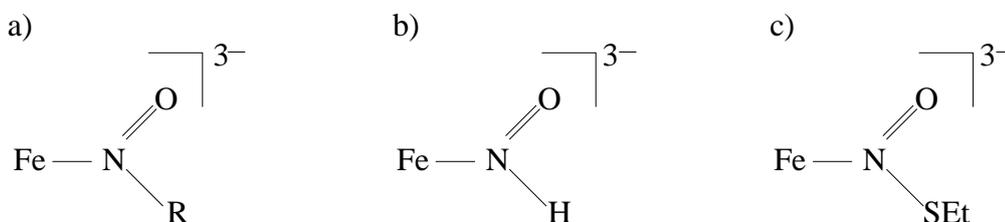


Figura 2.8 Estructuras para el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{R}]^{3-}$ donde R = $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ (a), H (b) y SEt (c)

2.4.2.2 Espectros de FTIR en fase sólida

Vistas las dificultades para aislar el compuesto P_{445} con cationes monovalentes, se logró la precipitación de un sólido agregando ZnSO_4 sólido a una solución concentrada de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$. El espectro FTIR se muestra en la Figura 2.9.

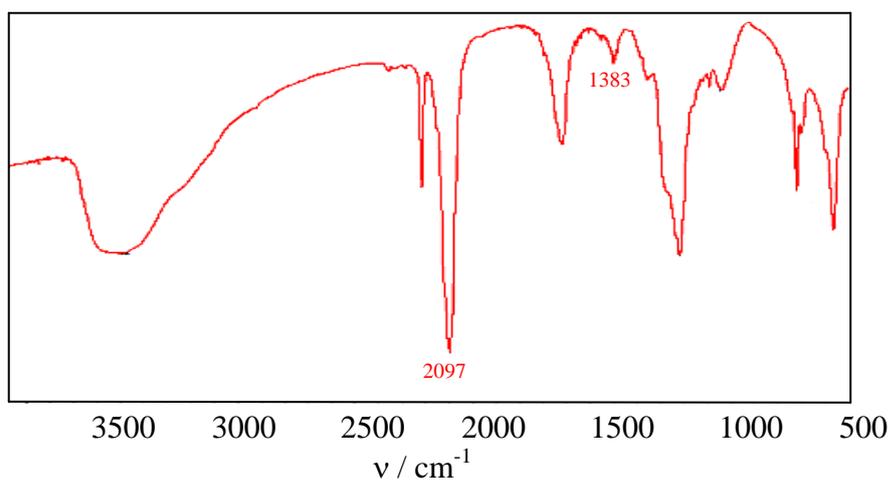


Figura 2.9 Espectro de FTIR de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ precipitado con Zn^{2+} .

Siendo que el espectro muestra picos en 2097 y en 1383 cm^{-1} , asignables a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$, el resultado no presenta novedades respecto a los espectros en solución. El sólido es muy probablemente una mezcla compleja con otros componentes,

como sales de hexacianoferrato. Una presentación crítica de estos resultados se amplía en el Capítulo 5.

2.4.3 Espectroscopía UV- visible

En la Figura 2.10 se muestran los espectros UV-visible de los complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{2-}$.

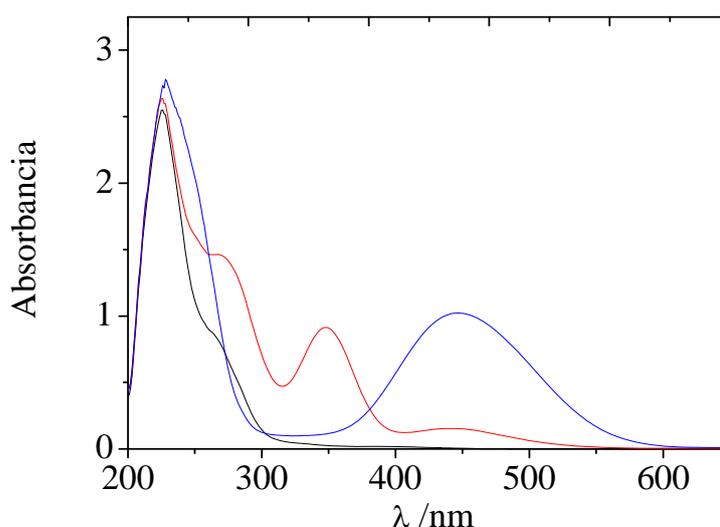


Figura 2.10 Espectros UV-visible de las especies $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{2-}$. $[\text{C}] = 2,5 \times 10^{-4}$ M; $[\text{CN}^-] = 1,25 \times 10^{-3}$ M; pH 10 (para NO^+ y NO) y pH 6 (para HNO); buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1\text{M}$ (NaCl). $T = 25,0$ °C.

Los espectros presentan las siguientes características:

- Una banda intensa en la región UV (≈ 200 nm) cuya posición no depende de la identidad de L. El complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ absorbe en 225 nm, tal como se predijo por cálculos teóricos,¹² y a lo observado con otros $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{n-}$, (L = NO^+ , CN^- , etc.).²⁶ Esta transición se asigna a una transferencia de carga (MLCT) $d_{\pi}(\text{Fe}) \rightarrow \pi^*(\text{CN})$.
- Por analogía con complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{R}]^{3-}$ (R = H,¹² $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$,²⁷ $\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$),¹⁰ la banda de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ en 445 nm se asigna también a una transición MLCT, desde orbitales d_{π} del Fe hacia los orbitales π^* vacantes del ligando HNO. Estas bandas desaparecen por acción de oxidantes, y su energía depende de la reducibilidad de L. El valor de 445 nm compara muy bien con el valor teórico de 460 nm.¹²

➤ Los complejos de la Figura 2.10 presentan hombros en la zona de 250 nm, que son asignables a transiciones d-d.

En la Tabla 2.4 se resumen los datos espectroscópicos para $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, (L = NO^+ , NO) y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{R}]^{3-}$ (R = H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ y $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$).

Complejo	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Asignación	Ref.
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$	200	24000	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{CN})$ d-d	26
	238	700		
	264	900	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$	
	330sh	40		
	394	25		
	498	8		
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$	200	12000	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{CN})$	10
	430	550	d-d	
	345	3500	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$	
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}/\text{NO}^-]^{3-/4-}$	240	-	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{CN})$	12
	338	-	d-d	
	518	-		
	532	-	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$ $\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$	
	330	-		
	460	-		
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}]^{3-}$	250	8900		$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$
	476	5100		
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}_6\text{H}_5]^{3-}$	528	5300	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$	27
$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$	225	12000	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{CN})$	Este trabajo, 19
	236sh	-	d-d	
	445	4000	$\text{M} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$	

Tabla 2.4 Máximos de absorción e intensidad de las bandas para las series de complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$ (L = NO^+ , NO) y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NO})\text{R}]^{3-}$.

Los espectros UV-visible del complejo **P₄₄₅** a pHs 6 y 10 no presentan cambios en la banda de absorción de 445 nm.

2.4.4 Raman Resonante

Estos experimentos se realizaron con $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ a pH 6, irradiando con un láser de Ar^+ (457,9 nm). Visto el máximo en 445 nm, deben activarse las vibraciones

acopladas con la transición electrónica que hemos asignado como de carácter MLCT. En la Figura 2.11 se observan los espectros de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ sintetizado a partir del precursor en abundancia isotópica natural y enriquecido con ^{15}N . Las bandas en 2100 y 565 cm^{-1} no se corren con la marcación, y por ende se asignan a ν_{CN} y al modo combinado $\delta_{\text{Fe-C}}/\nu_{\text{Fe-CN}}$, respectivamente, por comparación con modos relacionados para complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$ ($\text{L} = \text{NO}^+$, NOR, piridina, 4-cianopiridina, pirazina, etc.).^{28, 23,}
¹⁰ Por su parte, las bandas de 1380, 1304, 1214 y 662 cm^{-1} , se corren a 1350, 1286, 1204 y 649 cm^{-1} con la marcación de ^{15}N (Figura 2.10). Las dos primeras se asignan a modos de estiramiento simétrico y antisimétrico de ν_{NO} . La banda en 662 cm^{-1} es una mezcla de los modos $\nu_{\text{Fe-N}}/\delta_{\text{Fe-NO}}$, en posición similar a la observada para el nitroprusiato¹³ y para $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$. La asignación de la frecuencia a 1214 cm^{-1} es dudosa.

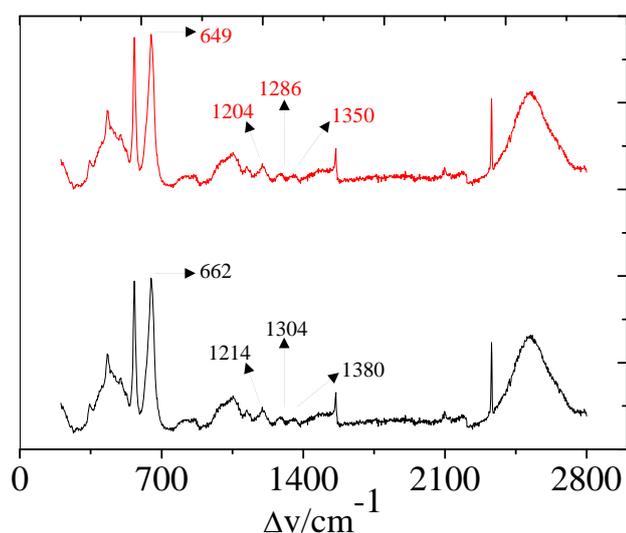


Figura 2.11 Espectro Raman resonante del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ pH 6, con ^{14}N , ^{15}N . $[\text{P}_{445}] = 2,2 \times 10^{-3}\text{ M}$; $[\text{CN}^-]_{\text{inicial}} = 0,044\text{ M}$; pH 6, buffer PO_4^{3-} 0,03 M; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl). $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$.

Comparando con los resultados obtenidos con las técnicas de RMN, FTIR/ATR, y UV-visible, la espectroscopía de Raman Resonante confirma elegantemente la presencia del ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ en las soluciones acuosas.

2.5 Bibliografía

- [1] Olabe, J.A. *Dalton Trans.* **2008**, 3633-3648.
- [2] Butler, A. R.; Glidewell, C. *Chem. Soc. Rev.* **1987**, 16, 361-380.

- [3] a) Richter-Addo, G. B.; Legzdins, P. *Metal Nitrosyls* Oxford University Press: New York, **1992**; b) Feelish, M.; Stamler, J.S., Eds.. *Methods In Nitric Oxide. Research*; Wiley: Chichester, England, **1996**; c) Lancaster, J. Jr.. Ed.. *Nitric Oxide, Principles And Actions*; Academic Press: New York, **1996**; d) Butler, A.R.; Lynd.; Williams, H. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 233-241.
- [4] Videla, M.; Braslavsky, S.B.; Olabe, J.A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 75-82.
- [5] Swinehart, J. H.; Rock, P. A. *Inorg. Chem.* **1966**, 5, 573-576.
- [6] Butler, A.R.; Glidewell, C.; Reglinski, J.; Waddon, A. *J. Chem. Res. Synop.* **1984**, 9, 279.
- [7] Butler, A.R.; Glidewell, C.; Chaipanich, W.; Mcginis, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **1986**, 7-9.
- [8] Szacilowski, K.; Stochel, G.; Stasicka, Z.; Kisch, H. *New J. Chem.* **1997**, 21, 893-902.
- [9] a) Masek, J.; Maslova, E. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1974**, 39, 2141-2160; b) Olabe, J.A. *Adv. Inorg. Chem.* **2004**, 55, 61-126.
- [10] Cheney, R.P.; Simic, M.G.; Hoffman, M.Z.; Taub, I.A.; Asmus, K.D. *Inorg. Chem.* **1977**, 16, 2187-2192
- [11] Alluisetti, G.; Almaraz, A.; Amorebieta, V.T.; Doctorovich, F.; Olabe, J.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13432-13442
- [12] González, M.; Scherlis, D. A.; Estiú, G. L.; Olabe, J. A.; Estrin, D. A. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 4127-4133.
- [13] Schwane, J. D.; Ashby, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6822-6823.
- [14] Scaife, W.J.; G.Wilkins, R. *Inorg. Chem.* **1980**, 19, 3244
- [15] Farmer, P. J.; Sulc, F. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 166-184
- [16] Melenkivitz, R.; Hillhouse, G.L.; *Chem. Commun.* **2002**, 660-661
- [17] a) Roper, W.R.; Grundy, K.R.; Reed, C.A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1970**, 1501-1502. b) Wilson, R.D.; Ibers, J.A. *Inorg. Chem.* **1979**, 18, 336-343.
- [18] Lamonica, G.; Freni, M.; Cenini, S.J.; *Organomet. Chem.* **1974**, 71, 57-64.
- [19] Montenegro, A.C.; Amorebieta, V.T.; Slep, L.D.; Martín, D.F.; Roncaroli, F.; Murgida, D.H.; Bari, S.E.; Olabe, J.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4242-4245.
- [20] Sellmann, D.; Gottschalk-Gaudig, T.; Haussinger, D.; Heinemann, F.W.; Hess, B.A. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 2099-2103.
- [21] Lin, R.; Farmer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2393-2394.
- [22] Lee, J.; Richter-Addo, G.B. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1247-1250.
- [23] Bates, J.B.; Khanna, R.K. *Inorg. Chem.* **1970**, 9, 1376-1380
- [24] Farmer, P. J.; Sulc, F. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 166-184.
- [25] Immoos, C.E. ; Sulc, F.; Farmer, P.J.; Czarnecki, K.; Bocian, D.; Levina, A.; Aitken, J.B.; Armstrong, R.S.; Lay, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 814-815.
- [26] Manoharan, P.T.; Gray, H.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3340.
- [27] *Fundamentos de Química Analítica - Volumen 2.* Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.. Ed. Reverte, 4º ed. Pag. 658-659, Barcelona, **2001**
- [28] Moreno, V. N. G. ; Katz, N. E.; Olabe, J. A.; Aymonino, P. J. *Inorg. Chim. Acta.* **1978**, 35, 183-188

Capítulo 4

*Reactividad del fármaco hidroxiurea
coordinado al pentacianoferrato:
un precursor de nitroxilo?*

Se presenta una revisión de los antecedentes en la química y bioquímica de la hidroxiiurea ($\text{H}_2\text{NC}(\text{O})\text{NHOH}$, HU), seguida por la síntesis, caracterización y reactividad de un nuevo complejo formado a partir de la reacción entre HU y el pentacianoferrato(III).

4.1 Propiedades de la hidroxiiurea

4.1.1 Antecedentes farmacológicos

La HU presenta similitudes estructurales con la urea, la hidroxilamina y la N-hidroxiguanidina, el intermediario en la biosíntesis del NO y posiblemente del HNO. (Figura 4.1). Las comparaciones entre a, b, c y d sugieren que las funciones biológicas de HU pueden relacionarse con el átomo de nitrógeno hidroxilado, adyacente al grupo carbonilo.

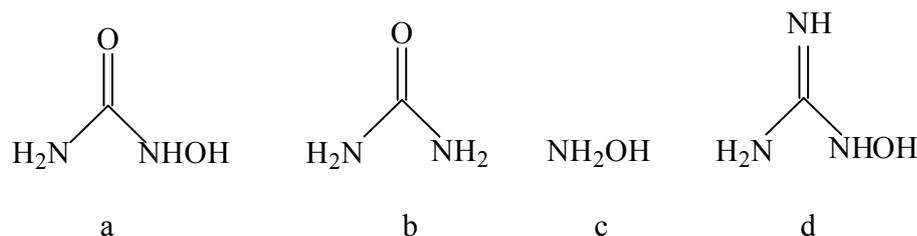


Figura 4.1 Estructura de a) hidroxiiurea, b) urea, c) hidroxilamina, d) hidroxiguanidina.

En los comienzos se investigó a la HU como agente antitumoral en casos de cáncer en cuello de útero.¹ Actualmente la HU se emplea en el tratamiento de anemia falciforme,^{2, 3} leucemia crónica, y psoriasis severa.⁴ También puede funcionar como agente antirretroviral, bloqueando a la ribonucleótido reductasa y provocando la inhibición de la síntesis proviral del ADN.⁵ Este comportamiento proporcionó la base para el estudio de la inhibición de la enfermedad de inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que HU es empleada ocasionalmente para la terapia de SIDA.⁶

La administración de HU no presenta un impacto significativo en los mecanismos celulares en los sistemas biológicos. Sin embargo, el mecanismo molecular detallado de HU en el tratamiento de la anemia de células falciformes sigue siendo poco descripto, y su eficacia clínica ha sido principalmente atribuida a un aumento en el nivel de la hemoglobina fetal (HbF).⁷ Los pacientes se benefician del tratamiento con HU antes de

que sus niveles de HbF aumenten, por lo que los efectos positivos de esta droga no pueden ser completamente explicados por el aumento de nivel de HbF, sugiriendo otros mecanismos de acción. En este sentido, la HU es reconocida como dadora de NO,⁸ aunque no existe una comprensión detallada del mecanismo molecular *in vivo*. Se ha postulado la formación de otros derivados nitrogenados como intermediarios, entre ellos el HNO (sección 4.1.3).

4.1.2 Vías de descomposición oxidativa de la hidroxiiurea

King, S.B.,⁹ postuló que la oxidación de HU (usando como oxidante catalasa y H₂O₂, peroxidasa, entre otros) produce no solo NO sino también HNO, según mecanismos que se muestran en la Figura 4.2.

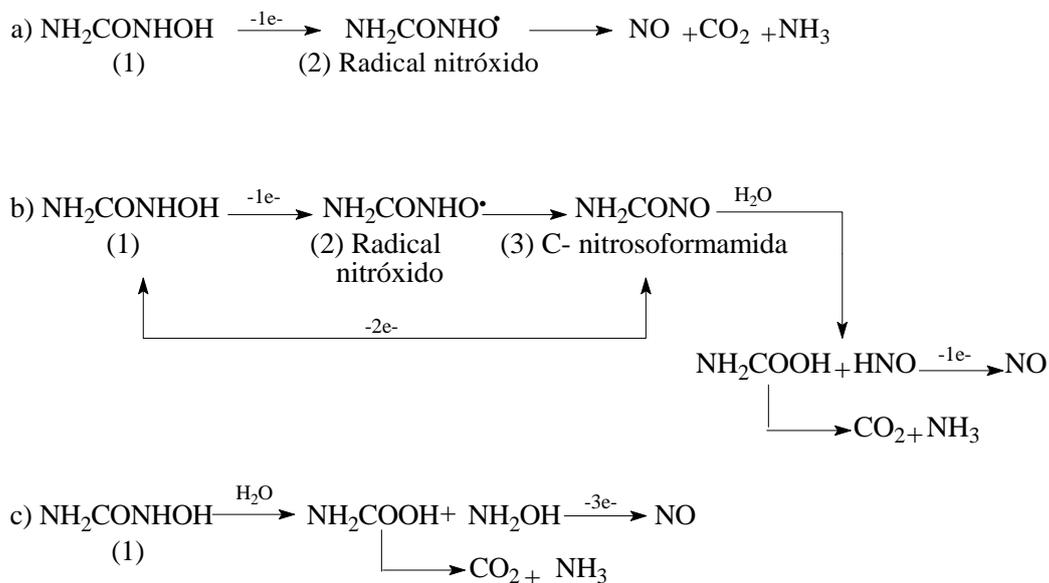


Figura 4.2 Degradación oxidativa de la hidroxiiurea.

En la ruta a), la oxidación de HU hasta formar NO (proceso de 3 electrones) comienza con la formación del radical nitróxido, que puede desproporcionar para dar NO y NH₃. Alternativamente, la ruta b) postula la oxidación por 2 electrones de HU para formar una C-nitrosoformamida (derivado acilnitroso), que puede hidrolizar formando CO₂, NH₃ y HNO; este último sería precursor de NO. Una tercera opción c) postula la hidrólisis de HU para formar ácido carbámico, NH₂CO₂H, que genera CO₂ y NH₃, e NH₂OH, precursora del NO.

4.1.3 Oxidación química de la HU

El tratamiento químico de la HU con oxidantes ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$, $\text{Cu}(\text{SO}_4)_4$, H_2O_2) conduce a la formación del radical nitróxido, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHO}^\bullet$, (Ec. 4.1) caracterizado por espectroscopía EPR, el cual puede vivir más de 1 hora.¹⁰



La identificación de N_2O al completarse la reacción hace evidente la intermediación de HNO. A continuación del radical nitróxido se forma el intermediario C-nitrosoformamida, $\text{H}_2\text{NC}(\text{O})\text{NO}$, identificado por la formación de un producto de cicloadición en presencia de 9,10-dimetilantraceno (9,10-DMA). En ausencia de 9,10-DMA se forma ácido carbámico (H_2NCOOH) y HNO (Figura 4.3).¹¹

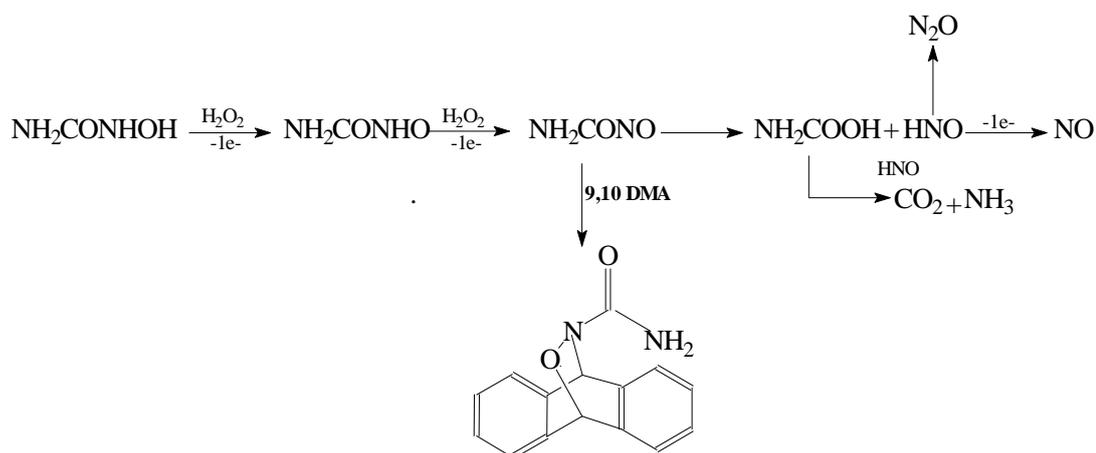


Figura 4.3 Descomposición de HU en presencia de H_2O_2 . Atrapamiento del intermediario C-nitrosoformamida con 9,10-DMA.

El producto de cicloadición de la Figura 4.3 puede sufrir una reacción retro-Diels Alder, liberando la C-nitrosoformamida. (Figura 4.4)¹²

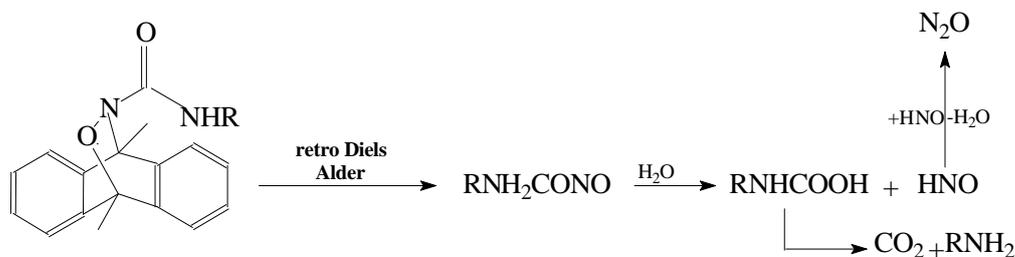


Figura 4.4 Retro Diels Alder del aducto acil nitroso 9,10 DMA

El FeCl_3 ,¹³ y el $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$,¹⁴ también oxidan HU, formando una variedad de compuestos nitrogenados entre los que destacan el N_2O , y el radical nitróxido de la HU. De forma análoga, el oxovanadio(V) a pH ácido funciona como oxidante de HU, formando NH_2OH , el derivado acilnitroso o el radical nitróxido de la HU, estos últimos precursores de HNO y NH_3 .¹⁵ Más recientemente, fue reportada la descomposición oxidativa de HU mediada por un complejo de rutenio, $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]^-$ en presencia de H_2O_2 ,¹⁶ que conduce a la formación de NO_3^- y NO_2^- . Todos estos estudios con oxidantes diversos muestran resultados e interpretaciones estequiométricas y mecanísticas aun muy preliminares, aunque sugieren la formación de HNO en la ruta de descomposición oxidativa del fármaco.

4.1.4 Oxidación biológica de la hidroxiiurea

Las metaloproteínas pueden descomponer a la HU formando NO. Las superóxido dismutasas de cobre y zinc pueden mediar la peroxidación de HU para dar NO, en una reacción de tipo Fenton en la que interviene el radical $\cdot\text{OH}$.¹⁷ Como ejemplo de proteínas de hierro que descomponen HU destaca la oxihemoglobina (HbO_2), que forma el radical nitróxido de la HU además de metemoglobina ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Hb}$) y nitrosilhemoglobina (HbNO) (Figura 4.5).¹⁸ La formación de HbNO involucra la transferencia específica de NO del grupo $-\text{NHOH}$.¹¹



Figura 4.5 Reacción de HbO_2 y HU

La desoxihemoglobina también puede descomponer a la HU, más rápido que la oxihemoglobina.¹⁹ El mecanismo propuesto se presenta en la Figura 4.6.²⁰

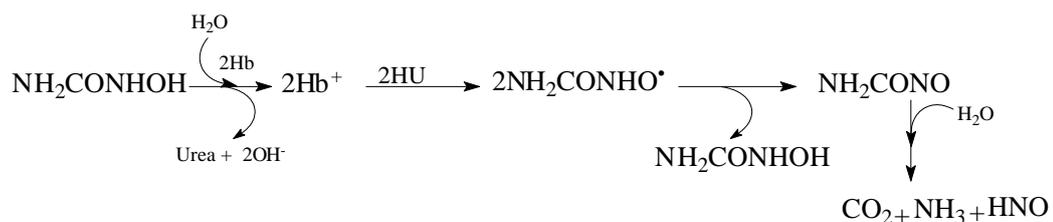


Figura 4.6 Descomposición de HU por desoxihemoglobina

La descomposición de HU podría ser iniciada tanto por $\text{Hb}^{\text{III}}\text{O}_2$ como por Hb^{II} ; en este último caso un mol de HU es consumido en la oxidación de Hb para dar MetHb ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Hb}$, Hb^+ en la Figura 4.6) y se recupera en la desproporción de dos moles de radical nitróxido derivado de HU. De manera similar, la peroxidasa de rábano consume HU en presencia de H_2O_2 formando NO y N_2O .²¹ La catalasa/ H_2O_2 da origen a productos más oxidados como NO_2^- y NO_3^- .²² Estos mecanismos son relevantes a la hora de interpretar las bases moleculares de la acción de la HU en la anemia perniciosa, aun no elucidadas.²³

4.2 La hidroxiiurea coordinada en las plataformas pentacianoferrato

Se vuelve a seleccionar a los pentacianoferratos(II) y (III) como modelos para estudiar la coordinación de HU, y su eventual oxidación mediada por el centro metálico. Con esta hipótesis experimental, se busca interpretar el proceso de activación del fármaco HU en condiciones biológicamente relevantes, y determinar la capacidad dadora de NO y/o de HNO. Se describen la síntesis y caracterización de un nuevo complejo y aspectos de su descomposición y reactividad.

4.2.1 Aislamiento y caracterización del complejo P_{465}

En ensayos preliminares (Capítulo 5), se obtuvo un complejo de coordinación color rojo ($\lambda_{\text{max}} = 465\text{nm}$, P_{465}), a partir de la reacción entre el precursor $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ y HU, en presencia de oxidantes (por ej.: H_2O_2), en solución acuosa. Partiendo de soluciones 10^{-2} M en P_{465} , obtenido en una mezcla de metanol/agua (90:10, $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH/agua}) = 480\text{ nm}$), el agregado de éter dietílico indujo la separación de un precipitado rojo, que fue lavado con etanol y éter y llevado a desecador. Los resultados del microanálisis se muestran en la Tabla 4.1, en base a la fórmula indicada. La termogravimetría de aguas y la determinación de sodio por emisión son consistentes con dicha fórmula.

Elemento	% Experimental	% calculado para $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
C	19.8	19.75
N	25.8	26.86
H	1.6	1.66

Tabla 4.1 Datos experimentales de microanálisis y datos calculados para $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

En la Figura 4.7 se muestra el espectro FT-IR del sólido **P₄₆₅** obtenido.

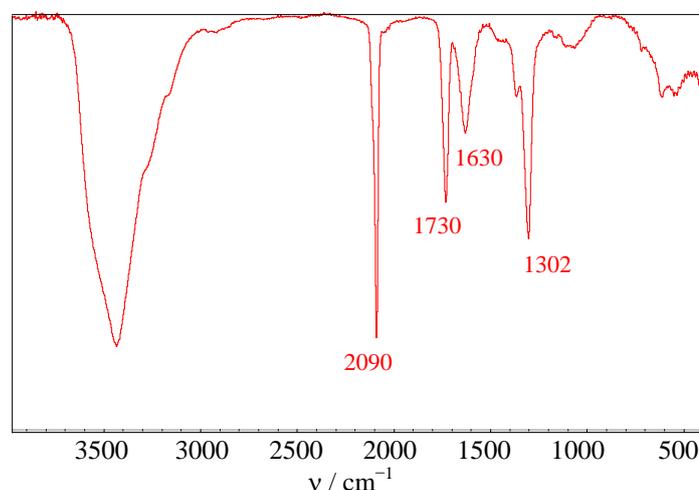


Figura 4.7 Espectro infrarrojo del sólido **P₄₆₅**

Se destaca una banda de absorción ancha en 3200–3700 cm⁻¹, que asignamos a estiramientos OH y NH. El pico en 1630 cm⁻¹ es típico de la deformación HOH. La señal intensa en ≈ 2090 cm⁻¹ corresponde a estiramientos C–N de cianuros coordinados a un M(II), conteniendo un ligando L π -aceptor moderado. Las frecuencias en 1730 y 1302 cm⁻¹ se asignan a modos de estiramiento de CO y NO, respectivamente. La asignación de ν_{CO} es consistente con la observación de un pico en 1735 cm⁻¹ asignado a especies transientes del tipo acilnitroso, PhC(O)NO.²⁴ El valor de ν_{NO} es típico de nitrosoderivados (N=O). Han sido reportados valores en esa zona de frecuencias (1300–1400 cm⁻¹) para varios metalo-nitrosoalcanos, por ej.: $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}]^{3-}$,²⁵ $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{CH}_3]^{3-}$,²⁵ para nitrosotiolatos, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SEt}]^{3-}$, así como para el complejo (**I**).²⁷

El espectro UV-visible mostró una banda única ($\lambda_{\text{max (agua)}} = 465 \text{ nm}$, $\epsilon = 4000 \pm 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), análoga a lo que se observa en los complejos arriba explicitados. Discutimos el tema en la sec. 4.2.3, luego de una síntesis efectuada en condiciones muy bien controladas. En condiciones anaeróbicas y a pH 6-7, se conserva el máximo en 465 nm durante horas, aunque mediante oxidaciones exhaustivas, se observa el decaimiento de la banda anterior, siendo que los sólidos aislados presentan a su vez nuevas bandas en el IR, en 2143 y 1945 cm^{-1} , características del anión nitroprusiato, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$.²⁸ Dado que la reacción con O_2 resulta difícil de controlar, en varias repeticiones del procedimiento se obtuvieron mezclas, claramente evidenciadas en la zona de estiramientos C-N de cianuros. Algunas preparaciones sugieren que los sólidos contienen impurezas de tipo monomérico/polimérico, características de la química de complejos pentacianoferratos puenteados por cianuro, cuya formación es favorecida a las concentraciones utilizadas.

En conclusión, el nuevo ligando $\text{H}_2\text{N}(\text{CO})\text{NO}$ muestra su coordinación en la plataforma de pentacianoferrato(II), en la que se estabiliza fuertemente por vía de uniones σ - π . Este ligando acilnitroso es la C-nitrosoformamida postulada en las reacciones de descomposición de la HU libre (sección 4.1.3).

4.2.2 Estequiometría de la reacción de HU y $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$

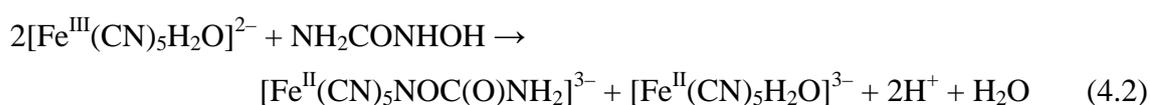
Los resultados obtenidos en los ensayos preliminares y durante el aislamiento del sólido **P₄₆₅** indican que se forma un complejo de coordinación con HU oxidada, donde la especie activa oxidante es el ion $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$. Dado que las propiedades de absorción de esta especie son conocidas, se efectuó un estudio estequiométrico de la oxidación de HU con este reactivo. Se prepararon soluciones de igual concentración de HU y $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ (0,05 M en buffer fosfato 0,02 M, pH 7,1, $I = 1\text{M NaCl}$). El $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ se obtuvo por disolución de $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$.²⁹

a) Valoración espectroscópica de la solución de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$: Se tomó una alícuota de la solución de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{2-}$ en atmósfera de argón y se diluyó a $2 \times 10^{-4} \text{ M}$; se hizo un primer ajuste a pH 11 y luego de 15 min, se llevó a pH 7. De esta manera se obtuvo una solución anaeróbica de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$, $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, a pH 7. A una alícuota de 3 ml de ésta se añadió un exceso de ácido ascórbico sólido; el ácido ascórbico redujo al complejo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ formando el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ ($\lambda_{\text{max}} =$

440 nm, $\epsilon = 640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Debido a la baja absorptividad molar del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ se realizó su cuantificación por sustitución del ligando acuo con isonicotinamida. Después de unos minutos, se adicionaron 0,4 ml de una solución 0,2 M de isonicotinamida en condiciones anaeróbicas. La formación del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{isonicotinamida})]^{3-}$ resulta cuantitativa y puede determinarse su concentración satisfactoriamente por espectroscopía UV- visible, $\lambda_{\text{max}} = 435 \text{ nm}$, $\epsilon = 4570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.³⁰

b) Reacción entre $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ y HU. Valoración espectroscópica de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ en el producto de reacción: De igual manera que en a), se preparó una solución $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$, a la que se agregó un exceso de HU ($2,7 \times 10^{-3} \text{ M}$). Después de alcanzar un valor constante de absorbancia en 465 nm, se añadió un exceso de dimetilsulfóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, DMSO), hasta una concentración final de 0,02 M. El agregado de este reactivo se realizó para atrapar al $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ que pudiera haberse formado en el curso de la reacción. El complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{DMSO})]^{3-}$ no presenta bandas de absorción en el visible, por lo que permite la lectura directa de la diferencia de los valores de absorbancia a 445 nm; de esta forma, se determinó la concentración de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ al final de la reacción, dando cerca de un 50% del valor inicial de Fe (III).

Los resultados obtenidos en los experimentos precedentes, en conjunto con la interpretación espectroscópica y el microanálisis, permiten plantear la ecuación 4.2 para describir la estequiometría del proceso redox operante.



Se verificó la reacción repitiéndola en condiciones estequiométricas. La relación 2:1 de reactantes (ligero exceso de HU) permitió detectar espectroscópicamente la concentración de **P₄₆₅** ($[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$) esperada para la estequiometría propuesta. La ecuación 4.2 muestra que dos moles de Fe(III) se consumieron para la oxidación por 2 electrones de la HU.

De la solución obtenida en la parte b) hicimos una estimación del valor de ϵ_{465} para el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$, obteniéndose $\epsilon = 4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El valor concuerda muy bien con el determinado a partir de la disolución de sólido

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2)]2\text{H}_2\text{O}$ en una solución buffer. ($\epsilon = 4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$). La principal suposición fue que la concentración del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$ era igual a la diferencia entre la concentración inicial de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$ y la concentración final de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$.

En la Figura 4.8 se muestran los espectros UV-visible medidos durante la síntesis del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ a partir de la reacción entre el $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{2-}$ y la HU.

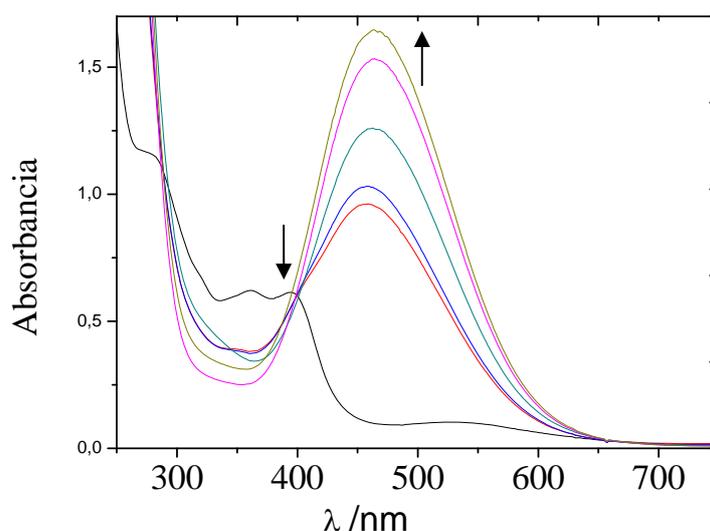


Figura 4.8 Control espectroscópico de la síntesis de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$ ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$). $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-} = 6 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{HU}] = 2,76 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH 6,4; buffer PO_4^{3-} 0,01 M; $I = 1 \text{ M}$ (NaCl); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Paso óptico = 1mm (dilución 1:6 del complejo).

4.2.3 Espectroscopía UV-visible del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$

El espectro UV-visible del nuevo complejo presenta las siguientes características:

- Una banda en 210 nm, presente en otros $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, ($\text{L} = \text{NO}^+$,³¹ CN^- ,³² HNO (este trabajo de tesis); la transición se asigna a una transferencia de carga $d_{\pi}(\text{Fe}) \rightarrow \pi^*(\text{CN})$ y su posición es esencialmente independiente de la identidad del ligando L.
- Una banda en la región del visible, presente en otros $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{3-}$, cuya posición es fuertemente dependiente de la identidad del ligando ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$, en el nuevo complejo). Por analogía con complejos del tipo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NO})\text{R}]^{3-}$, (donde $\text{R} = \text{H}$,³³ $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$,³⁴ $\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$),²⁵ se asignó a una banda de transferencia de carga

metal ligando (TCML). Esta se da desde orbitales $d\pi$ del Fe hacia los orbitales π^* vacantes del ligando $N(O)X$ π -acceptor.³⁵

4.2.4 Registros de espectroscopía de resonancia paramagnética adquiridos durante la síntesis de $[Fe^{II}(CN)_5NOC(O)NH_2]^{3-}$

En la Figura 4.9 se muestra el espectro EPR registrado al inicio de la síntesis de complejo $[Fe^{II}(CN)_5NOCONH_2]^{3-}$. Se evidencia la presencia de una especie radicalaria, cuyo espectro muestra 6 líneas de igual intensidad, de acuerdo con desdoblamiento de un átomo de nitrógeno y un protón (triplete de dobletes). Los parámetros resultantes fueron: $a(N) = 0.805$ Tm y $a(H) = 1.178$ Tm. Como la frecuencia fue de 9.778654 GHz y el campo central fue 247,9 Tm, se obtuvo $g = 2,0082$.

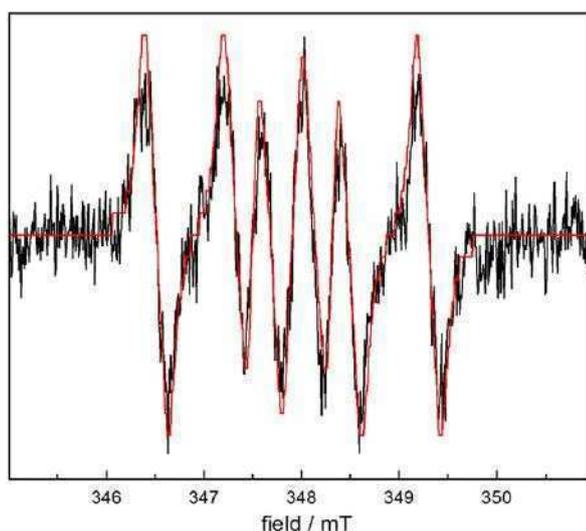
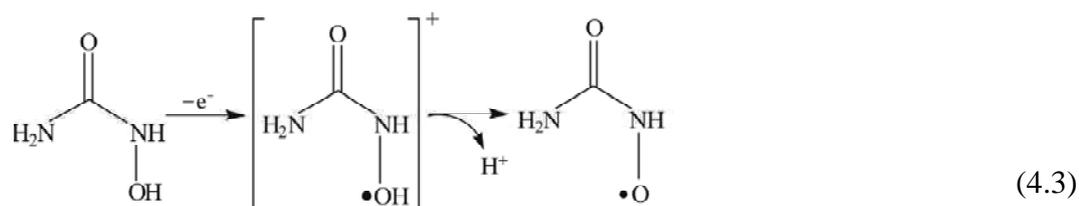


Figura 4.9 Espectro EPR de una especie radicalaria formada al inicio de la síntesis de complejo $[Fe^{II}(CN)_5NOCONH_2]^{3-}$. (Línea roja, espectro simulado con $aN = 0,805$)

El espectro EPR y los valores determinados del mismo concuerdan muy bien con lo reportado para la especie radicalaria oxidada por un electrón de la hidroxiurea, el radical nitróxido $NH_2C(O)NHO^\bullet$, Ec. 4.3.¹⁰

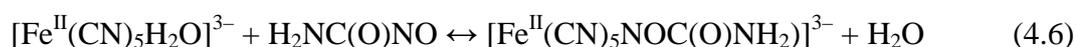
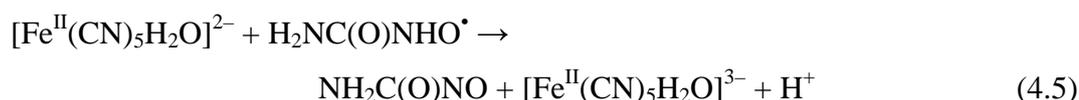
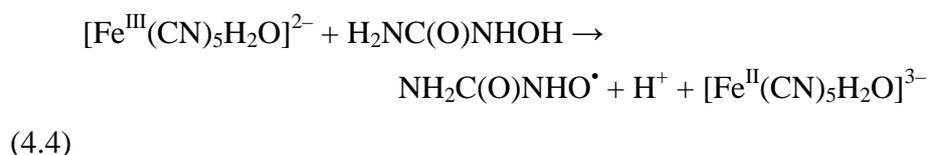


La señal característica del radical nitróxido también fue detectada por van Eldik y cols. tanto en la oxidación de HU con iones de oxovanadio(V),¹⁵ como en la oxidación de HU con H₂O₂ mediada por el complejo [Ru^{III}(edta)(H₂O)]⁻.¹⁶ La identificación de esta especie es una evidencia definitiva de que la oxidación por un electrón de la HU por el oxidante de Fe (III) evoluciona a través de un mecanismo de esfera externa; el consumo de esta especie radicalaria se produjo por la reacción con el segundo mol de Fe (III).

En nuestras condiciones de trabajo, la especie paramagnética se descompone rápidamente con la consecuente desaparición de la señal EPR.

4.2.5 Mecanismo de reacción postulado para la oxidación de HU por el complejo [Fe^{III}(CN)₅H₂O]²⁻. Estabilidad del complejo Fe^{II}(acilnitroso)

La determinación de la estructura del nuevo complejo, sumada a la verificación de la estequiometría de reacción y a la información espectroscópica permiten postular un mecanismo para la reacción de oxidación de HU por [Fe^{III}(CN)₅H₂O]²⁻. La información de EPR indica que en un primer paso la reducción de [Fe^{III}(CN)₅H₂O]²⁻ da origen al radical nitróxido libre, NH₂C(O)NHO•, y a [Fe^{II}(CN)₅H₂O]³⁻ (Ec. 4.4). En el segundo paso, un segundo electrón completa la oxidación del radical formando la C-nitrosoformamida libre, NH₂C(O)NO, Ec. 4.5. Estos son en principio procesos de oxidación por esfera externa. En tercer lugar, la C-nitrosoformamida se coordina a [Fe^{II}(CN)₅H₂O]³⁻, originando el complejo rojo [Fe^{II}(CN)₅NOCONH₂]³⁻ (Ec. 4.6).



El último paso constituye un nuevo ejemplo de la fácil coordinación de diferentes ligandos L en $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$, intercambiando con el ligando acuoso.³⁰ Estos procesos de segundo orden suelen ser moderadamente rápidos, con $k_L \approx 3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$), que conduce a la formación de complejos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{L}]^n$ muy estables. Visto el muy lento decaimiento del máximo en 465 nm a pH 6-7, podemos estimar una constante de disociación muy baja para la reacción inversa en la reacción 4.6, $k_{\text{Fe}} = \approx 10^{-5} - 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (comparar, por ej. con el valor del mismo orden estimado para $L = \text{HNO}$). De ello surge un valor del orden de 10^7 M^{-1} para la constante de estabilidad del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$.

4.3. Reactividad química del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$

4.3.1 Descomposición espontánea e inducida por agregado de base (pH 9 y 10).

Se ha analizado que el complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ es muy estable a pH 7 y en medio anaeróbico. La velocidad de descomposición, medida por decaimiento de la banda a 465 nm, se incrementa con el pH. Interesantemente, también los productos del decaimiento son dependientes del pH.

En los experimentos a pH 9-10, el decaimiento de la banda a 465 nm va asociado a la formación de una nueva banda, de baja intensidad, en aproximadamente 320 nm. (Figura 4.10 y 4.11)

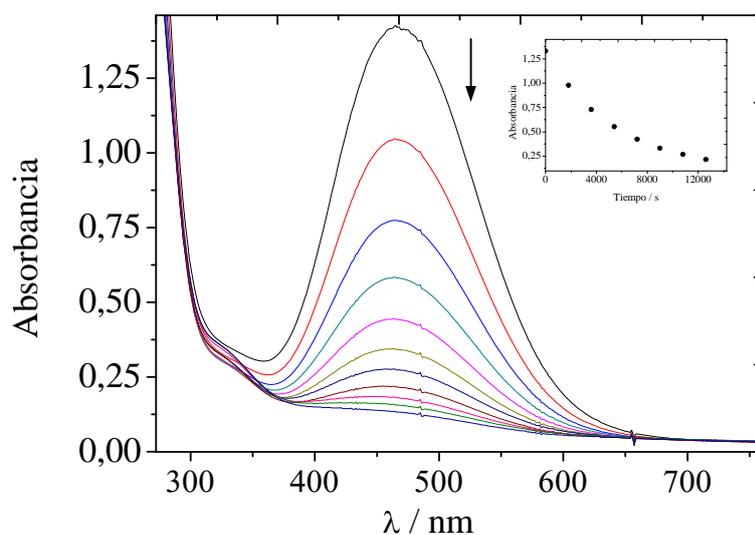


Figura 4.10 Espectros UV-visible de la cinética de descomposición anaeróbica espontánea de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$. $[\text{C}] = 3,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH 9; $I = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

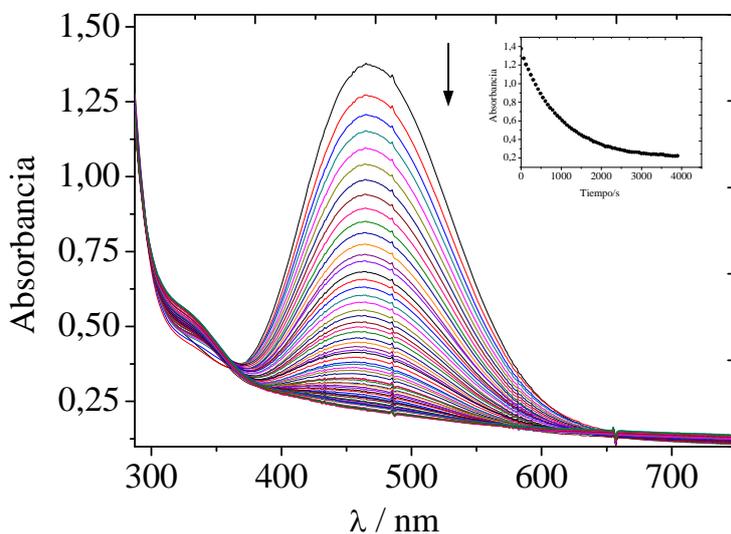


Figura 4.11 Espectros UV-visible de la cinética de descomposición anaeróbica espontánea de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$. $[\text{C}] = 3,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH 10, $I = 0.1 \text{ M}$ (NaCl) $T = 25^\circ\text{C}$.

El decaimiento de la banda a 465 nm se atribuye a la hidrólisis de la C-nitrosoformamida coordinada. Las soluciones decaídas contienen más NH_3 que las solución de referencia (el NH_3 proviene del $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{2-}$ de partida), indicando que la C-nitrosoformamida es una nueva fuente de NH_3 . También se determinó la formación de CO_2 en la cámara de aire de la mezcla de reacción. Además, la absorción en 320 nm indica la presencia de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$, como resultado de la descomposición de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ en la solución agotada.³⁶ Finalmente, al cabo del completo decaimiento a pH < 10 se detectaron iones nitroprusiato $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, con un rendimiento del 84%.³⁷

En el análisis de los gases desprendidos de la reacción de decaimiento por CG-EM se identificó N_2O . Este gas sugiere la participación de HNO como intermediario, o bien de alguna forma coordinada que contenga al N en un estado de oxidación (+1). Este aspecto guarda relación directa con los experimentos presentados en los capítulos 2 y 3 sobre la reducción por dos electrones del nitroprusiato en medio alcalino. De acuerdo al $\text{p}K_a = 7,7$ que pudimos estimar, a pH 9 existiría aproximadamente un 10% de

la forma $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$, y el resto correspondería a una forma presente en medio alcalino (compuesto **II**). El compuesto **II** no muestra uniones N–H (RMN), ni tampoco genera N_2O por descomposición. El producto de la descomposición oxidativa es $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, a pH 10, y presenta una reacción de comproporción por agregado de nitroprusiato (sección 3.6.3).

Es por ello que agregamos nitroprusiato al $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ a pH 9-10, con el propósito de determinar en forma indirecta la presencia del compuesto **II** o un análogo en estado de oxidación equivalente. En la Figura 4.12 se muestran los espectros sucesivos de ese experimento.

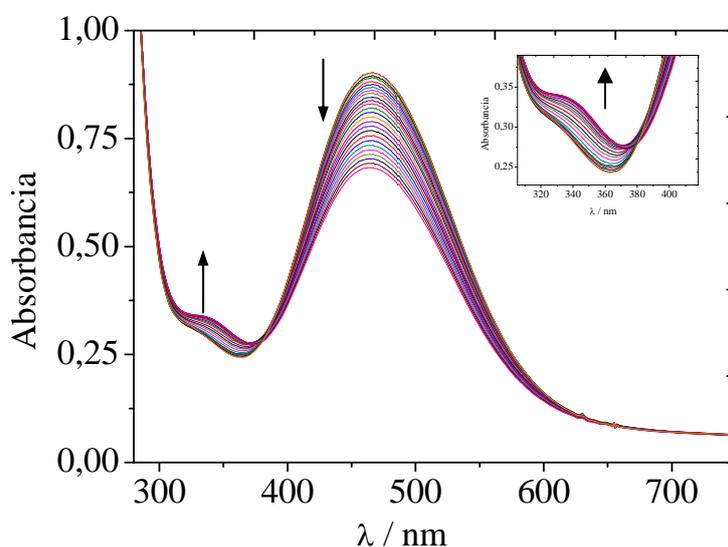


Figura 4.12 Adición de un equivalente de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ a una solución de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$. $[\text{C}] = 2,3 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH = 9 - 9,5. $I = 0.1 \text{ M}$ (NaCl) $T = 25^\circ\text{C}$. Recuadro: ampliación de la banda en 348nm.

Se observó la formación de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ ($\lambda = 348 \text{ nm}$), consumiendo lentamente al complejo, lo que sugiere una reacción parcial de comproporción (Ec. 4.7).



El resultado anterior, sumado a la formación de N_2O entre los gases de reacción, sugiere la intermediación mayoritaria de complejos con nitrógeno coordinado en el estado de oxidación +1, diferentes de los presentes en la reducción química del nitroprusiato.

4.3.2 Descomposición espontánea del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ por agregado de base ($11 < \text{pH} < 13$).

En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestran los espectros UV-visible de la descomposición del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ a pH 11 y 13 respectivamente.

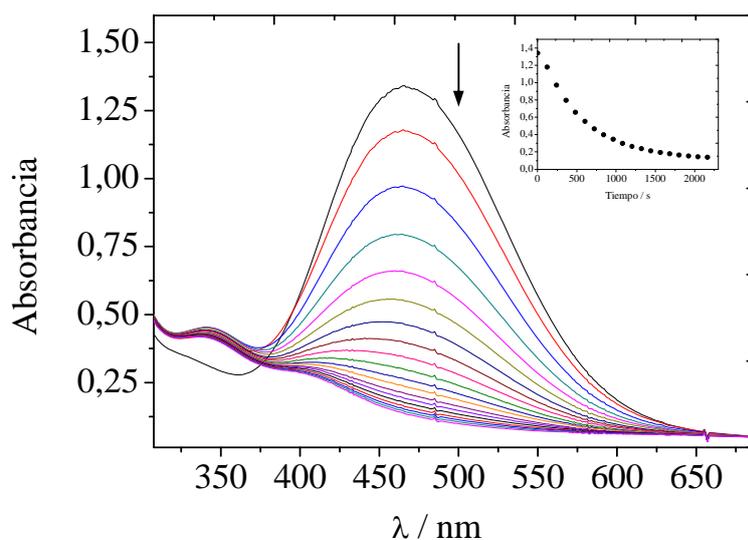


Figura 4.13 Espectros UV-visible de la cinética de descomposición anaeróbica espontánea de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$. $[\text{C}] = 3,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH 11, $I = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $T = 25^\circ\text{C}$.

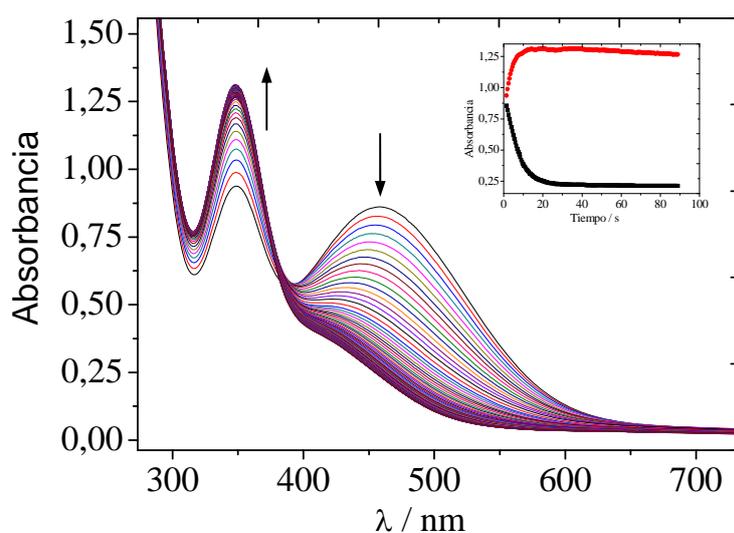


Figura 4.14 Espectros UV-visible de la cinética de descomposición anaeróbica espontánea de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$. $[\text{C}] = 3,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH 13, $I = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $T = 25^\circ\text{C}$. Recuadro: trazas a $\lambda = 465 \text{ nm}$ y 348 nm

En este rango de pH, el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOC}(\text{O})\text{NH}_2]^{3-}$ se descompone produciendo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ ($\lambda_{\text{max}} = 348 \text{ nm}$).²⁵ La traza a 348 nm (Figura 4.14) indica que el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ se descompone lentamente.³⁸ Las soluciones de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ oxidadas y neutralizadas solo contienen iones $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$.³⁵

La formación de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ también se verificó en la descomposición del material sólido $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]2\text{H}_2\text{O}$, por contacto con la atmósfera húmeda y aeróbica: el registro de EPR de esta muestra puso en evidencia una señal triplete (Figura 4.16), con $g \approx 2,02$, que asignamos al $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$.^{37, 39}

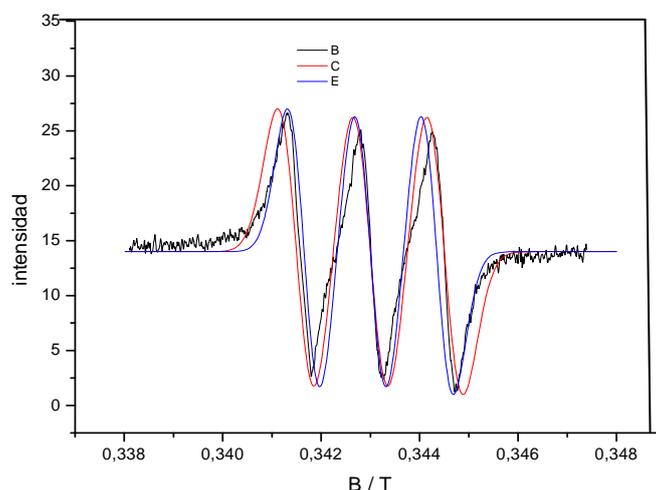


Figura 4.15 Espectro EPR del radical encontrado en la exposición al aire del sólido $\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]2\text{H}_2\text{O}$.

La señal del radical se mantuvo durante 24 h sin cambios. El sólido almacenado en atmósfera de argón no presentó señales de EPR.

La reacción con mercaptosuccinato para el dosaje de nitroprusiato tiene un pH óptimo de 10. A pH >11 , como el de nuestra situación experimental, no se pudo realizar este test ya que el nitroprusiato se convierte en la forma con nitrito coordinado, que se libera rápidamente (Ec. 4.8 y 4.9).⁴⁰





En la Figura 4.16 se muestra el decaimiento del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ a pH 11- 11.5 por espectroscopía UV-visible.

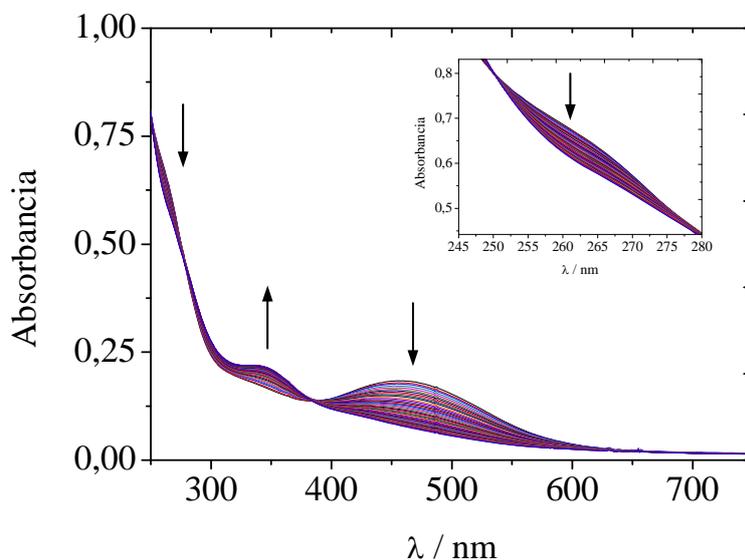


Figura 4.16 Espectros UV-visible de la descomposición del $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ $[\text{C}] = 5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; pH=11-11,5; $I = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $T = 25^\circ\text{C}$. Recuadro: Ampliación de la banda de 260-270 nm.

El espectro UV-visible revela una posible fuente alternativa de N_2O : la aparición de una señal en 265 nm es característica de la especie hiponitrito, $\text{N}_2\text{O}_2^{2-}$ (Figura 4.16). En el medio de reacción, la especie se formaría por la reacción del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ con nitroxilo libre, o bien por intermediación de dímeros, formando ácido hiponitroso coordinado (Ecuaciones 4.8 y 4.9)



La intensidad de absorbancia a 265nm disminuye en forma concomitante con el decaimiento de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ y la aparición de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$. Si bien la intermediación de hiponitritos coordinados en la descomposición de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ es especulativa, su participación no se debe descartar.⁴¹

A continuación se muestra un esquema completo de los productos y reactivos que participan en la oxidación de la hidroxiurea por el complejo pentacianoacuoferrato(III). (Figura 4.17).

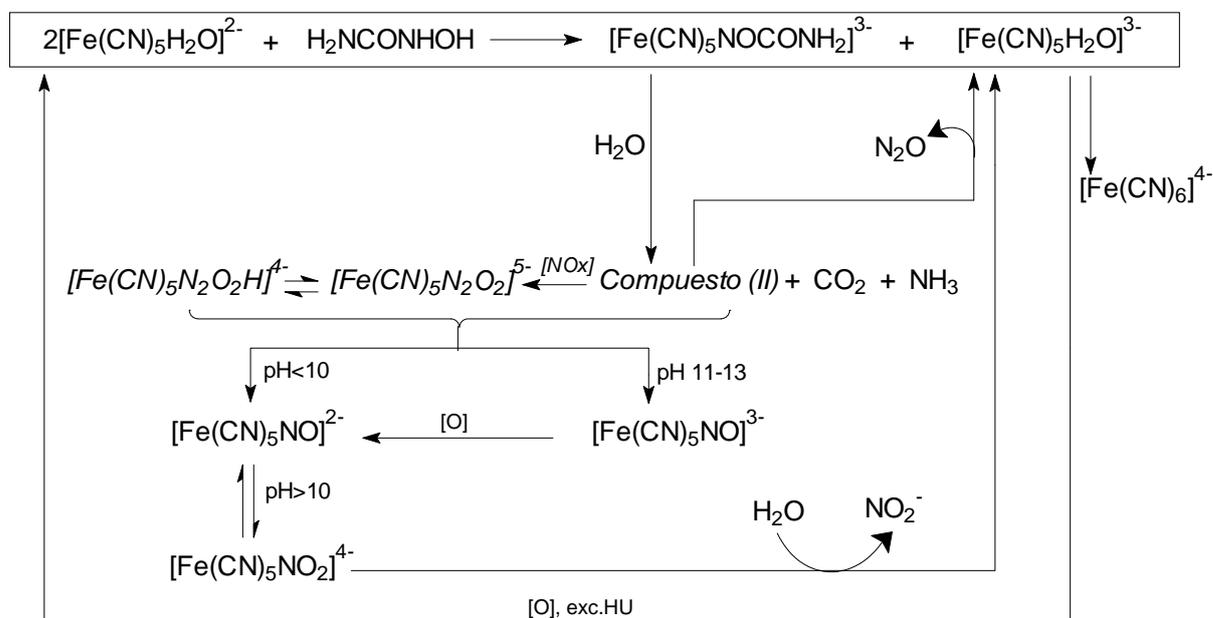


Figura 4.17 Esquema de reacciones obtenido a partir de la oxidación de HU mediada por el complejo pentacianoferrato.

En la Figura 4.17 se muestra un esquema que resume los resultados alcanzados en el estudio de descomposición de la HU mediada por pentaciano(acuo)ferrato(III). En la figura están indicados con *itálicas* aquellos intermediarios cuya estructura no ha sido verificada y cuya participación es especulativa. Es de destacar que la detección de N₂O es una evidencia indirecta de la formación de nitroxilo o de una forma libre o coordinada en estado de oxidación equivalente (+1). Visto lo aprendido en los estudios de descomposición espontánea de [Fe(CN)₅HNO]³⁻ o del compuesto **II**, la presencia de N₂O sugiere un mecanismo de descomposición distinto al de estas especies que forman exclusivamente el anión nitroprusiato como producto. El NO, posible producto de descomposición de la HU no fue detectado como producto de la reacción con pentacianoferrato.

4.4 Bibliografía

- [1] a) Nishida, T.; Nagasue, N.; Arimatsu, T.; Nagano, H.; Lzumi, S.; Okura, N.; Matsumura, T.; Yakushiji, M. **1989**, *4*, 590-594; b) Currie, J.L.; Blessing, J.A.; McGehee, R.; Soper, J. T.; Berman, M. *Gynecol. Oncol.* **1996**, *61*, 94-96.
- [2] Orkin, S.H.; Higgs, D.R. *Science*, **2010**, *329*, 291-292.
- [3] Xu, Y., Mull, C.D.; Bonifant, C.L.; Yasaki, G.; Palmer, E.; Shields, C.H.; Ballas, S.K.; Kim-Shapiro, D.B.; King, S.B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6452-6453.
- [4] Layton, A.M.; Sheehan-Dare, R.A.; Goodfield, M.J.; Cotterill, J.A. *Br. J. Dermatol.* **1989**, *121*, 647-653.
- [5] a) DeSesso, J.M.; Goeringer, G.C. *Reprod. Toxicol.* **1990**, *4*, 145-152; b) Cui, L.; Loatelli, L.; Xie, M. Y.; Sommadossi, J. P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 1228-1234.
- [6] Lori, F.; Malykh, A.; Cara, A.; Sun, D.; Weinstein, J. N.; Lisziewicz, J.; Gallo, R.C. *Science*. **1994**, *266*, 801-805.
- [7] Charache, S.; Terrin, M.L.; Moore, R.D.; Dover, G.; Barton, F.B.; Eckert, S.V.; McMahon, R.P.; Bonds, D.R. *New Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1317-1322.
- [8] Gladwin, M.T.; Shelhamer, J.H.; Ognibene, F.P. Pease-Fye, M.E.; Nichols, J.S.; Link, B.; Patel, D.B.; Jankowski, M.A.; Pannell, L.K.; Schechter, A.N.; Rodgers, G.P. *Br. J. Haematol.* **2002**, *116*, 436-444.
- [9] King, B. *Current Medicinal Chemistry.* **2003**, *10*, 437-452.
- [10] Lassmann, G.; Liermann, B. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, *6*, 241-244.
- [11] Xu, Y.; Mull, C.D.; Bonifant, C.L.; Yasaki, G.; Palmer, E.C.; Shields, H.; Ballas, S.K.; Kim-Shapiro D.B.; King S.B. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6452-6453.
- [12] Xu, Y.; Alavanja, M.M.; Johnson, V.L.; Yasaki G.; King, S.B. *Tetrahedron Letters.* **2000**, *41*, 4265-4269.
- [13] Harmon, R.E.; Dabrowiak, J.C.; Brown, D.J.; Gupta, S.K.; Herbert, M.; Chitharanjan, D. *J. Med. Chem.*, **1970**, *13*, 577-579.
- [14] Nigovic, B.; Kujundzic, N.; Sankovic K. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*, 51-55.
- [15] Gabricevic, M.; Besic, E.; Birus, M.; Zahl, A.; van Eldik, R. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1606-1613.
- [16] Chatterjee, D.; Nayak, K.A.; Ember, E.; van Eldik, R. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1695-1698.
- [17] Sato, K.; Akaike, T.; Sawa, T.; Miyamoto, Y.; Suga, M.; Ando, M.; Maeda, H. *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 1199-1204.
- [18] Gow, A.J.; Stamler, J.S. *Nature* **1998**, *391*, 169-173.
- [19] Kim-Shapiro, D.B.; King, S.B.; Bonifant, C.L.; Kolibash, C.P.; Ballas, S.K. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1380*, 64-74.
- [20] Kim-Shapiro, D.B.; King, S.B.; Shields, H.; Kolibash, C.P.; Gravatt, W.L.; Ballas, S.K. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1428*, 381-387
- [21] Huang, J.; Sommers, E.M.; Kim-Shapiro, D.B.; King, S.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3473-3480
- [22] Huang, J.; Kim-Shapiro, D.B.; King, S.B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3495-3101.
- [23] Orkin, S.H.; Higgs, D.R. *Science*. **2010**, *329*, 291-292.
- [24] Cohen, D.A.; King, S. B.; Toscano, J.P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1444-1445.
- [25] Cheney, R.P.; Simic, M.G.; Hoffman, M.Z.; Taub, I.A.; Asmus, K.D. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 2187-2192.

- [26] Gutiérrez, M.M.; Alluisetti, G.B., Olabe, J.A.; Amorebieta, V.T. *Dalton Trans.* **2009**, 1187-1194.
- [27] Schwane, J.D.; Ashby, M.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6822-6823.
- [28] Bates, J. B.; Khanna, R. K. *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 1376-1380.
- [29] G. Brauer, *Handbook of Preparative Inorganic Chemistry*, 2° ed., Academic Press, New York, **1965**.
- [30] Toma, H.E.; Malin, J.M. *Inorg. Chem.* **1973**, *12*, 1039-1045.
- [31] Manoharan, P.T.; Gray, H.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3340-3348.
- [32] Ford, P.D.; Rudd, F.P.; Gaunder, R.; Taube, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1187-1194.
- [33] Gonzalez, M.; Scherlis, D.A.; Estiú, G.L.; Olabe, J.A.; Estrin, D.A. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 4127-4133.
- [34] *Fundamentos de Química Analítica - Volumen 2*. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.. Ed. Reverte, 4° ed. Pag. 658-659, Barcelona, **2001**.
- [35] Olabe, J.A. *Dalton Trans.* **2008**, 3633-3648.
- [36] Olabe, J.A.; Zerga, H.O. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 4156-4158.
- [37] Szacilowski, K.; Wanat, A.; Barbieri, A. Wasiliewska, E.; Witko, M.; Stochel, G.; Stasicka, G. *New J. Chem.* **2002**, *26*, 1495-1502.
- [38] Roncaroli, F.; Olabe, J.A.; van Eldik, R. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4179-4189.
- [39] a) van Voorst, J. D.W. ; Hemmerich, P. *J. Chem. Phys.* **1966**, *45*, 3914-3918; b) Wanner, M.; Scheiring, T.; Kaim, W.; Slep, L.D.; Baraldo, L.M.; Olabe, J.A., Zalis, S.; Baerends, E.J. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5704-5707.
- [40] a) Swinehart, J.H.; Rock, P.A. *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 573-576; b) Stochel, G.; van Eldik, R.; Hejmo, E. S.; Stasicka, Z. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2767-2770.
- [41] Arulsamy, N.; Scott Bohle, D.; Imonigie, J.A. Sagan, E.S. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2716-2725

Capítulo 6

Conclusiones

1) Se ha preparado un nuevo complejo de HNO, el ion $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ (**I**), reduciendo con ditionito sucesivamente al ion nitroprusiato, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, por vía del intermediario $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$. Si bien no se dispone de un sólido puro, la caracterización en solución por combinación de determinaciones químicas y técnicas espectroscópicas provee una identificación estructural concluyente. (**I**) es el primer complejo nitroxilado de hierro(II) no-hémico caracterizado en solución acuosa. Se muestra que las tres especies redox del grupo nitrosilo son interconvertibles en una misma plataforma, sin disociación del metal, lo cual es importante en los procesos enzimáticos que catalizan reacciones multielectrónicas.

2) El complejo (**I**) es notoriamente estable a $\text{pH} \approx 6$, en ambiente anaeróbico. Su máximo de absorción decae en una escala de horas con una constante cinética de primer orden de $\approx 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. El producto principal es $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, por lo que se concluye que se ha producido una reoxidación intramolecular de 2 electrones. Al no desprenderse N_2O , se evidencia que no ha ocurrido la disociación de HNO del Fe(II). Este debe ser un proceso aun más lento, asociado con un fuerte enlace $\sigma\text{-}\pi \text{ Fe}^{\text{II}}\text{-NHO}$.

3) Se ha determinado el $\text{p}K_a$ de (**I**) mediante titulación seguida por ^1H RMN. El valor de $\text{p}K_a = 7,7$ es el primero reportado *en solución acuosa* para el grupo HNO coordinado, y es significativamente menor al sugerido para $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$, ≈ 11 . Esta diferencia de tres órdenes de magnitud puede ser interpretada en términos de la estabilización adicional del enlace H-N en $\text{Mb}^{\text{II}}\text{HNO}$ que proporciona la interacción con aminoácidos de la cavidad distal. El producto de la desprotonación es probablemente el singlete $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5^1\text{NO}]^{4-}$.

4) Si bien no ha sido caracterizado con certeza, el $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5^1\text{NO}]^{4-}$ (**II**) (o bien una especie relacionada) se descompone formando $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ con una vida media de 50 min. El complejo reacciona a $\text{pH} 10$ frente al metilviológeno ($E_{\text{MV}2+/\text{MV}+} = -0,4 \text{ V}$) y al nitroprusiato ($E_{[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]2- / [\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]3-} = -0,05\text{V}$), en contraste con el complejo (**I**), que no es reactivo. De ello se concluye que **II** es un fuerte reductor ($E \cong -1,1 \text{ V}$), en contraste con (**I**), ($E_{\text{HNO},\text{H}^+/\text{NO}} \cong 0,4 \text{ V}$).

5) (**I**) es oxidable por 2 equivalentes de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, generando $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, a $\text{pH} 6$. El análisis cinético y mecanístico establece que existe un primer preequilibrio donde los

reactivos generan $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-} + [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{2-}$. Esta última especie se descompone lentamente para dar $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ mediante transferencia de H, seguida por una rápida oxidación para dar el producto final. Los oxidantes más débiles ensayados (metilviológeno oxidado, nitroprusiato) no reaccionan frente a **(I)**.

6) **(I)** es reducible por ditionito mediante un proceso de 4 electrones, generando el ion $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{CN})_5\text{NH}_3]^{3-}$. Complementado por resultados anteriores acerca de la $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{CN})_5\text{NH}_2\text{OH}]^{3-}$, se muestra la viabilidad del proceso redox de 6 electrones en la misma plataforma de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5^{3-}$, sin requerir disociaciones del metal. Así, dado que el $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{CN})_5\text{NH}_3]^{3-}$ libera NH_3 rápidamente formando $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$, este último ion se comporta como un modelo de nitrito reductasa, pues puede eventualmente coordinar al NO_2^- (como NO^+) y proseguir el ciclo reductivo.

7) La hidroxiurea (HU) reacciona con oxidantes como el $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$, generando un derivado acilnitroso, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NOCONH}_2]^{3-}$ (oxidación por 2 electrones). El nuevo complejo resulta muy estable en ausencia de O_2 , y a $\text{pH} \approx 7$. A pHs mayores se descompone, generando NH_3 , CO_2 y presumiblemente $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{4-}$, que opera como posible precursor de HNO/ NO^- (se ha detectado N_2O), y se oxida sucesivamente a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ a pHs 11-13. El mecanismo de conversión de HU en HNO/ NO se asemeja a los postulados en medios biológicos como base de su acción farmacológica. Todos los intermediarios nitrogenados desde -1 (HU) hasta el +3 (nitroprusiato) han sido detectados.

8) La reactividad de **(I)** y **(II)** han sido preliminarmente abordadas en este trabajo. Particularmente se impone continuar con las reacciones frente al O_2 y a los tiolatos. También se debe intentar una mejor caracterización de la estructura y la reactividad de la especie desprotonada $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{4-}$. En cuanto a las drogas precursoras de nitroxilo, existe una ancha avenida con posibles reactivos como los ácidos hidroxámicos u otros estructuralmente relacionados con la hidroxiurea. Finalmente, corresponde seleccionar otras plataformas adecuadas del tipo MX_5 que generen aún mejores condiciones de estabilidad y manejo de las especies nitroxiladas.

Agradecimientos

Mi más sincero reconocimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la elaboración de este trabajo de tesis.

Al Vasco y Sara, por haberme abierto las puertas de su grupo de investigación y permitirme de esta manera realizar mis estudios de Doctorado. Infinitas gracias a los dos por todo el apoyo que me brindaron, no solo a nivel laboral, sino también a nivel personal.

A mis profesores, colegas, compañeros y amigos de la facultad, con los que he compartido día a día durante estos años.

A Nati, Sergio, Nacho, Juan, por compartir miles de cosas en estos años y haber sido en algún momento mis compañeros de laboratorio.

A Bea Araoz por ser una gran amiga y compañera, gracias por estar siempre allí cuando te necesito.

A mi suegro Antonio, por brindarme su cariño y apoyo todos estos años.

A mi familia por su apoyo incondicional, mi Abuelita Beatriz, mis tios (Adriana, Sandra, Jaime y Omaira) y primos (Eval, Luis, Stiven, Luis, Lesly y Sebas), a todos ellos gracias.

A mi tío Nevil por apoyarme, creer en mí y darme siempre un gran ejemplo de vida.

A mi Mamá Gladis y mi hermano Diego, porque ellos son siempre la inspiración y fortaleza en todos mis proyectos de vida.

A mi Martín, mi compañero en este viaje, quien me impulsa y da fuerza para salir siempre adelante con esa forma tan especial que tiene de ver la vida.

A Dios, por guiar mi camino y permitirme alcanzar mis sueños.

Fe de erratas

Pág. 19

En el ciclo del nitrógeno en la fórmula (NH_3), dice amonio, debe decir amoníaco.

Pág. 28

Las siglas cGMP y GCs significan guanosín monofosfato cíclico y guanilato ciclasa soluble respectivamente.

Pág. 34, 35 y 36

En las Figuras 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 20s.

Pág. 39

En la Figura 2.7, donde dice: “ n_{NO} ”, debe decir “ n_{NO} ”

Pág. 45

En la Ref. 19 del cap. 2, donde dice 4242-4245, debe decir 4213-4216.

Pág. 48

En la Figura 3.1, el eje x está corrida la numeración.

Pág. 50

Donde dice: “Como es llamativo que el espectro electrónico UV-visible de la especie de NO^- coordinada sea tan similar al de **(I)**, (Figura 3.X):

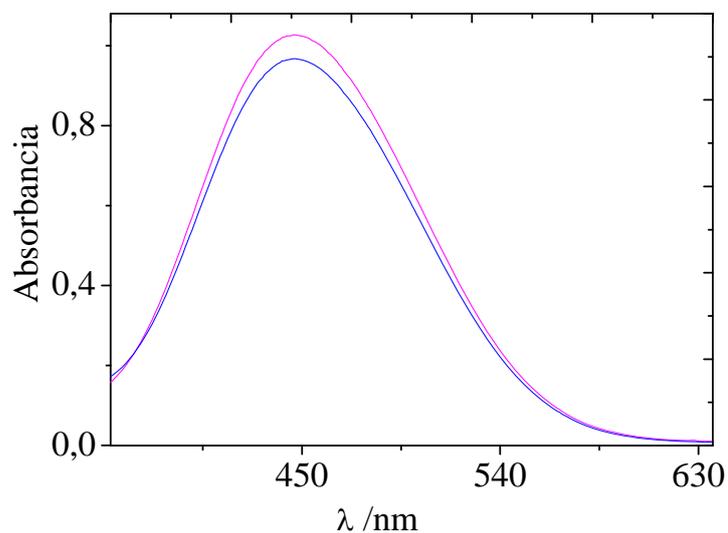


Figura 3.X Espectros de la especie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{4-}$ y $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$

Pág. 52

En la Figura 3.4, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada hora.

Pág. 54

En la Figura 3.5, donde dice "...pulsos de luz c/10s", debe decir "...pulsos de luz cada 1min."

Pág. 55

En la Figura 3.6, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 2s.

Pág. 58

En la ecuación de k_3 , donde dice "...SO²⁻", debe decir "... SO₂⁻".

Pág. 59

1) En las Figuras 3.9 y 3.10, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 5s.

2)

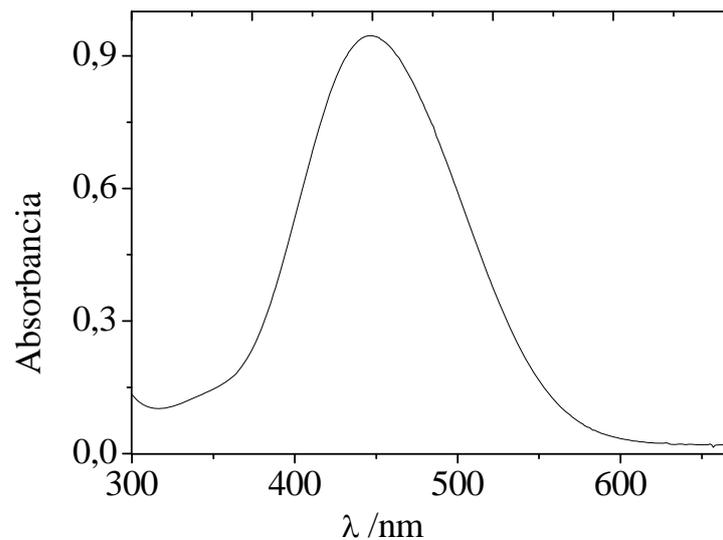


Figura 3.9a Espectro inicial del complejo [Fe^{II}(CN)₅HNO]³⁻ antes de la adición de [Fe^{III}(CN)₆]³⁻.

3) En las Figuras 3.9 y 3.10 se eliminan los espectros iniciales del complejo [Fe^{II}(CN)₅HNO]³⁻, según sigue:

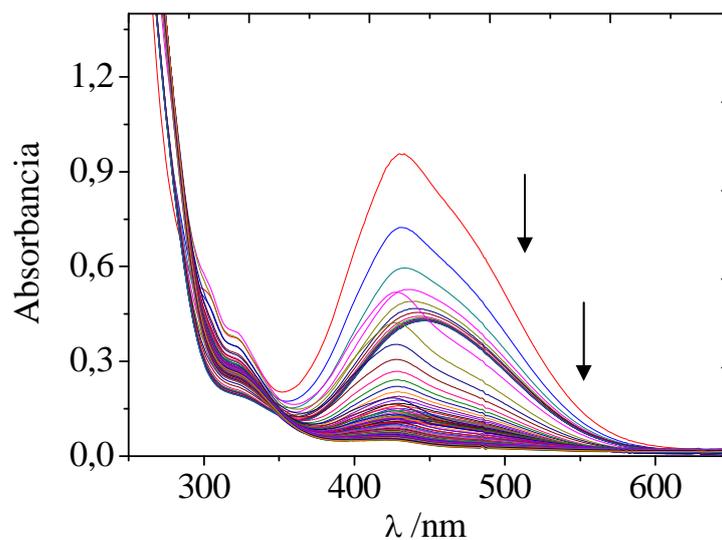


Figura 3.9 Espectros sucesivos UV-visible, luego de agregar a **(I)**, secuencialmente (flechas), 1 y 2 eq de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$. $[\text{I}] = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-} = 2,5 \times 10^{-4}$; $[\text{CN}^-]_{\text{inicial}} = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$; M pH 6; buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1\text{M}$ (NaCl). $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

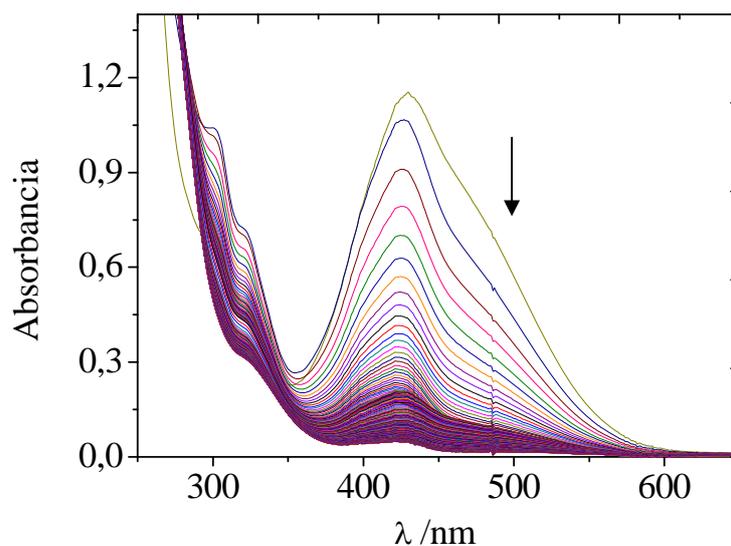


Figura 3.10 Espectros sucesivos UV-visible luego del agregado de 2 equivalentes de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ al complejo **(I)**. $[\text{I}] = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{CN}^-]_{\text{inicial}} = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$; pH 6; buffer PO_4^{3-} 0,003 M; $I = 0,1\text{M}$ (NaCl). $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pág. 61 a 64

Donde dice: “ Es posible postular...los mismos productos”

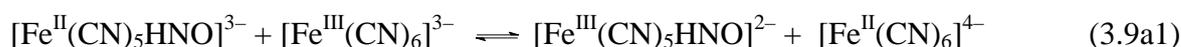
Debe decir:

Vista la estequiometría (3.8), es razonable suponer que el reactivo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{3-}$ se oxida a nitroprusiato en dos etapas monoelectrónicas, con $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ como intermediario. Para ello, es posible postular varias alternativas mecánísticas, las que se exponen críticamente a continuación. En la primera de ellas, se propone el siguiente esquema de reacciones:



La reacción 3.9a es determinante de la velocidad, consistente con la ley experimental de primer orden en cada reactivo. El producto $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ reacciona rápidamente a través de la reacción de equilibrio 3.9b, y de la conversión final a nitroprusiato, 3.9c. La reacción 3.9a involucra una transferencia de e^- y H^+ , donde el ligando HNO se oxida a NO y el protón se transfiere al medio. El valor de la constante k_{12} es apreciablemente menor que las constantes observadas en las reacciones cruzadas entre $[\text{Fe}^{\text{III,II}}(\text{CN})_5\text{L}]^n$, donde el electrón se intercambia entre los centros metálicos (ca. $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ver Tabla 3.2). Las figuras 3.9 y 3.10 no muestran la presencia de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ (ca. 350 nm), lo cual evidencia que no puede acumularse debido a la reactividad subsiguiente. Dado que se evidencia un hombro alrededor de 500 nm, se sugiere un intermediario reactivo. En la anterior interpretación, ese hombro puede corresponder a un complejo de asociación entre los reactivos de 3.9a. En el contexto anterior, el pico del voltograma de la figura 5.2 correspondería a un proceso redox cuasi-reversible centrado en el ligando ($E_{\text{Fe}^{\text{II}}^{\text{HNO}}^{\text{II}} / \text{Fe}^{\text{II}}^{\text{NO,H}^+}^{\text{II}}}$).

Existe una segunda alternativa mecánística para interpretar la ley de velocidad observada. En ella podemos dividir la ecuación 3.9a en dos etapas:





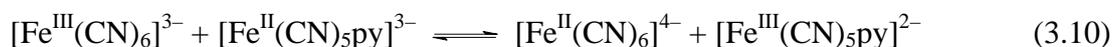
La reacción 3.9a1 involucra una transferencia electrónica (que suponemos de esfera externa) entre los centros metálicos de hierro, tal como se ha observado para diferentes cianometalatos (Tabla 3.2). El transiente en 500 nm correspondería ahora al intermediario $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{2-}$ (Figuras 3.8 y 3.9). La asignación es consistente con que el potencial medido para el complejo **(I)**, 0,44 V, corresponda a la cupla redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$. De esa manera, la constante de equilibrio K_{eq} para la reacción 3.9a1 valdría alrededor de 1, pues el potencial de la cupla $[\text{Fe}^{\text{III,II}}(\text{CN})_6]^{3,4-}$ es = 0,45 V.²¹ El ion $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{2-}$ debería vivir lo suficiente para luego reordenarse en la reacción 3.9a2, que puede considerarse una etapa de transferencia de átomo de H, formando $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, que como se ha demostrado anteriormente es un complejo de NO que labiliza cianuro según la Ec. 3.9b. Si bien la constante de equilibrio de esta reacción de descomposición es baja ($K_{\text{eq}} = 10^{-5} \text{ M}^{-1}$, k_f , 270 s^{-1} , k_r , $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a pH 6 interviene la protonación del cianuro, desplazando el equilibrio, y estableciendo que $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_4\text{NO}]^{2-}$ es el producto dominante en esas condiciones. Finalmente la oxidación se completa rápidamente a través de la reacción 3.9c.

En el mecanismo propuesto podemos establecer estado estacionario para la especie $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{HNO}]^{2-}$ considerando las reacciones 3.9a1 (k_1 , k_{-1}) y 3.9a2 (k_2), de lo cual surge la siguiente ley de velocidad: $v = k_2 \times k_1 \times [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}^{3-}] \times [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}] / (k_{-1} \times [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}] + k_2)$. Podemos considerar la situación límite de que $(k_{-1} \times [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}] \gg k_2)$, con lo cual resulta: $v = k_2 \times K_1 \times [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}]^{-1} \times [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{HNO}^{3-}] \times [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}]$, donde $K_1 = k_1/k_{-1}$, y agrupamos definiendo $k = k_2 \times K_1 / [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}]$. Obsérvese que k es en realidad dependiente de la concentración de hexacianoferrato(II), que se va acumulando durante la reacción. Eso no es compatible con la observación, en la ley experimental, de que k_{12} es de un riguroso primer orden en cada reactivo. Por otra parte, es objetable que el intermediario $\text{Fe}(\text{III})\text{HNO}$ viva lo suficiente como para ser detectado, por lo cual cabe en principio descartar esta segunda alternativa, y privilegiar el camino que se ha analizado en la primer propuesta.

Reacción	$k_{12}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Ref
$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-} + \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{py}^{3-}$	$3,4 \times 10^{4(\text{b})}$	22
$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-} + \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_54\text{NH}_2\text{py}^{3-}$	$4,3 \times 10^{5(\text{c})}$	23
$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{py}^{2-} + \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{py}^{3-}$	$7 \times 10^{5(\text{d})}$	22
$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_54\text{NH}_2\text{py}^{2-} + \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_54\text{NH}_2\text{py}^{3-}$	$7 \times 10^{5(\text{d})}$	23
$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-} + \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$	$5 \times 10^{3(\text{a})}$	22

Tabla 3.2 Constantes cinéticas de transferencia de electrones. ^(a) $[\text{K}^+] = 0,05 \text{ M}$; ^(b) $[\text{KNO}_3] = 0,05 \text{ M}$; ^(c) $[\text{LiClO}_4] = 0,05 \text{ M}$; ^(d) Constantes de autointercambio calculadas mediante la relación cruzada de Marcus.

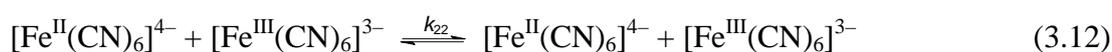
Vistos los trabajos sobre las reacciones cruzadas que se exponen en la Tabla 3.2, hemos considerado un tercer tratamiento mecanístico alternativo según el modelo de Marcus, suponiendo que la reacción 3.9a1 es lenta, y que es seguida rápidamente por las demás etapas. Es decir que intentamos relacionar la reacción 3.9a1 con alguna reacción cruzada, por ejemplo:



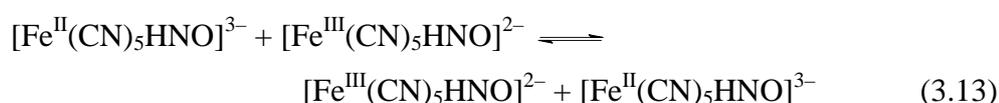
La expresión de Marcus es: $k_{12} = (k_{11} \times k_{22} \times K_{12} \times f)^{1/2}$, donde cada término tiene el siguiente significado:

– k_{12} es la constante de transferencia de electrones de la reacción cruzada (3.10 o 3.9a1). En general, k_{12} puede medirse convencionalmente (ver Tabla 3.2), o bien puede predecirse aplicando la ecuación de Marcus, a condición de conocer los demás términos.

– k_{11} y k_{22} , son las constantes de autointercambio, y se corresponden con las reacciones 3.11 y 3.12.



K_{12} es la constante de equilibrio de la reacción 3.10, y su valor se calcula a partir de los respectivos potenciales de reducción E° para las cuplas correspondientes Fe(III,II). Finalmente, f es un factor que contiene a K_{12} y a las constantes de autointercambio, y que puede aproximarse razonablemente a 1 en la mayoría de las situaciones experimentales. En la Tabla 3.2 se muestran resultados obtenidos por Toma para la reacción cruzada 3.10. A partir de esas medidas, puede calcular k_{11} (para L = py en la Ec. 3.11). Al intentar estimar k_{11} para L = HNO (ec. 3.13), obtenemos $k_{11} \approx 0.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que es un valor apreciablemente más bajo que los obtenidos para L = py y L = 4NH₂py.



El resultado tan bajo para k_{11} nos hizo pensar que la aplicación del modelo de Marcus no era correcta en este caso, y que el resultado de medir un proceso más lento debía relacionarse con otro mecanismo. De ese modo, la reacción 3.9a, al ocurrir con una k_{12} comparativamente baja respecto a los valores de la Tabla 3.2, debe estar asociada con una barrera de activación significativa debido a la transferencia de electrón acoplada con protón. Es decir, los números no son compatibles con una transferencia de electrones entre los centros de hierro como etapa controlante de la velocidad.

Una primera conclusión de estos experimentos es que el complejo **(I)** presenta un potencial rédox (0,44 V) del mismo orden que los $[\text{Fe}^{\text{III/II}}(\text{CN})_5\text{L}]^{2,3-}$, posibilitando su reactividad frente a oxidantes. Se aprecia que **(I)** es un reductor moderado, pudiendo convertirse a $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ mediante una reacción acoplada de transferencia de átomo de H (H^+ , e^-). La ocurrencia de esa etapa es muy verosímil, y puede relacionarse con el rápido atrapamiento de HNO por las porfirinas de Fe(III), que generan los mismos productos, viz., $\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO} + \text{H}^+$.²⁴

Pág. 66

En la Figura 3.14, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 1 hora y 30 min.

Pág. 68 y 69

En las Figuras 3.16 y 3.17, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 20s.

Pág.70

En la Figura 3.18, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 20s.

Pág.71

En la Figura 3.19, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 20s.

Pág. 81

Donde dice ml, debe decir mL.

Pág. 82

En la Figura 4.8, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados en un tiempo total de aproximadamente 2 horas.

Pág. 83

Donde dice Tm, debe decir mT.

Pág. 87

En la Figura 4.12, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 20s.

Pág. 90

En la Figura 4.16, los espectros secuenciales UV- visible fueron tomados cada 20s.

Pág. 95

“, mientras que el cianuro de sodio (NaCN), dimetilsulfóxido, (DMSO, CH₃SOCH₃) y sulfato de zinc, (ZnSO₄) se adquirieron en Merck.”

Pág. 96

Donde dice $\ln [A_{\infty} - A_t]$, debe decir $\ln [A_t - A_{\infty}]$.

Pág. 102

Donde dice: Se observa una onda reversible, de decir cuasi-reversible

Pág. 103

Donde dice NaCl, debe decir CaF₂

Aclaración: En las leyendas de las Figuras, toda vez que dice “...concentración de buffer PO₄³⁻, pH 10 ...”, debe decir “...concentración de PO₄³⁻/ HPO₄²⁻...” y toda vez que dice “...concentración de buffer PO₄³⁻, pH 6...”, debe decir “...concentración de HPO₄²⁻/ H₂PO₄⁻...”