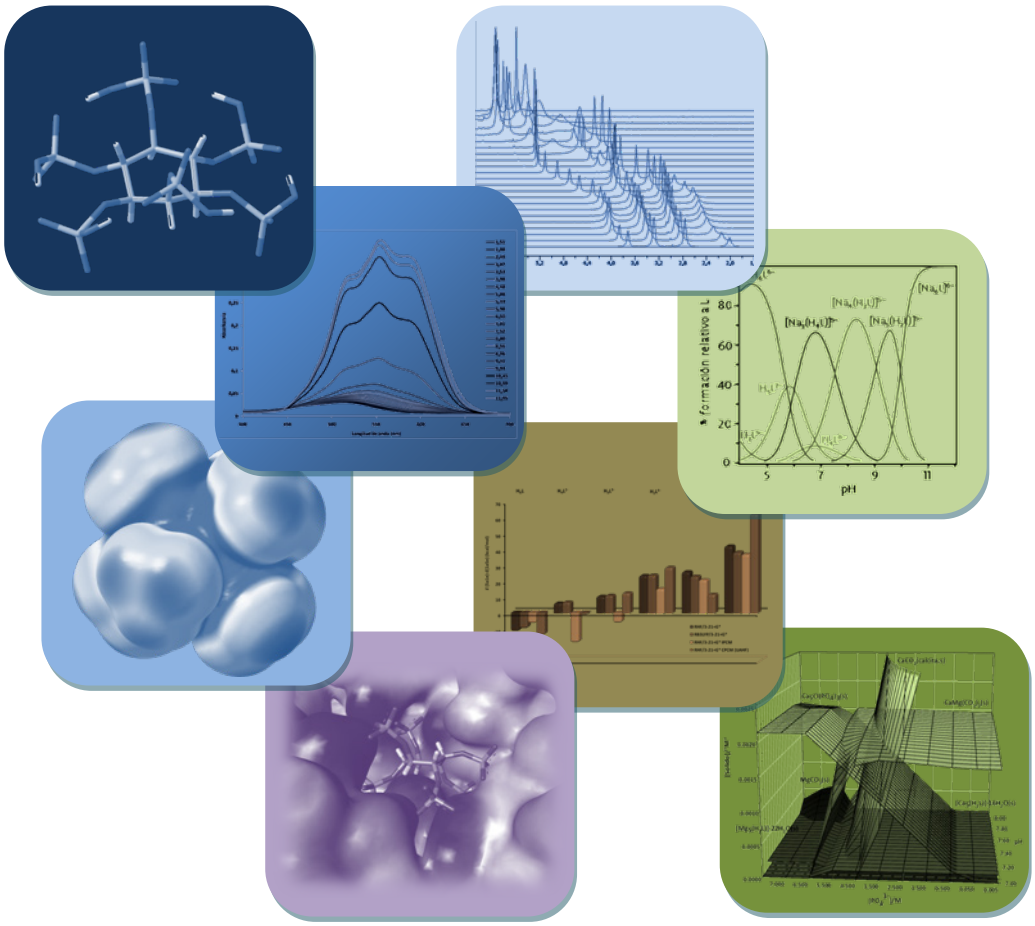
Tesis de Doctorado en Química

Interacción de iones metálicos con inositol fosfatos



Qco. Nicolás Veiga

Directores de Tesis: Dr. Carlos Kremer
Dra. Julia Torres
Facultad de Química, UdelaR
Año 2011

Índice

Resumen 11

Capítulo 1: Introducción

Generalidades 13

Inositol y derivados: estructura y nomenclatura 15

Biosíntesis

Aspectos evolutivos 23

Vías metabólicas 26

Derivados fosforilados del inositol en sistemas biológicos

Generalidades 28

Fosfolípidos de inositol 29

Pirofosfatos de inositol 33

Inositol fosfatos 34

Interacción inositol fosfatos-cationes metálicos: relevancia biológica

Fisiología inorgánica 48

Consecuencias de la interacción Ins*P*-metal 50

Artefactos experimentales: una visión crítica 53

Referencias bibliográficas 55

Capítulo 2: Antecedentes en la temática

Generalidades 63

Especiación química de los inositol fosfatos 66

myo-inositol mono y bisfosfatos 67

myo-inositol trisfosfatos 69

myo-inositol tetrakis y pentakisfosfatos 84

myo-inositol hexakisfosfato 86
Referencias bibliográficas 103

Capítulo 3: Justificación y objetivos

Justificación de la propuesta 106
Objetivos generales 110
Objetivos específicos 110
Referencias bibliográficas 111

Capítulo 4: Metodología general

Estudios químicos en solución 112
Síntesis de los complejos al estado sólido 115
Determinación de la solubilidad de los sólidos 116
Estudios estructurales en solución 117
Estudios estructurales al estado sólido 119
Cálculos teóricos de los sistemas en estudio 120
Estudios de *docking* Ins*P*-proteína 121
Estudios de modelos que semejen las fitinas 122
Modelado de la bioaccesibilidad de iones en presencia de Ins*P* 123
Referencias bibliográficas 124

Sección I. *myo*-inositolhexakisfosfato (InsP_6)

Capítulo 5: Especiación química del InsP_6 en solución

Introducción 126
Parte experimental 127
Resultados y discusión
Interacción del fitato con los iones alcalinos 128
Interacción del fitato con los iones alcalinotérreos 133

Interacción del fitato con iones de transición +2 137
Comportamiento general del InsP_6 en presencia de iones M^{2+} 141
Interacción del fitato con iones +3 146
Influencia de iones alcalinos en la especiación fitato-$M^{2+/3+}$ 154
InsP_6 como agente secuestrante 157
Conclusiones 166
Referencias bibliográficas 168

Capítulo 6: Estudio estructural en solución de los sistemas InsP_6-H^+/M^+

Introducción 169
Parte experimental 173
Resultados y discusión
Sistema InsP_6-H^+ 175
Sistema InsP_6-Na^+ 197
Sistema InsP_6-K^+ 213
Conclusiones 220
Referencias bibliográficas 222

Capítulo 7: Estudio estructural en solución de los sistemas InsP_6-M^{2+}/M^{3+}

Introducción 223
Parte experimental 226
Resultados y discusión
Sistema InsP_6-Mg^{2+} 227
Sistema InsP_6-Ca^{2+} 239
Sistema InsP_6-Zn^{2+} 253
Sistema InsP_6-Co^{2+} 265
Sistema InsP_6-Ni^{2+} 275
Sistema InsP_6-Cu^{2+} 287

Sistema InsP_6-Fe^{3+} 290
Conclusiones 302
Referencias bibliográficas 304

Capítulo 8: Estudios del InsP_6 al estado sólido

Introducción 306
Parte experimental
Síntesis y medidas de solubilidad de las fases sólidas 310
Análisis de metal en presencia de fitato 311
Resultados y discusión
Caracterización química de las fases sólidas 313
Caracterización estructural de las fases sólidas 317
Síntesis y caracterización de fitatos mixtos InsP_6-K^+-M^{2+} 324
Determinación de la solubilidad de los fitatos sólidos 329
Descripción completa del comportamiento del fitato frente a iones +2 y +3 en un medio no interactuante 334
Reactividad del fitato frente a iones +2 y +3 en presencia de Na^+ 340
Limitaciones del modelo termodinámico 344
Conclusiones 345
Referencias bibliográficas 347

Sección II. *myo*-inositol(1,3,4,5,6)pentakisfosfato

Capítulo 9: Especiación química del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en solución

Introducción 350
Parte experimental 351
Resultados y discusión
Equilibrios de protonación 352
Interacción del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con iones alcalinos 354
Interacción del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con iones divalentes 357

Interacción del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con Fe^{3+} 362

Ins(1,3,4,5,6)P_5 como agente secuestrante 363

Conclusiones 368

Referencias bibliográficas 370

Capítulo 10: Estudio estructural en solución de los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+/$M^{+/2+}$

Introducción 371

Parte experimental 372

Resultados y discusión

Sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ 374

Sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ 388

Sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+} 401

Conclusiones 412

Referencias bibliográficas 414

Capítulo 11: Estudios del Ins(1,3,4,5,6)P_5 al estado sólido

Introducción 415

Parte experimental

Síntesis y medidas de solubilidad de las fases sólidas 416

Dosificación de Ca^{2+} en presencia de Ins(1,3,4,5,6)P_5 417

Resultados y discusión

Caracterización química de las fases sólidas 417

Caracterización estructural por espectroscopía infrarroja 420

Determinación de la solubilidad de los complejos sólidos 426

Descripción completa del comportamiento del Ins(1,3,4,5,6)P_5 frente a los iones Mg^{2+} y/o Ca^{2+} 428

Capacidad secuestrante del Ins(1,3,4,5,6)P_5 al estado sólido 432

Conclusiones 434

Referencias bibliográficas 435

Sección III. *myo*-inositol(1,2,3)trisfosfato

Capítulo 12: Especiación química del Ins(1,2,3)P_3 en solución

Introducción 438

Parte experimental 441

Resultados y discusión

Equilibrios de protonación 441

Interacción del Ins(1,2,3)P_3 con iones alcalinos 444

Interacción del Ins(1,2,3)P_3 con iones divalentes 447

Visión completa del comportamiento del Ins(1,2,3)P_3 frente a iones M^{2+} 451

Interacción del Ins(1,2,3)P_3 con el ion Fe^{3+} 453

Ins(1,2,3)P_3 como agente secuestrante 454

Conclusiones 461

Referencias bibliográficas 464

Capítulo 13: Estudio estructural en solución de los sistemas Ins(1,2,3)P_3-$H^+/M^{+/2+/3+}$

Introducción 466

Parte experimental 468

Resultados y discusión

Sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ 470

Sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ 484

Sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} 494

Sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} 505

Conclusiones 523

Referencias bibliográficas 526

Sección IV. Aplicaciones biológicas y nutricionales

Capítulo 14: Estudio comparativo en sistemas biológicos

Introducción 529

Parte experimental 530

Resultados y discusión

Capacidad quelante comparativa del InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3 532

InsP_6 en sistemas biológicos: interacción con Li^+ 535

Ins(1,3,4,5,6)P_5 en sistemas biológicos 536

Ins(1,2,3)P_3 en sistemas biológicos 543

Interacción Ins*P*-proteína 550

Conclusiones 568

Referencias bibliográficas 570

Capítulo 15: Especiación química de inositol fosfatos a nivel gastrointestinal

Introducción

El fitato en el reino vegetal: las fitinas 573

El fitato y su influencia en la bioaccesibilidad de minerales 574

El fitato y su efecto beneficioso para la salud 578

Datos nutricionales: consumo de alimentos de base vegetal 579

Posibles estrategias para la mejora de la bioaccesibilidad de los minerales 581

Propuesta 582

Metodología de trabajo 584

Datos nutricionales de los componentes del modelo 585

Composición de fluidos y condiciones en el tracto gastrointestinal 586

Componentes del modelo 588

Concentraciones de los componentes en cada compartimento 590

Simulación de la especiación química 590

Aproximaciones del análisis de la especiación química 591

Resultados y discusión 592
Fitatos y otros Ins*P* 594
Magnesio 600
Calcio 602
Manganeso 605
Cobre 606
Cinc 607
Hierro 608
Ins*P* *vs*. ligandos presentes en la ingesta: secuestro de iones metálicos 610
Especiación química del sistema: dependencia con el nivel de ingesta 615
Especiación química del sistema: dependencia con el tipo de cereal 628
Calidad nutricional de la ingesta: biodisponibilidad de iones esenciales 630
Conclusiones 635
Referencias bibliográficas 636

Sección V. Conclusiones y perspectivas

Capítulo 16: Conclusiones finales y trabajo a futuro 641

Agradecimientos 645

Anexos ..... CD adjunto

"La solución a un problema cambia el problema"
Paul Dickson.

"Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él"
Louis Pasteur.

Agradecimientos

Haciendo honor a la frase de Isaac Newton que finaliza esta sección, deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos "gigantes" que permitieron que esta tesis llegara a buen puerto.

- En primer lugar a mis directores de tesis, Dr. Carlos Kremer y Dra. Julia Torres, por su paciencia y dedicación para con esta causa,

- a los Profesores David Mansell y Sally Freeman, de la Universidad de Manchester, Reino Unido y Christopher J. Barker, del Karolinska Institutet, Suecia, por la síntesis y el apoyo en todos los aspectos relacionados con el Ins(1,2,3)P_3,

- a los Profesores Andrew Riley, Yasmin Godage y Barry V. L. Potter, del Wolfson Laboratory of Medicinal Chemistry, Department of Pharmacy and Pharmacology, de la Universidad de Bath, Reino Unido, por la síntesis y asesoramiento en relación con el Ins(1,3,4,5,6)P_5,

- al Dr. Sixto Domínguez, de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España, por su dedicación y consejo en todos los pasos del análisis potenciométrico,

- al Dr. Álvaro Díaz, de la Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, por su constante aporte en los aspectos bioquímicos y biológicos del tema,

- al Dr. Jorge Castiglioni, del Laboratorio de Fisicoquímica de Superficies, Facultad de Química, por la adquisición y asesoramiento en los análisis termogravimétricos de las fases sólidas,

- al Dr. Joaquín Sanchíz Suarez y al Dr. Sixto Domínguez, de la Universidad de la Laguna, Tenerife, España, y al I. Q. Luis Mussio del Taller de Instrumentos, Facultad de Química, por la creación y adaptación del programa SAM de registro de medidas potenciométricas,

- a la Dra. Lucía Otero, de la Cátedra de Química Inorgánica, por la realización de los análisis elemental de los sólidos,

- al Dr. Gabriel González Ferrer, el Prof. Antoni Llobet, y los miembros del grupo de RMN, Kerman Gómez e Israel Macho, por la adquisición y asesoramiento en los espectros de RMN de ^{31}P realizados en el ICIQ, España,

- al Dr. Oscar Ventura y su grupo de la Cátedra de Química Cuántica, Facultad de Química, por proveerme de recursos informáticos para realizar parte de los cálculos teóricos de esta tesis,

- al Dr. Fernando Bozoglián, del ICIQ, España, por la asistencia en todo lo relacionado al estudio espectroscópico de los sistemas conteniendo InsP_6,

- a la Dra. Fernanda Cerdá, del Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, por la adquisición e interpretación de los voltamogramas cíclicos,

- al Prof. Luis Panizzolo, del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, por la provisión de bibliografía especializada,

- a la Dra. Barbara Harland, del Department of Nutritional Sciences, College of Allied Health Sciences, Washington, USA, por el envío de reportes de su autoría imprescindibles para este trabajo,

- al Dr. Agustín Sánchez, del Departamento de Química Inorgánica, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, Galicia, España, por la adquisición de los espectros Raman y RMN de ^{13}C de los fitatos sólidos,

- a la Dra. Mariela Pistón, de la Cátedra de Análisis Instrumental-DEC, por el apoyo en las medidas de concentración de iones metálicos por espectrometría de absorción atómica,

- al Prof. Henry Moresco, de la Cátedra de Química Analítica-DEC, por la asistencia en las medidas de iones alcalinos por espectrometría de emisión atómica,

- al Dr. Mario Rivero, por la colaboración en la determinación del contenido de estroncio por espectrometría de absorción atómica, realizado en las instalaciones del Departamento de Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente del LATU,

- a la Lic. Lorena Martínez, la Qca. Livia Arizaga y la Lic. Fiorentina Botinelli por el apoyo en cuestiones relacionadas con el modelado molecular de los complejos metálicos,

- a los doctores Fernando Bozoglián y Carolina Mendoza, por el apoyo personal y académico que me brindaron en mis estancias en Tarragona, España,

- a las instituciones que apoyaron este trabajo: PEDECIBA, CSIC y ANII.

- a todos mis compañeros de Cátedra (a los que no nombro sólo por no arriesgarme a ordenarlos u olvidarme de alguno), por contribuir desinteresadamente en todas las etapas de mi formación académica,

- a mis AMIGOS, en especial a Fernando, por ser uno de los pilares en este camino,

- a mi familia, en particular a mi Padre y mis hermanos, simplemente por haber estado siempre de forma incondicional,

- a mi sobrina, Federica, a quien va dedicada esta tesis.

"If I have seen farther, it is by standing on the shoulders of giants".

Sir Isaac Newton.

Resumen

Las biomoléculas obtenidas por fosforilación del isómero *myo* del inositol constituyen un grupo de más de 25 especies presentes en todas las células eucariotas: los *myo*-inositol fosfatos (Ins*P*). Presentan entre sí una estrecha relación metabólica, encontrándose en concentraciones variables en los distintos compartimentos biológicos. Si bien las funciones biológicas de los Ins*P* están lejos de ser elucidadas, las nuevas ideas sobre el tema destacan la importancia de la interacción de estas moléculas con los iones metálicos. Es así que el estudio de la especiación y estructura química de este tipo de sistemas brindará información de gran valor en la gestión racional de los experimentos *in vitro* con este tipo de biomoléculas, así como en la dilucidación de su función biológica, y en la generación de estrategias de síntesis de agonistas y antagonistas con valor terapéutico.

En este marco, este trabajo ha estudiado el patrón de reactividad química frente a cationes metálicos de los tres inositol fosfatos más relevantes en medios biológicos: InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3. A partir de estudios por potenciometría de alta resolución se lograron determinar las constantes de equilibrio de protonación y complejación en solución para los sistemas conteniendo cada uno de los tres inositol fosfatos mencionados, en ausencia y presencia de cationes metálicos mono o multivalentes. Los resultados indican la existencia, además de las formas libres de ligando y metal, de dos tipos de especies metálicas claramente diferenciadas: complejos 1:1 metal:Ins*P* y complejos polinucleares. La predominancia relativa de cada tipo de compuesto resultó dependiente de algunas características del sistema, como la relación metal:ligando, la naturaleza del metal e inositol fosfato, y el pH. Asimismo, para algunos sistemas conteniendo InsP_6 e Ins(1,3,4,5,6)P_5, se caracterizaron las fases sólidas obtenidas en condiciones de exceso de ion metálico y se determinó su solubilidad. Esto permitió incluir de forma explícita los equilibrios de precipitación respectivos y describir, de forma completa, el comportamiento químico de estos Ins*P* frente a los iones más relevantes desde el punto de vista biológico.

Tomando en consideración el vacío estructural existente en este campo, este trabajo se ha centrado en las características estructurales más importantes de algunas de las especies en solución y al estado sólido. Las técnicas aplicadas incluyeron RMN de ^{31}P en solución, voltamperometría cíclica, cálculos computacionales, espectroscopía UV-visible, infrarroja y Raman, y RMN de ^{13}C al estado sólido. El tratamiento de los datos recabados permitió analizar la secuencia de protonación de los ligandos y su influencia en los procesos de complejación. Por otra parte, un análisis computacional de las preferencias conformacionales de los distintos Ins*P* reveló que mientras que en solución puede operar un cambio conformacional gatillado por el pH y la relación metal:ligando, al estado sólido el InsP_6 parece existir en una mezcla de estados conformacionales o en una conformación distorsionada intermedia.

Los resultados obtenidos fueron finalmente aplicados al modelado del comportamiento químico de los tres inositol fosfatos en medios que simulan el ambiente intra o extracelular, así como en los procesos de digestión.

Capítulo 1

Introducción

En este capítulo se introduce a la estructura, bioquímica y biología de los inositol fosfatos. Se revisan los conceptos relacionados con la isomería y nomenclatura de los diversos derivados fosforilados del inositol. Se abordan de manera general, los múltiples procesos de biosíntesis de los mismos a partir del seguimiento de la evolución de las vías metabólicas más importantes. Con esta información, se detallan las características más sobresalientes del rol de estos compuestos en los sistemas biológicos. Para finalizar, se subraya la importancia metabólica de la interacción de los inositol fosfatos con iones metálicos relevantes a nivel fisiológico y cómo este fenómeno da paso al establecimiento de criterios estrictos para el diseño racional de los experimentos in vitro.

1. Generalidades

El inositol (ciclohexan-1,2,3,4,5,6-hexaol) es una molécula esencial que se encuentra de forma ubicua en los sistemas biológicos [1-3]. La casi totalidad de los inositoles biológicos derivan del isómero *myo*. El *myo*-inositol (figura 1.1) es el poliol cíclico que, en términos de distribución de los grupos hidroxilos sobre el anillo carbonado, retiene la estereoquímica básica de la glucosa, la llamada configuración "d-gluco" [4]. El anillo de inositol está a un paso metabólico de la glucosa, en el cual la glucosa 6-fosfato es convertida en inositol 3-monofosfato en un proceso catalizado en un solo paso. En base a esto, desde un punto de vista estrictamente biológico, esta molécula sería, de por sí, un metabolito extremadamente importante. En efecto, esto es lo que ocurre en la mayoría de los organismos; el inositol es parte central de variadas vías metabólicas, siendo el precursor de todos los demás alcoholes cíclicos y una cantidad enorme de otros compuestos encontrados en la naturaleza. En este sentido, las células vegetales llevan al extremo esta afirmación, transformando al inositol en múltiples derivados químicos de relevancia en un sinfín de procesos biológicos (ver figura 1.1) [4].

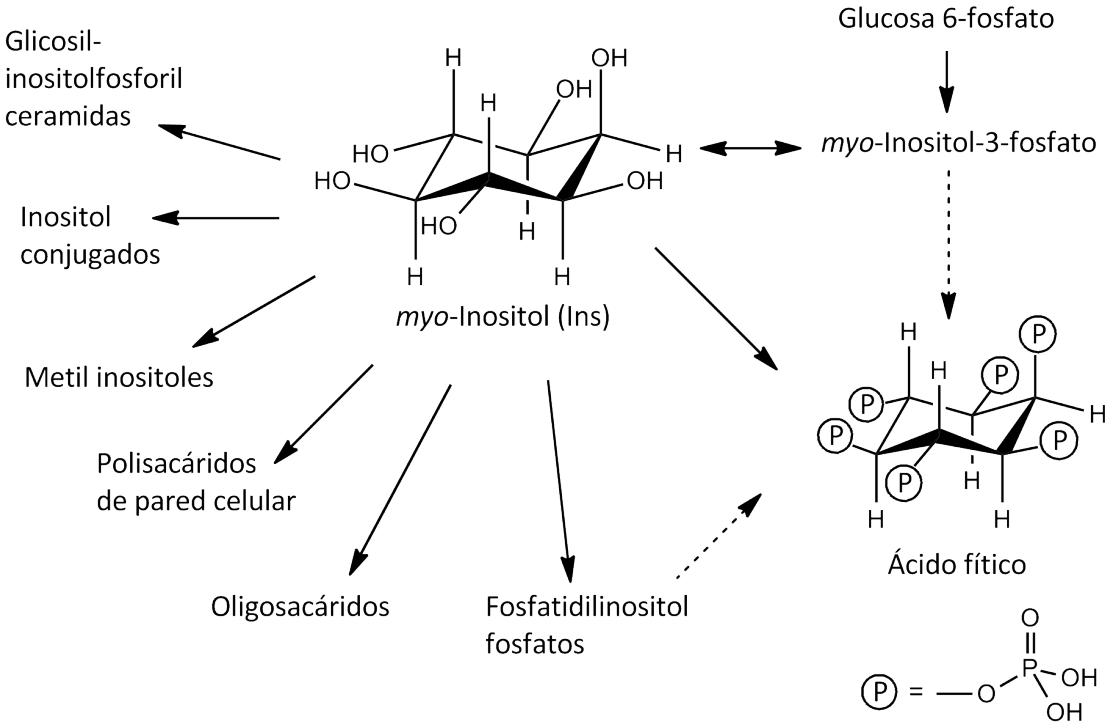


Figura 1.1. Vías metabólicas que utilizan el *myo*-inositol (Ins) y sus productos derivados [5].

La fosforilación del anillo de inositol produce dos familias de compuestos relacionadas metabólica y funcionalmente entre sí: los inositol fosfatos y sus congéneres fosfolipídicos. La investigación de los roles biológicos de ambos grupos ha sido obstaculizada desde un principio por el número enorme de procesos químicos que los interrelacionan, los que además soportan gran parte del andamiaje molecular de sus acciones biológicas a nivel intracelular. Sin embargo, la recompensa potencial de estos estudios es inmensa, dado que los derivados fosforilados del inositol cumplen múltiples funciones en numerosas patologías del ser humano. Esto hace que los estudios de la química, biología y bioquímica de los inositol fosfatos encuentren hoy en día y desde hace cerca de treinta años un campo muy fértil de trabajo, con aplicaciones tan dispares como la prevención y el tratamiento de ciertas afecciones, la generación de nuevos materiales biosensores y hasta la formulación de insumos odontológicos [6-9]. No en vano, un sondeo en Scopus brinda, al momento de la redacción de esta tesis, el colosal valor de 16480 referencias asociadas a la búsqueda "inositol phosphates" en el período 1950-2011.

La primera evidencia en la bibliografía sobre los inositol fosfatos data de los años 1855-1856, cuando Hartig aisló de varias semillas, pequeñas partículas

sólidas de distinta naturaleza que los granos de almidón [10]. A posteriori, estas estructuras resultaron estar constituidas en gran proporción por sales del ácido fítico, el miembro más importante dentro de los inositol fosfatos (figura 1.1). La existencia de los inositol fosfatos ha sido conocida por más de 90 años, desde que Posternak dio el puntapié inicial para la carrera que llevaría a la elucidación estructural de estos compuestos [11]. Sin embargo, según dos expertos en el tema, R. F. Irvine y M. J. Schell, el estudio de, y el interés en estos metabolitos ha encontrado tres impedimentos principales [12]: (1) la existencia de muchos de ellos; (2) la multiplicidad de las vías metabólicas involucradas, que dificulta el entendimiento de la regulación de sus niveles intracelulares; y (3) la compleja relación entre los inositol fosfatos y los variados procesos de señalización celular (en especial aquellos relacionados con el metabolismo del ion Ca^{2+}), que aún hoy hace que la realización de una clasificación biológica conjunta y consistente de todas estas moléculas sea una tarea titánica.

Aunque el rol de estas moléculas ha sido asociado a la transducción de señales provenientes del estímulo de una variedad de hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores[13,14], los roles celulares de los inositol fosfatos no están resueltos aún hoy [15]. Se sabe que las células contienen un amplio espectro de inositol fosfatos, inositol pirofosfatos y fosfolípidos de inositol cuyas concentraciones intracelulares responden de forma muy compleja a estímulos de receptores específicos externos e internos. Es así que la base bioquímica que apoya las múltiples funciones potenciales asociadas a estos compuestos estriba, principalmente, en la diversidad estructural que proveen los derivados fosforilados del *myo*-inositol.

2. Inositol y derivados: estructura y nomenclatura

El inositol es un ciclohexanol, un carbohidrato cíclico con seis grupos hidroxilo, uno sobre cada átomo de carbono del anillo (figura 1.1). El *myo*-inositol es el inositol (de *inos*, músculo en griego) más antiguo conocido; fue aislado de extractos de músculo por Scherer en 1850[16]. A partir de aquí el interés por este ciclitol y sus derivados sintéticos sufrió altibajos. No fue hasta hace cerca de treinta años que la comunidad científica fue testigo de una explosión del interés en esta área, causada por el descubrimiento de nuevos inositoles derivatizados y sus roles críticos en la transducción de señales a nivel celular

[12,17-20]. A partir de allí y hasta el día de hoy se continúa recogiendo evidencia experimental de la importancia del inositol a nivel biológico. Esta molécula ocupa una posición central en el metabolismo, siendo utilizada por los organismos vivos para la biosíntesis de diversos compuestos como inositol fosfatos, fosfoinosítidos, glicosilfosfatidilinositoles, ésteres y éteres de inositol, etc. [12,17,21,22].

A primera vista, el inositol aparenta ser una molécula bastante simple. Sin embargo, analizada en detalle revela múltiples aspectos relacionados con la estereoquímica, quiralidad y conformación moleculares [16,23,24]. Los seis grupos hidroxilo pueden adoptar independientemente una disposición axial o ecuatorial. Este esquema da lugar a nueve estereoisómeros, los que se detallan en la figura 1.2. De los nueve estereoisómeros, el *scyllo*- no posee hidroxilos axiales, el *myo*- tiene uno, los isómeros *epi*-, *chiro*- y *neo*- dos y las variantes *allo*-, *cis*- y *muco*- presentan tres (figura 1.2). De todos ellos, *scyllo*-, *myo*-, *epi*-, *neo*-, *cis*- y *muco*- poseen uno o más planos de simetría, por lo que son no quirales (*meso* compuestos). D- y L-*chiro*- no poseen planos de simetría por lo que presentan quiralidad; en efecto, ambos son imágenes especulares uno del otro. El isómero *allo*- es bastante particular. Como se desprende de la figura 1.2, ambos isómeros conformacionales son, asimismo, formas enantioméricas uno del otro. Aunque la forma *allo*- es quiral, dada la interconversión que existe entre ambos estados conformacionales en solución, el compuesto resulta ópticamente inactivo a temperatura ambiente. Hasta el momento, seis de los nueve estereoisómeros del inositol han sido hallados en la naturaleza: *myo*-, *muco*-, *neo*-, D-*chiro*-, L-*chiro*- y *scyllo*- [25].

El isómero *myo*- es la forma más abundante del inositol en los sistemas biológicos. Ocupa un lugar único en el metabolismo celular debido a que es el único isómero sintetizado *de novo* a partir de la D-glucosa-6-fosfato; el resto de los estereoisómeros derivan de él [4,26]. Es interesante notar que a principios del siglo pasado el *myo*-inositol era llamado *meso*-inositol, debido probablemente a que al igual que el ácido mesotartárico no exhibía capacidad de rotar el plano de la luz polarizada [16]. Al poco tiempo esta nomenclatura cayó en desuso, ya que el resto de los isómeros no quirales del inositol también compartían esta característica. En el año 1954 se introdujo el nombre de *myo*-inositol y, aunque

es un pleonasmo ya que ambos *myo* e *inositol* significan músculo, el nombre persistió hasta nuestros días.

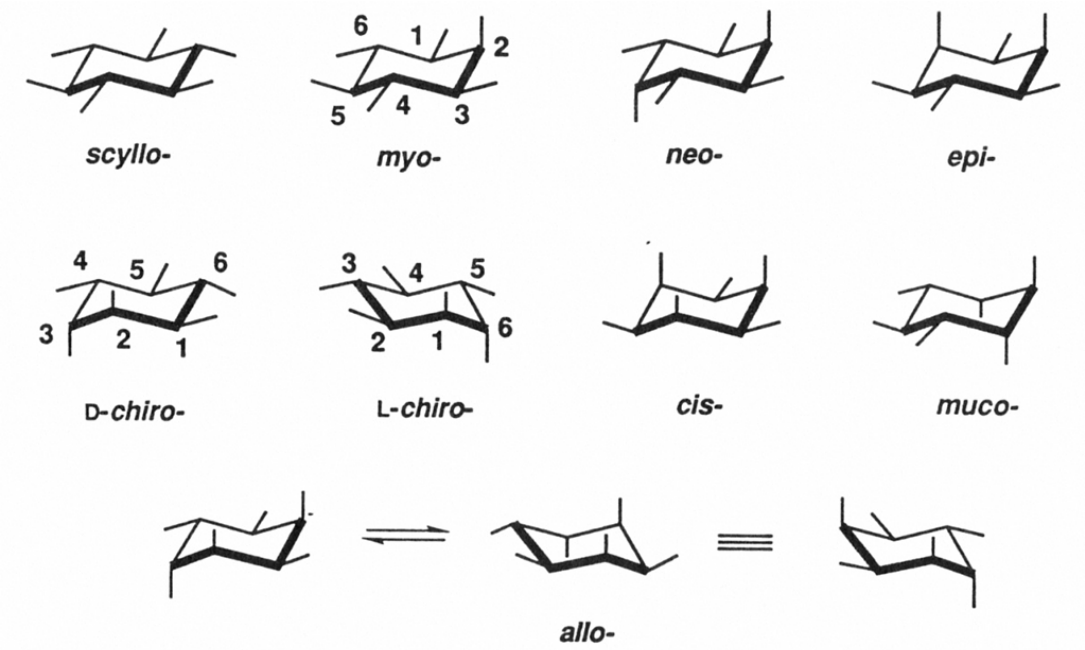


Figura 1.2. Estereoisómeros del inositol. Adaptada de la referencia [24].

Cómo se muestra en la figura 1.3, el *myo*-inositol posee un plano de simetría. Cualquier modificación que perturbe la simetría de la molécula hará de la misma un compuesto quiral. Tómese como ejemplo la fosforilación simple del inositol en uno de los carbonos adyacentes a la posición del grupo hidroxilo axial (figura 1.3D y E). Este proceso destruye el plano de simetría interno y da lugar a dos inositol fosfatos enantioméricos. Esto no ocurre en todos los casos, sino sólo si la sustitución se realiza sobre los carbonos enantiotópicos (C1 y C3 ó C4 y C6 en la figura 1.3B) [25].

Aunque las dos mitades del *myo*-inositol no son estereoquímicamente equivalentes, sí son químicamente equivalentes frente a otras moléculas aquirales. Es decir, ambas partes del *myo*-inositol son idénticas desde el punto de vista de la reactividad química frente a reactivos ópticamente no activos. Sin embargo, la presencia de carbonos enantiotópicos en esta molécula provee de mecanismos estereoespecíficos de interacción proteína-sustrato, los que poseen importancia capital a la hora del análisis de los mecanismos de acción intracelulares del inositol y sus derivados. En particular, una enzima quiral puede fácilmente distinguir entre las posiciones C1 y C3 ó C4 y C6 (figura 1.3),

reaccionando con un carbono enantiotópico en particular. Esto da lugar a productos sustituidos de forma estereoselectiva, que luego amplifican las diversas señales por ser sustratos específicos de otros blancos quirales. Este mecanismo intricado es la base del ajuste fino de los procesos intracelulares de señalización con los que los derivados del inositol han sido relacionados.

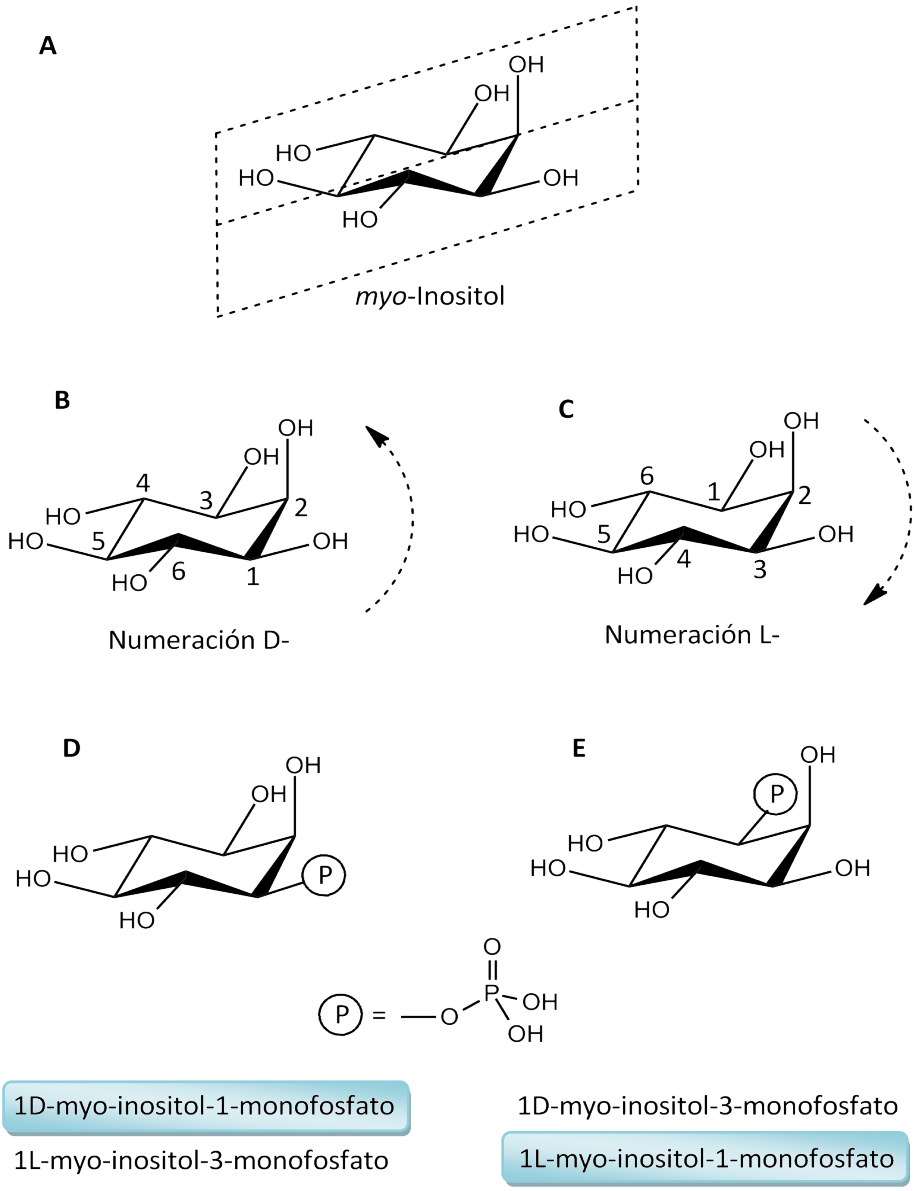


Figura 1.3. Nomenclatura del inositol y sus derivados. En (D) y (E) se resalta la nomenclatura IUPAC de los inositol fosfatos.

Como un ejemplo de este fenómeno, la denominada *myo*-inositol quinasa fosforila al inositol en la posición C3, dando como producto el inositol-monofosfato que se muestra en la figura 1.3E [27,28]. Este compuesto es, de hecho, el mismo que se obtiene a partir de la glucosa-6-fosfato (ver figura 1.1)

[29]. Por otra parte, el otro enantiómero, correspondiente a la figura 1.3D, no se detecta en estas condiciones, y puede biosintetizarse solamente a través de la defosforilación enzimática de un derivado del inositol que contiene dos grupos fosfato en posición 1,4 [25].

Dada la gran variación estructural de los derivados del inositol, tanto desde un punto de vista del arreglo de los sustituyentes como por la consideración adicional de aspectos estereoespecíficos, se hace necesario el establecimiento de reglas de nomenclatura claras, que permitan la identificación inequívoca de cada miembro de la familia. La historia de los inositol fosfatos es una excelente ilustración de que el establecimiento de parámetros de caracterización de la estereoquímica molecular es un procedimiento complejo que evoluciona a través de varios intentos [23-25,30,31]. Dado que el *myo*-inositol es un compuesto meso, para nombrarlo se necesitan dos indicadores: la configuración absoluta (D ó L) y la numeración del anillo carbonado. De acuerdo con las reglas establecidas por la IUPAC en el año 1976 [30], la asignación de ambos parámetros está relacionada con la naturaleza y ubicación espacial de los sustituyentes. En el caso del isómero *myo*-, los sustituyentes son asignados a dos grupos, los que se encuentran por encima y por debajo del plano del anillo. Los carbonos se numeran de forma que los menores descriptores correspondan al grupo con mayor cantidad de sustituyentes. Según se observa en la figura 1.3B y C, existen cuatro hidroxilos encima del anillo, por lo que los átomos de carbono correspondientes se numeran C1, C2, C3 y C5, y dos por debajo, sobre C4 y C6. Asimismo, el carbono 1 debe ser asignado a alguno de los dos carbonos enantiotópicos, es decir, aquellos adyacentes al carbono que posee un hidroxilo en posición axial en la figura 1.3A. Para la asignación se coloca el compuesto de tal forma que el sustituyente sobre el carbono de menor numeración se sitúe por encima del plano del anillo. Sólo entonces, si la numeración se realiza en sentido anti horario, la configuración es D-, y si es a la inversa será L- (ver figuras 1.3B y C). De esta manera, los inositol fosfatos de la figura 1.3D y E podrían nombrarse de dos formas, según se muestra debajo de cada estructura. Esta ambigüedad se soluciona requiriendo que los sustituyentes se encuentren unidos a los carbonos con menor numeración. De acuerdo a esta regla se obtienen los nombres IUPAC para ambas especies, los cuales aparecen resaltados en la misma figura. Estas normas promulgadas por la IUPAC vinieron a resolver el problema de la variación en la nomenclatura

utilizada por los diversos grupos de investigación. Sin embargo, este punto merece un comentario adicional. Antes de 1968, la literatura especializada maneja un tipo de nomenclatura distinta. En este caso, la configuración era fijada por la orientación del carbono quiral de mayor numeración, C6. Dado que este carbono se encuentra *trans* a C1, los compuestos que hoy se nombran D- en esa época surgen reportados con configuración L- y viceversa.

La adhesión estricta a las reglas IUPAC ha traído disconformidad en la comunidad científica, ya que oscurece algunas interrelaciones metabólicas. En detalle, la comparación entre dos especies con configuración D- y L- no es directa a partir de los nombres de los compuestos. Para solucionar esta situación, la *International Union of Biochemistry* (IUB) propuso en 1989 la flexibilización de las reglas IUPAC, permitiendo el uso de ambas nomenclaturas, D- y L-. En este contexto surge el símbolo "Ins", el cual representa al *myo*-inositol numerado según la configuración D-. Como una regla nemotécnica en medio de toda esta compleja situación, Agranoff propone en 1978 su famoso modelo de tortuga (figura 1.4), que a posteriori iba a dar lugar a las portadas y títulos en varios de los libros y *reviews* del tema[32-35].

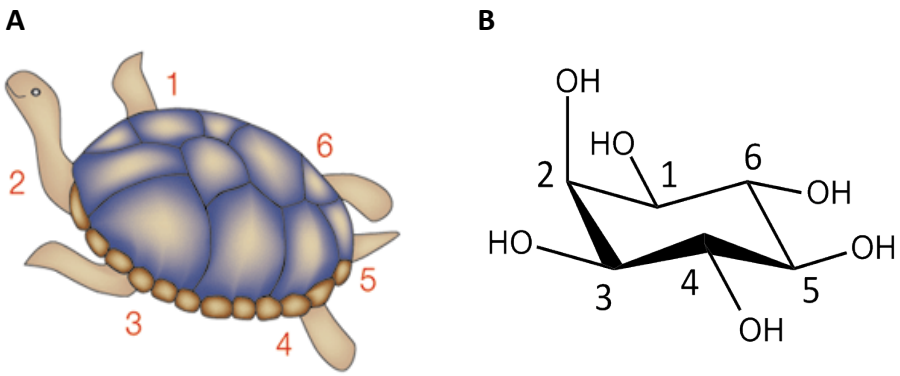


Figura 1.4. (A) Modelo de tortuga de Agranoff. (B) *myo*-inositol.

La idea de Agranoff, plasmada en la figura 1.4, plantea la comparación de la estructura del *myo*-inositol con una tortuga, cuya cabeza representa al grupo hidroxilo axial de C2, mientras que las cuatro patas y cola dan cuenta de los sustituyentes ecuatoriales en el resto de los átomos de carbono. Como herramienta para asistir a la memoria, la pata derecha de la tortuga corresponde al carbono 1, y se numeran el resto de las posiciones de manera anti horaria (configuración D-). En los fosfolípidos de inositol, la pata derecha

une al grupo diacilglicerol. En este trabajo de tesis se seguirá la nomenclatura actual, llamando Ins al *myo*-inositol e Ins*P* a los inositol fosfatos en general. En particular, el patrón de fosforilación y el número total de grupos fosfato se incluirá en la simbología. Como ejemplo, para simbolizar el ácido fítico se utilizará InsP_6, mientras que el *myo*-inositol(1,3,4,5,6)pentakisfosfato se denotará como Ins(1,3,4,5,6)P_5.

Además de lo ya revisado, los inositol fosfatos exhiben otra característica significativa desde el punto de vista biológico: dos posibles confórmeros. Las conformaciones adoptadas en solución por los diversos Ins*P* han sido el tema central de acalorados debates [36-41]. Un entendimiento completo del proceso de cambio conformacional ha sido obstaculizado por los múltiples factores que modulan las energías de los confórmeros, entre ellos, el número, patrón de sustitución y estereoquímica de los grupos fosfato sobre el esqueleto carbonado, el estado de agregación de las especies participantes, solvatación, pH, la presencia de contraiones, etc. En términos generales, se sabe que la conformación en la cual los grupos voluminosos ocupan posiciones ecuatoriales es la más favorecida, sobre todo en el caso de los inositol fosfatos menores (menor grado de fosforilación). Esto implica la disposición de 5 grupos ecuatoriales (C1, C3, C4, C5 y C6), mientras que el sustituyente sobre C2 se mantiene axial (ver figura 1.4B). En este trabajo se llamará a este estado 1a5e. Sin embargo, en contraposición, los inositol fosfato mayores (mayor grado de fosforilación) presentan un comportamiento dual, sufriendo en medio básico una transición conformacional hacia el estado con 5 sustituyentes axiales y uno (en C2) ecuatorial. Para referirnos a esta confomación del anillo, se utilizará la abreviación 5a1e. Este aspecto de la química de los inositol fosfato será revisado en esta tesis, por lo que los detalles del estado del arte en este campo, así como los avances realizados se pospondrán hasta los capítulos de estudio estructural en solución.

Los *myo*-inositol fosfatos con uno o más grupos pirofosfatos han sido detectados en variados organismos [17,21,42,43]. En especial, han sido identificados tres miembros de esta familia, sustituidos con uno o dos grupos pirofosfatos en posición 5 (figura 1.5A), 5 y 6 (figura 1.5 B) y 1 y 5 (no se muestra). La nomenclatura específica que se utilizará a lo largo de esta tesis para este tipo de compuestos se detalla junto con las estructuras. Dos características

estructurales son dignas de mencionar. En primer lugar, ambos inositol pirofosfatos poseen una carga máxima mayor aún que la del fitato (anión del ácido fítico, este último mostrado en la figura 1.1), que de por sí es extremadamente grande (-12). Esto los pone en un lugar único por sus propiedades de interacción con especies catiónicas. Por otra parte, la hidrólisis del enlace pirofosfato es termodinámicamente favorable ($\Delta G^0_{\text{hidrólisis}} \approx$ -7,5 kcal/mol), por lo que estos compuestos tienen la capacidad de donar un grupo fosfato, haciendo que la transfosforilación a distintos inositol fosfatos, proteínas y otras moléculas posea un ΔG negativo. Hoy en día, estos compuestos constituyen el área de mayor crecimiento a nivel de investigación, con grandes aplicaciones potenciales [17,21,42].

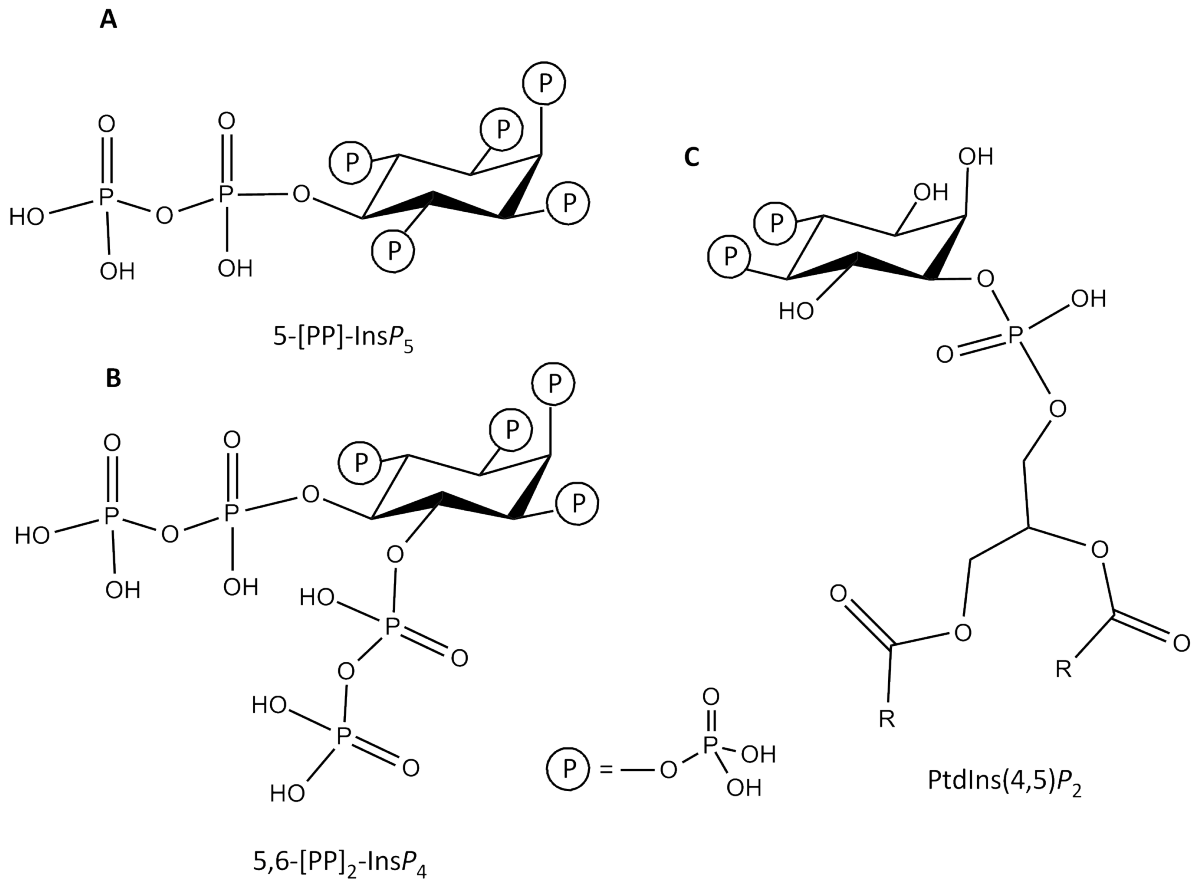


Figura 1.5. (A) y (B) Inositol pirofosfatos. (C) Estructura de un fosfoinosítido. R representa una cadena alquílica.

En la figura 1.5C se esquematiza la estructura de un fosfolípido de inositol típico, también llamados fosfoinosítidos (PtdIns*P*). Esta familia incluye un grupo de compuestos en los cuales los inositol fosfatos se encuentran esterificados en

posición 1 con diacilglicerol mediante un enlace fosfodiéster. La nomenclatura a utilizar[25] se muestra en la misma figura. Una característica intrínseca de los fosfoinosítidos es su gran heterogeneidad estructural. Existe variación en los ácidos grasos esterificados al glicerol, isomería en el inositol y gran diversidad en la posición y grado de fosforilación del anillo[25]. A nivel biológico se han identificado varios miembros de la familia, a saber PtdIns(3)P_1, PtdIns(4)P_1, PtdIns(5)P_1, PtdIns(3,4)P_2, PtdIns(3,5)P_2, PtdIns(4,5)P_2 y PtdIns(3,4,5)P_3. Estos compuestos son extremadamente importantes en algunos de los mecanismos de señalización celular. El rol de los fosfoinosítidos en la transducción de señales fue observado por primera vez al final de la década de 1950 [44], aunque no fue hasta 1983 que se logró el establecimiento del papel que cumplen en estos procesos [45,46]. Desde ese momento, estos derivados del inositol han sido intensamente investigados, lo que ha llevado a descubrir un sinnúmero de nuevos roles biológicos. Como resultado, se han publicado un gran número de *reviews* en este tema [12,17-20,47].

3. Biosíntesis

3.1. Aspectos evolutivos

No se sabe aún hoy cómo y cuándo evolucionó el inositol, ni tampoco cuándo fue sintetizado por primera vez. Si la síntesis fue la misma que la que hoy se conoce (figura 1.6), entonces el primer inositol fosfato conocido fue el Ins(3)P_1. La incorporación del inositol a los lípidos, probablemente por la reacción universalmente conocida de combinación del inositol con ácido fosfatídico activado (CMP-PtdOH, CMP = citidinamonofosfato) para formar fosfatidil inositol (PtdIns), debe haber ocurrido poco tiempo después [32]. Se sabe actualmente que algunos procariotas, como por ejemplo micobacteria, contienen PtdIns [48]. Sin embargo no se han detectado inositol fosfatos derivados de lípidos en procariotas, tal vez porque no existen muchos trabajos científicos en el tema [32]. La ruta por la cual los procariotas metabolizan los fosfolípidos de inositol no se conoce en detalle. Una fosfolipasa D podría generar inositol a partir del PtdIns[49], pero si además existe actividad fosfolipasa C o A, se podrían formar incluso inositol monofosfato o glicerolfosfoinositol. Este último podría dar lugar al Ins(1)P_1 o al inositol, como se ha visto en algunos otros sistemas [50,51].

Con la probable presencia de PtdIns e InsP_1 en procariotas, la cuestión es entonces qué vino luego. Según R. F. Irvine, la cuestión encuentra respuesta en la asunción de que, dado que los fosfoinosítidos e inositol monofosfatos parecen tener existencia limitada en procariotas, los procesos de fosforilación de los mismos a través de diversas quinasas evolucionaron como parte de la expansión eucariota[32] (ver figura 1.6). Las quinasas que reconocen a los inositol fosfatos como sus sustratos pueden ser trazadas hasta los primeros eucariotas, por lo que es probable que la fosforilación subsecuente de los Ins*P* haya sido el siguiente paso evolutivo [32].

PtdIns(4)P_1 y Ptd(4,5)P_2 son ubicuos en células eucariotas hasta donde se conoce. Más aún, todos los genomas eucarióticos caracterizados poseen un gen que codifica la enzima fosfolipasa C, la que cataliza la única vía metabólica que une las dos grandes familias de los derivados del inositol: PtdIns*P* e Ins*P* (figura 1.6). Esta reacción es especialmente importante en levaduras. Estudios con mutantes del organismo *Saccharomyces cerevisiae* muestran que la síntesis de los inositol fosfatos mayores comienza únicamente a partir del Ins(1,4,5)P_3, el cual se obtiene por ruptura del Ptd(4,5)P_2 mediante la acción de la fosfolipasa C [52,53]. En principio, aparentemente el paradigma para la síntesis primordial de los Ins*P* correspondería a un modelo donde tres grupos fosfatos (1,4,5) se encuentran unidos al inositol cuando es parte de un lípido, mientras que el resto se adicionan luego de la liberación del Ins(1,4,5)P_3. La realidad es que existen otros organismos que pueden sintetizar inositol fosfatos sin involucrar lípidos en la ruta metabólica. Algunos amebozoarios y plantas son capaces de producir InsP_6 por dos vías: (a) fosforilando el inositol en posición 3 mediante una inositol quinasa[28,54], y (b) fosforilando secuencialmente el Ins(3)P_1 hasta el InsP_6 [55,56] (ver figura 1.6). En la actualidad, no se tiene claro cómo los mamíferos sintetizan el InsP_6. La ruta generalmente más aceptada involucra la revisada más arriba para levaduras. Por tanto, los primeros tres grupos fosfatos se adicionarían en la fase lipídica mientras que el resto lo haría a partir del precursor Ins(1,4,5)P_3. No obstante, esta última etapa es más compleja que para el organismo *Saccharomyces cerevisiae*, e incluye varios pasos adicionales que vinculan los miembros Ins(1,4,5)P_3, Ins(1,3,4,5)P_4, Ins(1,3,4)P_3, Ins(1,3,4,6)P_4, y finalmente Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6 [57,58].

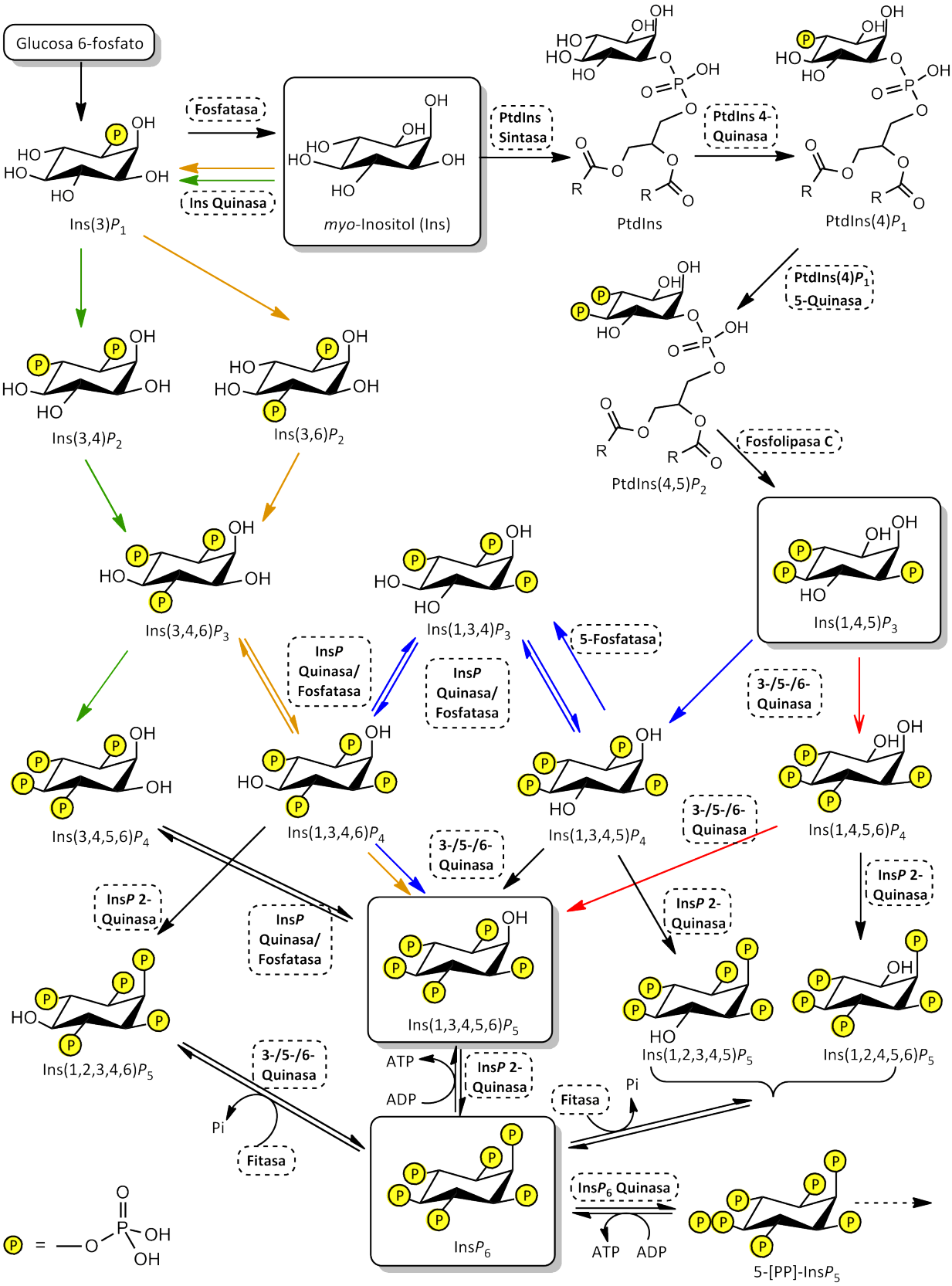


Figura 1.6. Mapa metabólico de la biosíntesis del inositol y sus derivados fosforilados. El color de las flechas marca la sectorización de las vías en los organismos: universal (negro), azul (animales), verde (plantas), rojo (levaduras), ocre (dictiostélidos).

3.2. Vías metabólicas

El mapa metabólico de la figura 1.6 muestra la estructura general de las rutas biosintéticas que dan paso a la generación de los Ins*P*, los PtdIns*P* y los inositol pirofosfatos en diversos organismos. Como se aclaró en la sección anterior, no todos los caminos son accesibles a todos los organismos, por lo que la sectorización de ciertas enzimas en algunos organismos vivos complica aún más el análisis. En términos generales el patrón de reacciones se subdivide en dos grandes secciones: vías tempranas y tardías. Las primeras se encuentran relacionadas con la síntesis y suministro de inositol. Las tardías se asocian a las rutas metabólicas de fosforilación y defosforilación centradas en la generación del inositol fosfato más importante: InsP_6. Esta sección es bastante amplia, por lo que se la suele subdividir en cuatro partes (figura 1.6): dos que conllevan la síntesis de Ins(3,4,6)P_3 e Ins(1,4,5)P_3 a partir de los Ins*P* menores o PtdIns respectivamente, la continuación de las dos variantes anteriores hasta la formación de Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6, y el uso de estos últimos en la formación de inositol pirofosfatos [59].

La única vía biosintética del anillo carbonado del inositol es a partir de la actividad de una enzima llamada MIPS, la cual transforma la glucosa 6-fosfato en Ins(3)P_1 [4]. En levaduras, la regulación de la expresión del gen *Ino1* que codifica esta enzima es central para el metabolismo fosfolipídico [60]. Asimismo, estudios realizados sobre células vegetales han demostrado que la enzima MIPS es regulada en respuesta al estrés [61]. La primera ruta metabólica descrita para la biosíntesis del InsP_6 a partir de inositol fosfatos solubles fue en organismos del género *Dictyostelium*[55] (marcada en ocre en la figura 1.6). La misma comienza con la generación del inositol, el cual se deriva de la defosforilación del producto de la MIPS, Ins(3)P_1, mediante la acción de una monofosfatasa especializada, o por reciclaje del pool intracelular. A partir de allí, la acción conjunta de varias quinasas daba lugar a los inositol fosfatos de mayor grado de fosforilación. A posteriori, Brearley y Hanke propusieron una vía similar en células de lentejas de agua [62], hierbas acuáticas o flotantes de la subfamilia de las Lemnoideae, en donde el mecanismo sintético difería en dos intermediarios: Ins(3,4)P_2 e Ins(3,4,5,6)P_4 (destacada en verde en la figura 1.6).

Los estudios anteriores permitieron relacionar de forma relativamente directa los inositol fosfatos mayores y menores, en el marco del proceso biosintético.

No obstante, este paradigma no se presenta en organismos como los animales o las levaduras. Las características principales del metabolismo de los inositol fosfato en estos sistemas han sido establecidas tanto bioquímica como genéticamente por varios grupos de investigación [52,53,63]. En estos casos, se produce un primer y muy importante miembro de los Ins*P*, el Ins(1,4,5)P_3, a través de la acción de la fosfolipasa C sobre el PtdIns(4,5)P_2. En levaduras, este trisfosfato es convertido en primera instancia en Ins(1,4,5,6)P_4 y luego en el Ins(1,3,4,5,6)P_5 a través de la asistencia en dos pasos de una quinasa codificada por el gen *Ipk2* (en rojo en la figura 1.6). En ratas, se ha encontrado que la versión de esta enzima primero fosforila la posición 3, para luego finalizar con una actividad 6-quinasa que da como resultado, nuevamente, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 [64] (en azul en la figura 1.6). En ambos casos, el inositol pentakisfosfato anterior es convertido a ácido fítico vía una 2-quinasa, codificada por el gen *Ipk1*. De acuerdo con este mecanismo sintético, mutaciones del gen *Ipk2* generan en levaduras la pérdida de capacidad de síntesis del InsP_6 [53].

Las quinasas del Ins(1,4,5)P_3 han motivado muchos estudios adicionales, los que han llevado al establecimiento de nuevos enlaces biosintéticos entre los Ins*P*. Los resultados obtenidos por Schell y su grupo en el año 1999 sobre oocitos de *Xenopus*, han establecido una nueva familia de genes que codifican quinasas capaces de fosforilar al Ins(1,4,5)P_3 y/o al InsP_6 [65]. Cualquiera sea el significado fisiológico o evolutivo de estas proteínas, ellas representan hoy en día un tipo especial de catalizadores biológicos "multifuncionales", los que cierran la brecha metabólica entre los inositol fosfatos y sus congéneres pirofosforilados [64].

Una segunda vía de síntesis del fitato descrita por primera vez en células de mamíferos involucra también los fosfolípidos de inositol, pero el proceso se realiza de un modo más indirecto [66,67] (ver flechas en azul en la figura 1.6). El Ins(1,4,5)P_3 es fosforilado en posición 3, para luego ser hidrolizado en posición 5, dando lugar al Ins(1,3,4)P_3. Este último es posteriormente transformado a Ins(1,3,4,6)P_4 y luego a Ins(1,3,4,5,6)P_5 por acción de quinasas en posición 5 y 6. Este segundo tipo de enzimas no reconoce como sustrato al Ins(1,4,5)P_3 y poseen dos acciones en una, quinasa y fosfatasa, haciendo que algunos de estos procesos puedan revertirse.

4. Derivados fosforilados del inositol en sistemas biológicos

4.1. Generalidades

Las células son constantemente bombardeadas por estímulos de su entorno. Estas señales pueden ser de naturaleza química, como hormonas, patógenos, ozono, etc., o físicas, como cambios en la luz que reciben, temperatura o presión osmótica. Con el objetivo de detectar y trasladar esta información a una respuesta adecuada, las células monitorean constantemente su ambiente. En general, las señales externas son percibidas a nivel de la superficie celular por receptores que transducen la información a través de la membrana plasmática hacia el interior celular, donde se activan cadenas de reacciones específicas. Este mecanismo es extremadamente complejo, y el resultado final es una respuesta fisiológica que puede llevar desde un nuevo nivel en la actividad celular, hasta la diferenciación de la misma [68].

Hace más de 50 años, Mabel y Lowell Hokin publicaron un reporte demostrando que los fosfolípidos de inositol eran rápidamente metabolizados en respuesta a estímulos externos [44]. Este hecho fue el puntapié inicial para lo que en un futuro sería un campo muy amplio y fértil de estudio: los derivados fosforilados del inositol como pilares en los mecanismos de transducción de señales. Se ha encontrado, fruto de intensas investigaciones realizadas desde este descubrimiento, que diversos estímulos como factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, señales de diferenciación y desarrollo, citoquinas e incluso la luz activan complejos programas moleculares que llevan a la producción diferencial de inositol fosfatos y fosfolípidos de inositol (una interesante revisión del tema puede encontrarse en[69]). La compartimentalización de las vías agrega un aspecto más de complejidad al análisis. En suma hasta el momento, por encima de 30 inositol fosfatos, pirofosfatos y fosfolípidos de inositol han sido identificados en células eucariotas, muchos de los cuales ni siquiera tienen una función biológica certeramente asignada. En la jerga de este campo de estudio, se les denomina a estos miembros "inositoles huérfanos".

Dado el mapa metabólico discutido en la sección anterior, queda clara la complejidad del metabolismo del inositol y sus derivados. Es esta complejidad la que soporta el andamiaje de la gran mayoría de las funciones potenciales que han sido asociadas a estas moléculas. No obstante, la transducción de

señales no es el único tipo de roles biológicos asociados a los inositoles. Los derivados del inositol, y por sobre todo los inositol fosfatos, poseen una gama de otras características que los hacen adecuados para el cumplimiento de funciones que van desde el almacenaje de nutrientes y energía, hasta la protección estructural y oxidativa de las células.

4.2. Fosfolípidos de inositol

Clásicamente, los lípidos de inositol, como el PtdIns(4,5)P_2, eran considerados como precursores de moléculas mensajeras, la mayoría de las cuales participan en procesos de señalización asociados al volcado de las reservas de calcio intracelular. Sin embargo, en la década de 1990 una serie de descubrimientos motivaron un replanteo de los paradigmas existentes en este sentido. En primer lugar, la revelación de rutas metabólicas dependientes de una 3-quinasa cuyos productos no son sustratos de la fosfolipasa C, enfatizó la idea de que algunos de los fosfolípidos de inositol eran moléculas de señalización ancladas a la membrana celular [70]. De hecho, en la actualidad está bien documentado que el PtdIns(4,5)P_2 regula por sí mismo y de forma independiente la organización de la actina, la secreción y el tráfico de membrana[71-73]. En segundo término, la identificación de múltiples tipos de 5-fosfatasas codificadas por una larga familia de genes, muchas de las cuales no se relacionan con los eventos de señalización que implican la liberación del Ca^{2+} intracelular, condujo a la idea de que los roles de estos lípidos de membrana no estaba limitado a estos procesos [74].

Los fosfoinosítidos se encuentran en las células en muy bajas concentraciones, todos anclados a la membrana celular. El fosfatidilinositol es el más abundante, constituyendo cerca del 90 % de los lípidos de inositol. Del 10 % restante, 9 % corresponden a PtdIns(4)P_1 y PtdIns(4,5)P_2 y 1 % a los otros miembros de la familia[25]. La relevancia de su rol en el proceso de señalización celular ha promovido y expandido su estudio. Varios PtdIns*P* han sido descritos interaccionando fuertemente con proteínas, afectando su actividad y/o localización [18]. Estas proteínas afines a los fosfoinosítidos posteriormente reclutan y regulan proteínas de señalización específicas que median variados procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento celular, proliferación, apoptosis, la acción de la insulina, ensamblado del citoesqueleto y el tráfico

vesicular. El control espacio-temporal del proceso de transducción requiere la modulación específica de la generación y el recambio de los fosfoinosítidos correspondientes, vía enzimas especializadas con características quinasa y fosfatasa [15].

Existen cinco grupos hidroxilo libres en la molécula de PtdIns (figura 1.6). Al momento se sabe que tres de ellos, aquellos sobre C3, C4 y C5, se sustituyen por grupos fosfato *in vivo* [18]. En total, se han identificado ocho fosfolípidos derivados del inositol, los que se muestran junto con las enzimas que catalizan su biosíntesis en la figura 1.7. Los niveles intracelulares de los distintos miembros de la familia están estrictamente regulados por enzimas que los metabolizan. Son las perturbaciones de esta red de vías metabólicas las que redundan en diversas patologías y definen, hasta lo que conocemos hoy en día, las funciones biológicas de los fosfoinosítidos.

Las PI3K son un grupo de quinasas que atrajo la atención de los investigadores en la década de 1980, cuando se descubrió que ciertas células cancerosas poseían una actividad anormalmente alta de las mismas [75]. Las PI3K son capaces de fosforilar específicamente PtdIns, PtdIns(4)P_1 y PtdIns(4,5)P_2 en posición 3, dando lugar a los productos PtdIns(3)P_1, PtdIns(3,4)P_2 y PtdIns(3,4,5)P_3. La enzima que cataliza la formación de este último es activada por receptores tirosin-quinasa y el PtdIns(3,4,5)P_3, que normalmente se encuentra en muy bajas concentraciones, actúa como segundo mensajero reclutando otras proteínas hacia la membrana celular. Una de estas proteínas, la llamada AKT, es fosforilada en estas condiciones, lo que provoca su activación. En este estado activado, la AKT fosforila una multitud de otras proteínas que regulan los procesos de metabolismo de la glucosa, proliferación celular, crecimiento celular y sobrevivencia [76]. La activación de este proceso PI3K/AKT ha sido asociada a una multitud de formas de cáncer en seres humanos [15]. La proteína denominada PTEN, capaz de defosforilar en posición 3 al PtdIns(3,4,5)P_3 es otro de los pilares en la regulación de todos estos procesos celulares [77,78]. Al provocar la disminución de este fosfoinosítido, se desactiva la cascada de eventos PI3K/AKT, por lo que la disfunción de los genes que codifican esta proteína provoca cáncer de mama, próstata, endometrio, renal, glioblastomas, melanomas y meningiomas [79].

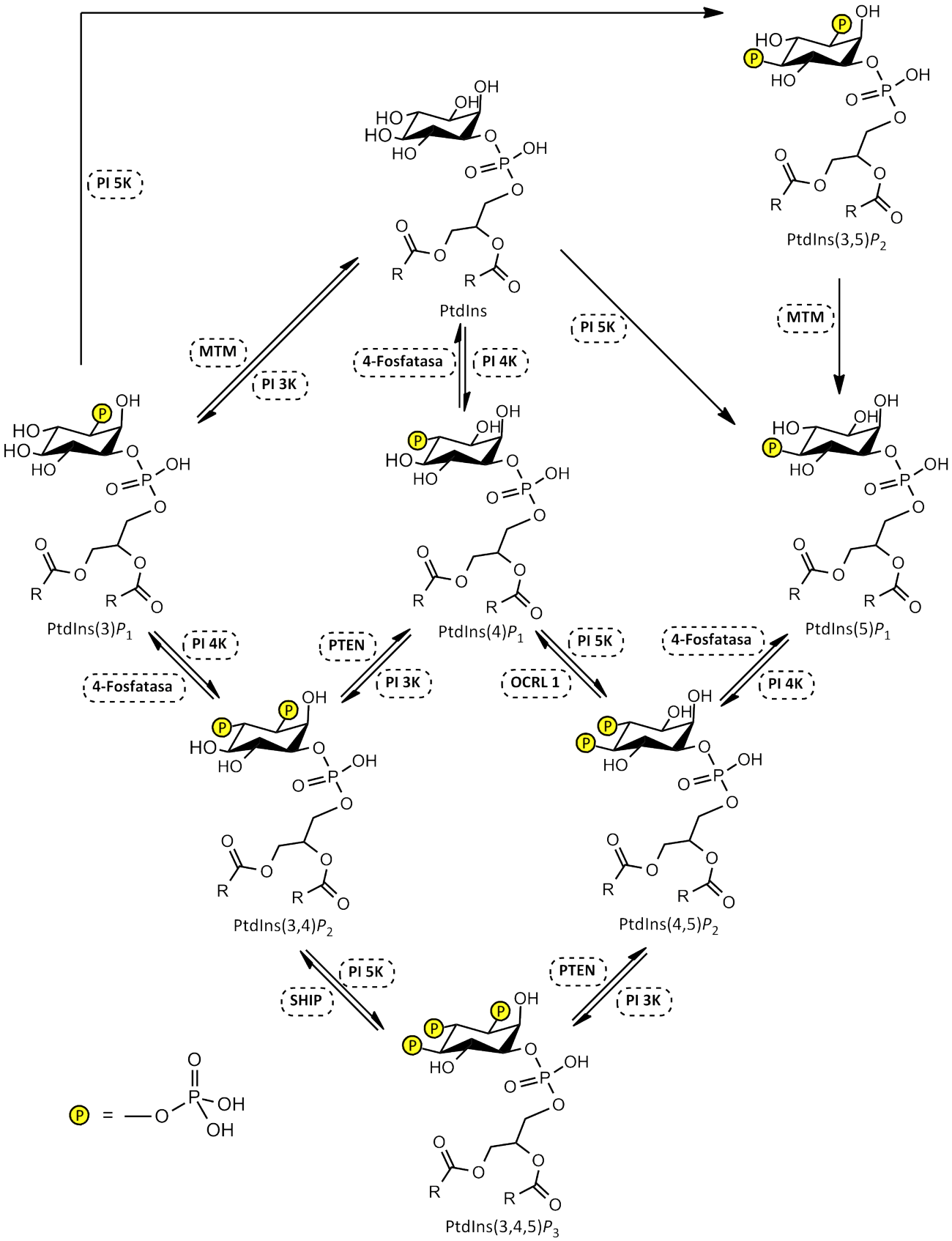


Figura 1.7. Rutas biosintéticas de los fosfolípidos del inositol. Adaptada de [15].

En una situación similar se encuentra la enzima SHIP, la cual es considerada un regulador eficiente del par PI3K/AKT, metabolizando rápidamente el PtdIns(3,4,5)P_3 a PtdIns(3,4)P_2 [80,81]. Consistente con esto, la expresión de esta proteína y su vida media decaen de forma muy importante en células neoplásicas de pacientes con leucemia [82].

Otra de las consecuencias de la activación de la proteína AKT es, como se mencionó más arriba, la regulación del metabolismo de la glucosa. AKT fosforila a otra proteína, la llamada GSK-3, la que constituye una de las bases del proceso de captación de glucosa mediado por la insulina [83]. De la misma manera, PTEN y SHIP tienen, por promover la disminución en la concentración del PtdIns(3,4,5)P_3, un efecto directo sobre la captación de glucosa, disminuyendo la entrada del azúcar a la célula [84-86]. En el año 2004 se realizó un descubrimiento muy importante. El último de los fosfolípidos de inositol en ser descubierto, el PtdIns(5)P_1, es un intermediario en el proceso de transporte de glucosa a las células mediado por la insulina. Se ha logrado establecer que su blancos de acción se encuentran tanto en la señalización de la insulina, como en la traslocación del azúcar a través del transportador GLUT4 [87].

Los fosfoinosítidos PtdIns(5)P_1 y PtdIns(3,4,5)P_3 no son los únicos que ejercen por sí mismos roles como segundos mensajeros. Se ha logrado establecer que la síntesis y ruptura de PtdIns(4)P_1 regula el funcionamiento del citoesqueleto, el aparato de Golgi y el trafico vesicular. En concordancia, varios estudios recientes proveen de evidencia consistente sobre una relación estrecha entre este PtdIns*P* y los procesos de secreción celular [88-92].

Existe una patología adicional que en estos últimos años ha cobrado importancia en el marco de las investigaciones en este campo. El síndrome de Lowe es un desorden bastante raro caracterizado por cataratas, retardo mental y disfunción renal severos. Llamado también síndrome OCRL, el gen responsable de su aparición logró ser clonado y varias mutaciones pudieron ser identificadas [93-96]. Este gen codifica, sorprendentemente, una de las fosfatasas que regulan el nivel celular del PtdIns(4,5)P_2, por lo que su deficiencia provoca un desajuste en las concentraciones de los diversos PtdIns*P*, provocando consecuencias a nivel de varios órganos del paciente.

4.3. Pirofosfatos de inositol

Los inositol pirofosfatos (ver figuras 1.5A, 1.5B y 1.6) son una clase particular de metabolitos que fueron primeramente identificados en dictiostélidos [97] y luego en extractos de células de mamífero tratadas con fluoruro [98]. Su concentración intracelular se encuentra por debajo del rango micromolar, correspondiendo a menos del 5 % la concentración de InsP_6. Una excepción es *Dictyostelium discoideum*, el que presenta niveles tan altos de estos metabolitos (100 - 200 µM) que pudieron ser purificados de este organismo y su estructura consiguió ser resuelta por medio de espectroscopía de RMN [99]. Estos derivados del inositol son de hecho más cargados en su forma aniónica que los inositol fosfato mayores, los cuales se creía en aquel momento que imponían un límite a la carga máxima negativa que una molécula pequeña podía soportar. De forma subsecuente, dos grupos de investigación identificaron y caracterizaron estas moléculas [98,100], encontrando dos inositol pirofosfatos en mamíferos, a saber 5-[PP]-InsP_5 y 5,6-$[PP]_2$-InsP_4, cuyas estructuras se detallan en las figuras 1.5A y B. Hoy en día se sabe que, al menos en células de mamíferos, existe otro miembro de esta familia: el 1,5-$[PP]_2$-InsP_4 [43]. El siguiente gran paso en este campo lo constituyó la identificación de las quinasas del InsP_6 (IP6K), que unen a esta familia de compuestos con los inositol fosfatos (figura 1.6) [101]. Se documentó que la síntesis de los pirofosfatos de inositol requiere la acción de la fosfolipasa C, y la consecuente transformación del Ins(1,4,5)P_3 en inositoltetrakisfosfatos, pentakisfosfatos y hexakisfosfato [53]. Las IP6K son un grupo de quinasas miembros de una gran familia altamente conservada en la evolución [17]. La pérdida de actividad en estas enzimas resulta en variados defectos a nivel celular, incluyendo recombinación aberrante de ADN y anomalías en la morfología vacuolar, expresión genética, quimiotaxis, estrés osmótico y longitud de los telómeros [12,102-106]. Estos hechos, junto con estudios recientes en la genética y bioquímica de las quinasas del inositol en células eucariotas han vigorizado la investigación en esta área. Esto ha permitido revelar nuevos y variados roles biológicos potenciales para estos reguladores moleculares, como exportación del ARN mensajero, transcripción, remodelado de la cromatina, metabolismo del ADN, entre otros [12,17,107].

La energía libre para la hidrólisis del enlace pirofosfato ha sido estimada teóricamente en -6,6 kcal/mol, siendo similar a la correspondiente al ATP (-7,3

kcal/mol) [100]. Más aún, la gran repulsión electrostática, además de las restricciones estéricas que establecen los dos grupos fosfatos vecinos, sugieren que en el 5,6-$[PP]_2$-InsP_4 este parámetro puede ser todavía menor [108]. En esta línea de razonamiento, los científicos comenzaron a pensar en estos compuestos como potenciales agentes fosforilantes, extendiendo aún más los horizontes de sus roles biológicos. En efecto, en mamíferos estos metabolitos se recambian continuamente de forma muy rápida, por lo que se los ha asociado al sistema de generación de ATP, a través de su participación en el aporte de energía para los procesos de formación vesicular y sistemas de transporte [109].

Realizando un abordaje principalmente bioquímico, Saiardi y sus colaboradores han demostrado que el producto de la IP6K, el 5-[PP]-InsP_5, es capaz de donar de forma no enzimática un grupo fosfato a blancos proteicos específicos, en un proceso que requiere del ion magnesio(II) como cofactor [110]. A través de experimentos diseñados de forma estratégica, estos científicos han dado evidencia sustancial de cuál es el grupo fosfato donado y de que una de las proteínas objeto de fosforilación es la llamada Nsr1, la versión en levaduras de la nucleolina, una proteína involucrada en la biogénesis de los ribosomas. Posiblemente el aspecto más interesante de este trabajo es que define un nuevo mecanismo en el marco de la biología de los segundos mensajeros, ubicando a los pirofosfatos de inositol en la mira de las personalidades más importantes en el campo de la señalización celular.

4.4. Inositol fosfatos

Se cree que los inositol fosfatos son capaces, al igual que sus congéneres lipídicos y pirofosforilados, de participar en la transducción de señales a nivel celular, transfiriendo información asociada a estímulos hormonales, factores de crecimiento y neurotransmisores [13,111]. Como se ha mencionado varias veces en este mismo capítulo, las células contienen un *pool* de inositol fosfatos bastante grande; las concentraciones totales reportadas van desde 1 mM en *Dictyostelium discoideum* a 50 - 100 µM en células de mamífero[112]. Muchos de estos Ins*P* responden a la estimulación de ciertos receptores a nivel de la membrana celular, generando múltiples y complejos cambios en el patrón de distribución y compartimentalización de los miembros de la familia. Esto

constituye la base de varios procesos intracelulares que, al fallar, ocasionan muchas de las enfermedades que hoy conocemos.

Sin embargo, la gran mayoría de los roles propuestos son sólo potenciales y un gran número de Ins*P* son aún considerados "huérfanos". En la actualidad, los expertos reconocen que en gran medida esto se debe a la compleja química que presentan, lo cual genera artefactos experimentales que en muchos casos provocan que los resultados hayan sido malinterpretados [21,32].

4.4.1. Ins(1,4,5)P_3

Berridge, Irvine y su grupo de trabajo descubrieron, en 1983, que el Ins(1,4,5)P_3 es capaz de movilizar las reservas intracelulares de calcio, actuando como segundo mensajero en la transducción de señales [46]. A partir de ese momento, el campo de estudio de los inositol fosfatos tendría un nuevo miembro célebre aparte del ya conocido InsP_6, y una gran cantidad de información fue acumulada relacionada con su rol esencial en varias vías metabólicas. En consecuencia, este inositol trisfosfato se transforma en el único de toda la familia con una función clara y probada, y por esto ha llegado ya a los libros de texto de uso académico[113].

La demostración de que el Ins(1,4,5)P_3 induce la liberación masiva del calcio desde las reservas intracelulares sentó las bases para el entendimiento que hoy se posee del recambio de los fosfolípidos de inositol[46] (figura 1.8). Brevemente, este esquema metabólico implica la unión a un receptor de membrana de una molécula mensajera, lo que causa la activación de la fosfolipasa C. Esta enzima metaboliza el PtdIns(4,5)P_2 que se encuentra formando parte de la membrana plasmática, liberando Ins(1,4,5)P_3 y diacilglicerol (DAG) al citosol [12,46,114-116]. El DAG activa varios isómeros de la quinasa C, provocando la fosforilación de sustratos, que la célula gestiona como parte del mensaje [46,117].

Por su parte, el *myo*-inositol-1,4,5-trisfosfato se une a receptores específicos en la membrana del retículo endoplasmático (IP_3R), activándolos y provocando una entrada masiva de calcio al citosol. La existencia de una gran cantidad de estos receptores permite que el Ins(1,4,5)P_3 amplifique sustancialmente su señal. En efecto, se ha reportado que concentraciones citosólicas menores a 5 µM de sustrato son efectivas para desencadenar la respuesta celular[118,119]. El

IP_3R posee una estructura tetramérica similar a otros canales de calcio [120]. Al presente, se sabe que este receptor es modulado por la concentración de calcio, y se ha descrito un mecanismo regulatorio bifásico en hepatocitos, basado en la interconversión de tres estados conformacionales del receptor, los cuales están mediados por dos sitios de unión al metal [121]. La amplia distribución de estos receptores en las células refleja la multiplicidad de funciones del Ins(1,4,5)P_3. Inicialmente se creía que pertenecían sólo al retículo endoplasmático, pero en la actualidad se ha descrito su presencia en el aparato de Golgi, la membrana plasmática, el retículo nucleoplásmico y otros organelos [120,122].

Hasta hace relativamente poco, el rol del Ins(1,4,5)P_3 en la regulación de los niveles de calcio intracelular se juzgaba relevante en células "no excitables", en donde la estimulación del receptor apropiado desencadena una respuesta celular específica, mediada por la cupla Ins(1,4,5)P_3/Ca^{2+} [15]. Sin embargo, dada la ubicuidad de los receptores IP_3R, la afirmación anterior resultó en una simplificación excesiva del sistema. En efecto, en el año 2004 Zima y Blatter reportaron que la liberación de calcio mediada por Ins(1,4,5)P_3 aumentaba la $[Ca^{2+}]_{libre}$ en los alrededores de los receptores de rianodina, facilitando el proceso de vertido de calcio durante el acoplamiento excitación-contracción de células cardíacas de gato [123]. Más aún, a través de este mecanismo el Ins(1,4,5)P_3 se predice como un componente importante en el desarrollo de las arritmias provocadas por este metal.

El calcio liberado actúa como un poderoso mensajero y ejecutor de múltiples cambios a nivel celular [111]. Muchas funciones están directa o indirectamente relacionadas con la concentración de calcio libre. Las características temporales, espaciales y de amplitud de las fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_{libre}$ son muy importantes y están estrictamente reguladas, ya que la célula extrae información específica de ellas. Es por esto que las mutaciones que causan la alteración de la homeostasis del calcio no son compatibles con la vida [124]. Las mutaciones o anormalidades relacionadas, por ejemplo, con las proteínas involucradas en la regulación de la $[Ca^{2+}]_{libre}$, que causan muy pequeñas alteraciones en los niveles de actividad proteica *in vitro*, usualmente conllevan en los organismos vivos a un amplio espectro de enfermedades, como

Alzheimer, patologías del músculo esquelético, síndromes cardíacos, defectos visuales, enfermedades cutáneas, entre otras [125].

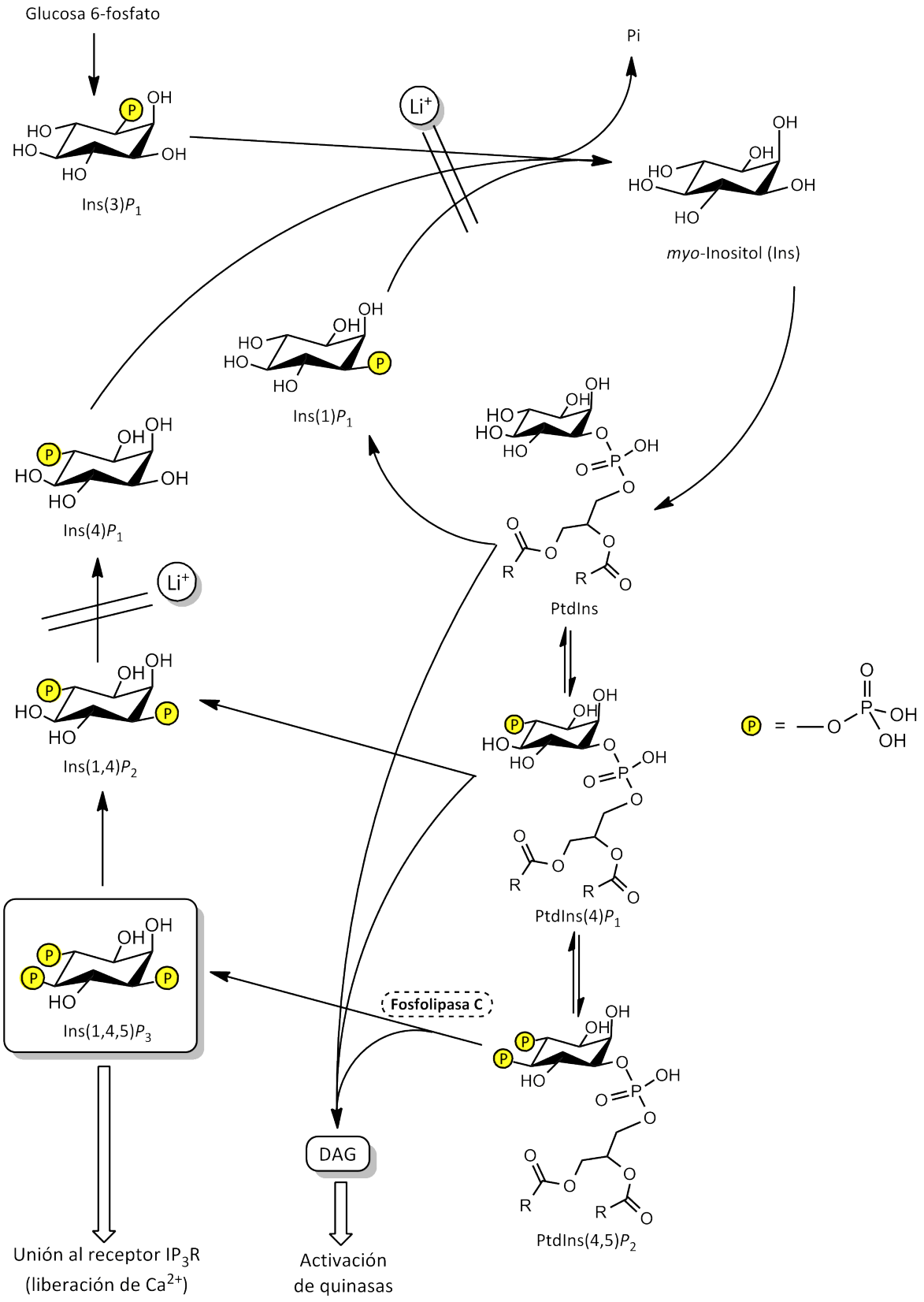


Figura 1.8. Recambio de los fosfolípidos de inositol. Se indican las vías inhibidas por el Li^+.

De todas estas patologías, las relacionadas con desórdenes neuronales se encuentran entre las más estudiadas. El desorden bipolar es una afección aún hoy estudiada intensamente, y el mecanismo por el cual se manifiesta es un misterio[15]. Entre las varias drogas estabilizantes del humor, una de las más efectivas en el tratamiento a largo plazo de este desorden es el ion litio. Una de las hipótesis más aceptadas para su mecanismo de acción involucra la baja en el nivel de *myo*-inositol de las células cerebrales, debido a una inhibición no competitiva del litio sobre dos enzimas que catalizan su reposición [13,126] (figura 1.8). Esta disminución en la concentración del Ins altera toda la cadena de mensajeros derivados, incluido el Ins(1,4,5)P_3, provocando un desajuste neuronal importante.

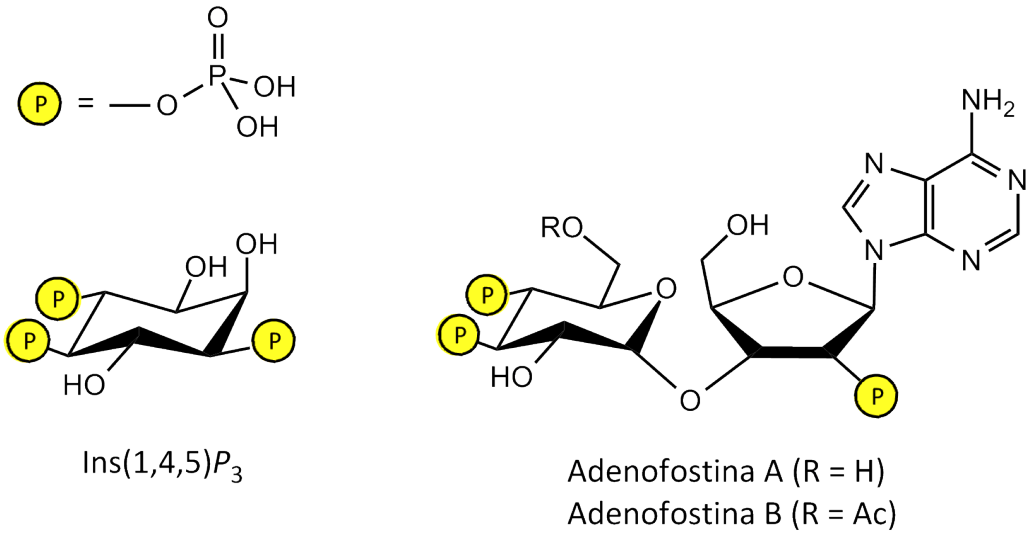
Otra patología relacionada con la pérdida de integridad del mecanismo Ins(1,4,5)P_3/Ca^{2+} es la enfermedad de Alzheimer [127]. De forma interesante, los niveles del receptor IP_3R decrecen significativamente en el cerebelo y secciones superior frontal y temporal del cerebro de pacientes con esta afección. El calcio liberado mediante la asistencia del Ins(1,4,5)P_3 sirve a numerosos procesos en las neuronas, entre ellos la modulación de la excitabilidad de membrana[128], plasticidad sináptica[129] y la expresión de algunos genes[130], por lo que no es extraño que el desequilibrio de la cascada de reacciones de señalización derivadas del Ins(1,4,5)P_3 provoque una degeneración neuronal severa. Este fenómeno es la explicación de otros desórdenes neurológicos asociados a este inositol fosfato, como Parkinson[131], Huntington[132] y ataxia [133].

En este marco, la enorme relevancia del estudio farmacológico de nuevos agonistas y antagonistas de los receptores IP_3R surge naturalmente. Estos compuestos podrían ser usados en un futuro como parte de un programa de prevención y tratamiento seguro y eficaz de las patologías antes descritas. Esto ha llevado a los científicos a una carrera en la búsqueda de nuevos compuestos afines a los receptores del Ins(1,4,5)P_3 con resultados positivos o negativos sobre la actividad de los mismos [134-140]. En 1993, Takahashi *et al*. aislaron dos agonistas inusualmente activos de los receptores IP_3R, denominados Adenofostina A y B, de cultivos del hongo *Penicillium brevicompactum* [141] (ver figura 1.9). Ambos son incluso más afines que el propio sustrato natural, siendo entre 10 y 100 veces más potentes [142]. Este tipo de compuestos es un ejemplo excelente de como la orientación espacial de los grupos afecta de sobremanera

la actividad biológica correspondiente. Se ha determinado que la enorme preferencia de estos compuestos por los receptores IP_3R se debe no sólo a interacciones muy favorables entre el anillo de adenina de la adenofostina y el sitio activo, sino además que este grupo causa un ajuste fino de la posición de los fosfatos aún mejor que el observado para el sustrato natural Ins(1,4,5)P_3 [136]. En efecto, si se cambia el anillo de purina por otro grupo la afinidad decrece [143], mientras que se obtiene un análogo de igual potencia utilizando guanosina [137].

Este descubrimiento refocalizó el esfuerzo en esta área. En el año 2009 B.V.L. Potter y su grupo sintetizaron y caracterizaron el agonista del receptor IP_3R más potente entre los sustratos bisfosfato y el primer agonista sin el motivo 4,5 bisfosfato, demostrando que este esquema de fosforilación no es relevante para la actividad biológica [138]. Este campo continúa en crecimiento, y no se restringe estrictamente al desarrollo de agonistas. Al momento de la redacción de la presente se encuentran en la bibliografía especializada ejemplos recientes que incluyen, asimismo, la síntesis de antagonistas basados en inositol de los receptores IP_3R y de la 3-quinasa[139].

Aunque el Ins(1,4,5)P_3 es el inositol trisfosfato con mayor número de estudios reportados, existen otros que también han sido analizados. Como ejemplo, tómese el Ins(1,2,6)P_3, el cual no se une a los receptores IP_3R, por lo que no ejerce, hasta donde se conoce, funciones dentro del sistema de señalización celular. Sin embargo, ha sido caracterizado como un compuesto con propiedades antiinflamatorias y analgésicas [144-146].



Ins(1,4,5)P_3

Adenofostina A (R = H)
Adenofostina B (R = Ac)

Figura 1.9. Estructura del Ins(1,4,5)P_3 (A) y Adenofostina (B).

4.4.2. Ins(1,4)P_2

La importancia del Ins(1,4,5)P_3 como segundo mensajero en múltiples rutas intracelulares ha llevado al análisis de las funciones de otros inositol fosfatos. La culminación del proceso de señalización dependiente de Ins(1,4,5)P_3 se realiza mediante una 5-fosfatasa, que convierte este sustrato en Ins(1,4)P_2 (ver figura 1.8). Este último, es metabolizado a su vez por otra fosfatasa, la cual da lugar al Ins(4)P_1 que por defosforilación devuelve inositol libre a la célula. Hasta el momento no se han encontrado inositol monofosfatos con funciones fisiológicas definidas. Sin embargo, el Ins(1,4)P_2 ha sido reportado en relación con la estimulación de la α-polimerasa asociada al ADN[147] y se cree que puede cumplir un rol importante en el control de la replicación del material genético [148]. Más aún, a nivel cardíaco, este inositol bisfosfato es el inositol fosfato de mayor liberación (más aún que el Ins(1,4,5)P_3) en condiciones de estimulación adrenérgica, pero se reduce en un gran porcentaje durante la isquemia global miocárdica [116].

4.4.3. *myo*-inositol tetrakisfosfatos

De los miembros tetrafosforilados del inositol, cuyas concentraciones intracelulares han sido estimadas por debajo del rango micromolar[149], el Ins(1,3,4,5)P_4 junto con su producto catabólico inmediato, el Ins(1,3,4)P_3, se encuentran dentro de los primeros en ser descubiertos [115]. Una de las funciones más importantes del Ins(1,3,4,5)P_4 es que protege al Ins(1,4,5)P_3 de la hidrólisis, probablemente por competencia por la enzima 5-fosfatasa [150]. Este tetrakisfosfato posee por esta enzima hidrolítica 10 veces más afinidad que el Ins(1,4,5)P_3. Adicionalmente, el Ins(1,3,4,5)P_4 actúa sinérgicamente con el Ins(1,4,5)P_3 en el proceso de movilización de las reservas de calcio intracelulares [151,152]. Posiblemente el aspecto más sorprendente de este miembro es que, en las células endoteliales[153] y en las neuronas[154], el Ins(1,3,4,5)P_4 puede activar los canales de calcio de la membrana plasmática de forma completamente independiente del Ins(1,4,5)P_3.

Otro inositol fosfato tetrafosforilado que ha atraído la atención de los científicos es el Ins(3,4,5,6)P_4. En células epiteliales, este Ins*P* es un inhibidor

fisiológico significativo de los canales de Cl^- regulados por calcio, por lo que hoy se lo considera como un regulador de la secreción de cloruro [155]. Esta activación parece dividirse en dos etapas, una de activación inicial y otra final de gran inhibición[156]. La trascendencia de este mecanismo es particularmente importante en pacientes con fibrosis quística.

Dado que se ha demostrado que pequeños cambios en los niveles de Ins(3,4,5,6)P_4 intracelulares provocan efectos dramáticos en el flujo celular de Cl^- [157,158], desde el punto de vista fisiológico es extremadamente importante para la célula mantener la homeostasis de este Ins*P*. Esto se logra por un mecanismo de fosforilación y defosforilación, que relaciona el Ins(3,4,5,6)P_4 con su congénere Ins(1,3,4,5,6)P_5, estrictamente regulado y catalizado por una única enzima[159] (ver figura 1.6). Gracias al trabajo del grupo de Stephen Shears, hoy se sabe que el Ins(1,3,4)P_3 inhibe competitivamente la actividad quinasa de esta proteína, mientras que la actividad fosfatasa no se ve alterada [160-162]. Este descubrimiento consagró un logro muy importante en este campo, al vincular dos fenómenos aparentemente inconexos que ocurrían a nivel celular: la activación de los procesos de señalización celular y el incremento y decrecimiento consecuentes en los niveles de Ins(3,4,5,6)P_4 e Ins(1,3,4,5,6)P_5 respectivamente[163]. Cuando la célula recibe un estímulo apropiado activa la fosfolipasa C, la cual, como ya se ha mencionado, libera al medio Ins(1,4,5)P_3 (figura 1.6). El aumento en la concentración de este metabolito provoca, en animales, un aumento en los niveles de Ins(1,3,4)P_3, el cual al inhibir la actividad quinasa de la enzima anterior provoca una acumulación del Ins(3,4,5,6)P_4 en perjuicio del Ins(1,3,4,5,6)P_5.

Finalmente otro miembro, el Ins(1,4,5,6)P_4, muestra propiedades biológicas diferentes. Este Ins*P*, en concentraciones en el rango micromolar, inhibe la incorporación de timidina a las células cancerígenas, por lo que impide su proliferación [164]. Estudios recientes han revelado que el Ins(1,4,5,6)P_4 está asociado además a una correcta regulación genética y control del proceso transcripcional [165]. En palabras de Bernard Spiess, estos avances permiten avizorar el desarrollo a futuro de una nueva área de diseño de drogas anticancerígenas [166].

4.4.4. Ins(1,3,4,5,6)P_5

De los seis isómeros pentafosforilados del inositol, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 fue el primero en ser caracterizado en extractos biológicos [167]. Ha sido identificado, luego del InsP_6, como el miembro más abundante en células de mamífero[168], con una concentración intracelular del orden de 15 a 50 µM [169]. Bastante interesante resulta el hecho de que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 es, en sí mismo, un potente antagonista de los receptores IP_3R, efecto que tiene consecuencias fisiológicas en la alteración de la cascada de eventos de señalización asociados al vertido de calcio [170]. Sin embargo, uno de los roles biológicos más extensamente documentados de este inositol fosfato es el de modular la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno[171]. Se ha reportado, que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 es capaz de regular la interacción proteína-O_2 mediante la unión al sitio activo de la proteína a través de interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno[172].

Sobre estos roles potenciales, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 muestra otras características que lo asocian a otras funciones a nivel fisiológico. En particular, se ha encontrado que puede afectar la velocidad de proliferación celular[173,174] y modular respuestas apoptóticas[174]. Este miembro regula asimismo el ensamblaje viral[175] y el remodelado de la cromatina [176].

4.4.5. *myo*-inositolhexakisfosfato (fitato, InsP_6)

4.4.5.1. Ocurrencia y distribución

La fosforilación del inositol en las seis posiciones del anillo da lugar al inositol fosfato de mayor abundancia en sistemas biológicos, el InsP_6. Como cabeza de familia constituye un nodo en varios procesos metabólicos, alcanzando una concentración intracelular entre 10 y 100 µM [149,177-182]. El descubrimiento del fitato tiene su origen en 1855-1856, cuando T. Hartig aisló pequeñas partículas de varias semillas[183,184]. Supuso que estas partículas eran una reserva natural de nutrientes para la germinación de las semillas y el crecimiento vegetal. En 1872, Pfeffer[185] amplió la caracterización de los granos aislados por Hartig, y clasificó los compuestos químicos que contenían en tres grupos: cristales de oxalato de calcio, proteínas y un compuesto que no reaccionaba positivamente en pruebas para la detección de proteínas, grasas o sales inorgánicas. Lo

interesante es que este compuesto se encontraba presente en cada una de las 100 diferentes semillas que logró examinar. Luego de un largo trabajo, Pfeffer describió morfológicamente este tipo de estructuras, las cuales llamó "globoides", como de formas esferoidales, las cuales se agregaban para formar estructuras más complejas. Determinó además que no presentaban nitrógeno en su composición, pero detectó calcio, magnesio y fósforo, por lo que sugirió la combinación de fosfatos con un carbohidrato. Estudios posteriores realizados por Palladin[186] y Schulze y Winterstein[187] establecieron la denominación "ácido inositol-fosfórico" como más apropiada para los globoides de Pfeffer, ya que su hidrólisis daba como productos inositol y ácido fosfórico.

A partir de aquí, el campo de los inositol fosfatos se amplió a una larga serie de extensos estudios estructurales, con el objetivo de la elucidación de la forma química de este ácido inositol-fosfórico (por tres minuciosas revisiones del tema ver los reportes de Rose[10], Mellanby[188] y Reddy[189]). Sin embargo, la estructura química precisa iba a eludir a los investigadores por los siguientes 50 años. Las técnicas modernas, incluyendo difracción de rayos X y RMN de ^{31}P apoyaron una de las múltiples propuestas, realizada por Anderson a principios del siglo pasado [190] (ver figura 1.10). En base a esta forma química, se estableció el nombre de *myo*-inositolhexakisfosfato (InsP_6), al cual también se lo denomina ácido fítico, por lo que sus sales pasaron a designarse genéricamente "fitatos". Aquellas sales que específicamente se encontraron en células vegetales asociadas a calcio, magnesio y otros iones metálicos se conocen con el nombre particular de "fitinas". Dado que tanto el ácido fítico como sus sales usualmente aparecen simultáneamente en muchos sistemas biológicos, los investigadores no suelen hacer una distinción entre ambas formas, y se les suele llamar colectivamente "fitatos".

En granos y semillas, los fitatos son la forma principal de almacenamiento de dos nutrientes esenciales: inositol y fósforo [191]. Dichos depósitos constituyen del 1 al 2 % en peso en cereales y oleaginosas, donde el InsP_6 se presenta como la forma principal de fósforo (60 a 90 % del fósforo total). Asimismo, estas sales aparecen también en otros tejidos como los que forman el polen, esporas, raíces y tubérculos. Usualmente estos sólidos se acumulan rápidamente durante el período de maduración, acompañándose de otras sustancias como

almidón, proteínas y lípidos. En las dicotiledóneas, los fitatos están en el tejido embrionario, dentro de organelos llamados vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSV; del inglés *protein storage vacuoles*)[192]. En las semillas de las plantas monocotiledóneas, además de los globoides presentes en el embrión, aparecen depósitos de fitato en la fina capa externa, rica en proteínas, llamada aleurona [193]. Se acepta, en este contexto, que el papel del InsP_6 es contribuir al almacenamiento de fósforo, minerales e inositol, factores para la suplementación de las necesidades biosintéticas de los tejidos en crecimiento durante el período de germinación [12,17,21,59,194,195].

4.4.5.2. Interacción con cationes, proteínas y almidón

La estructura química de los derivados fosforilados del inositol es indicativa de un alto poder complejante. El fitato, anión del ácido fítico (figura 1.10), con sus seis grupos fosfato ionizables, es capaz de existir en solución como especies muy cargadas negativamente, por lo que constituye un excelente ligando de iones metálicos. Esta capacidad es conocida desde hace mucho tiempo, y la propensión hacia la asociación con iones metálicos como cobre, magnesio, calcio, cinc y hierro es conocida por afectar profundamente la nutrición humana y animal [196]. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* indican que el InsP_6 produce una baja en la biodisponibilidad de iones esenciales, mediante la formación de complejos insolubles que escapan a la absorción a nivel del tracto gastrointestinal [197,198]. En efecto, hoy se sabe que la gran mayoría de los complejos minerales del fitato se encuentran fuera del alcance de los procesos de absorción de nutrientes en los animales y seres humanos [196]. Dado que este inositol fosfato posee 6 grupos fosfato cargados negativamente también se han descrito en la bibliografía interacciones con grupos positivos de proteínas, en algunos casos mediadas incluso por iones metálicos como el calcio [196]. Como si fuera poco, la afección de los procesos de nutrición por el InsP_6 se ve complementada por una enorme avidez del mismo por el almidón, uniéndose a través de sus grupos fosfato directamente o mediante la asistencia de proteínas [199]. Este fenómeno altera dramáticamente la solubilización y digestibilidad de los alimentos en base a este polímero.

Los iones Fe^{3+} y Zn^{2+}, los dos principales micronutrientes deficitarios a nivel mundial [200], son casualmente aquellos cuya biodisponibilidad se ve más afectada por el fitato. Esta problemática es más acusada en aquellos seres humanos en condiciones de subsistencia marginal, cuya dieta usualmente se basa en semillas, granos y frutas. Es de esta forma que la disponibilidad del InsP_6 se constituye en un problema bastante relevante, en una coyuntura global en donde más de mil millones de personas, mayoritariamente localizadas en países en desarrollo, presentan deficiencias en micronutrientes. Esta situación empeora cada día, motivada por el crecimiento de la población mundial y el permanente incremento en la producción de alimentos de base vegetal [167,194,201-204].

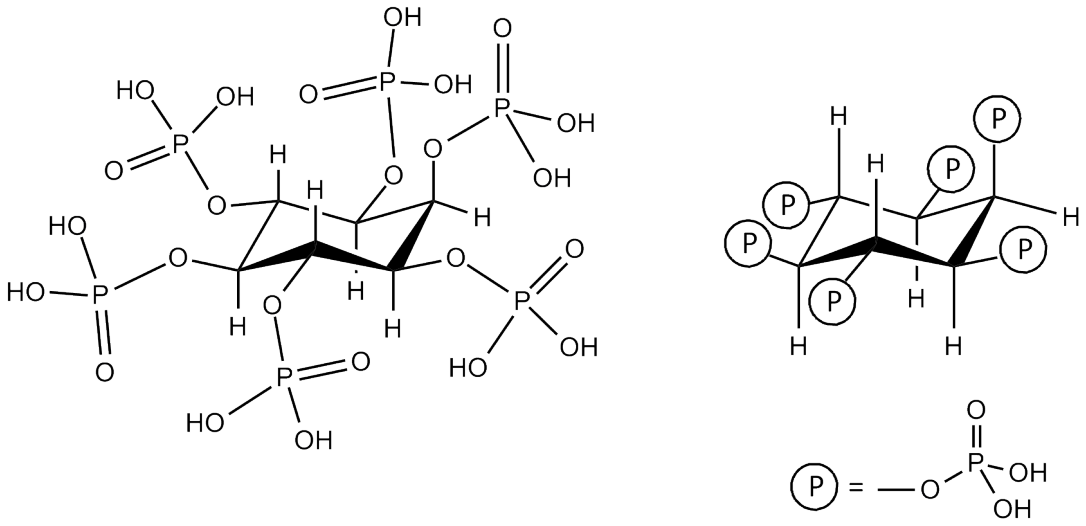


Figura 1.10. Estructura del ácido fítico (InsP_6).

4.4.5.3. Características beneficiosas y roles fisiológicos del fitato

En contraposición a lo anterior, existe un grupo de investigadores que apoya la idea de los potenciales roles beneficiosos del fitato. Entre ellos, hay quienes plantean la capacidad del InsP_6 de disminuir el colesterol y los triglicéridos en la sangre, además de prevenir ciertas patologías como la formación de cálculos renales y enfermedades cardíacas[199,205-208]. Sea cual sea el o los roles beneficiosos "reales" del fitato hay algo que sí se tiene claro: estos parecen ser producto directo o indirecto de la interesante química de coordinación que posee[196]. Además de lo ya mencionado, esta capacidad de complejación metálica es responsable de aumentar la solubilidad de minerales conteniendo

calcio y fluoruro, adsorbiéndose sobre la superficie de los cristales en crecimiento e impidiendo la deposición de más material. Esto apoya una gran cantidad de reportes que describen al InsP_6 como regulador de la biomineralización en el sistema vascular[209,210] y renal[211] y de los procesos de calcificación a nivel dental [212]. En el año 2010 Addison y McKee hicieron un hallazgo muy interesante, al relacionar al fitato con la inhibición de la biomineralización ósea, adicionando un nuevo rol potencial a los ya incontables que posee este inositol fosfato [213].

Los efectos del InsP_6 derivados de su acción complejante han sido hallados en el organismo *Echinococcus granulosus*. Este parásito expulsa al medio grandes cantidades del inositol fosfato, el cual forma un complejo insoluble con el calcio que, disperso en una matriz de glicoproteínas, se convierte en una barrera de hasta 2 mm de espesor. Esta pared sólida lo protege del sistema inmune del hospedador y evita una concomitante reacción inflamatoria[214,215].

De todas las posibles funciones beneficiosas a nivel fisiológico que se le han atribuido al InsP_6, ninguna ha atraído más la atención que sus efectos antineoplásicos. Aún hoy este tema sigue siendo intensamente revisado, debido al elevado número reportes que surgen año a año (revisado por Matejuk en 2010 [216]). Numerosos estudios sugieren que el salvado de trigo es un factor nutricional con propiedades anticancerígenas, especialmente frente a las afecciones de colon, y que esta habilidad se debe a su gran contenido de fitato[217,218]. Más aún, el InsP_6 actúa de manera sinérgica con los agentes quimioterapéuticos comunes, por lo que su uso en terapia aumenta enormemente los resultados del tratamiento[219]. Encima de toda esta evidencia, posiblemente el trabajo que más ha revolucionado a la comunidad científica es el de Druzijanic, en el cual se reporta un estudio piloto de ensayos clínicos sobre pacientes con cáncer colorectal avanzado[220]. Los resultados demostraron que la administración conjunta de fitato e inositol a un programa corriente de tratamiento antitumoral mejoraba significativamente los resultados sin compromiso de la calidad de vida de los pacientes.

Los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos antineoplásicos no están del todo entendidos y las rutas propuestas implican una variada gama de posibles acciones intracelulares. Entre ellas surge una en especial, relacionada con la capacidad antioxidante que muestra el InsP_6, una característica que ha

tenido interesados a varios grupos de investigación en el área de los inositol fosfatos [221-223]. El ácido fítico en un antioxidante natural, cuyo efecto permite, junto con la deshidratación extrema, que las semillas y granos de ciertas plantas puedan resistir siglos sin sufrir estrés oxidativo aparente. La mayoría de los compuestos con características antioxidantes son bastante reactivos frente a especies activadas del oxígeno y protegen a las células de los radicales libres citotóxicos. Sin embargo, extrañamente, el fitato es un compuesto muy estable, que no reacciona con estas especies en grado apreciable. Este rol intracelular del InsP_6 se ha racionalizado en base a la formación de un complejo metálico muy estable con el ion Fe^{3+}. El hierro es conocido por catalizar la formación de especies radicalarias a través del ciclo de Haber-Weiss[224] (reacciones 1 y 2). En este ciclo, el anión superóxido, generado como consecuencia del metabolismo celular, es capaz de reducir el ion Fe^{3+} a Fe^{2+}. Este último reacciona con el H_2O_2 generado como parte de las especies reactivas del oxígeno a nivel intracelular, resultando en la liberación del radical $OH^{\cdot}$ y nuevamente Fe^{3+}, en un proceso que se denomina reacción de Fenton.

$$Fe^{3+} + O_2^{-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad (1)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-} \qquad (2)$$

Se ha logrado establecer que, a nivel celular, el reciclaje de hierro(III) a partir del hierro(II) es el factor limitante para el funcionamiento del ciclo [224]. Por tanto, para cualquier sideróforo, la posibilidad de que el complejo correspondiente deje de catalizar la formación del radical $OH^{\cdot}$ se reduce a la restricción del pivotaje del estado de oxidación del metal. Esto es lo que se ha demostrado para el fitato, el cual bloquea al hierro aparentemente en el estado de oxidación +3, protegiendo a la célula del estrés oxidativo [221,222]. En forma interesante, este posible rol intracelular no parece ser restrictivo del InsP_6, y se ha encontrado que otros inositol fosfatos también presentan rasgos antioxidantes [222,225].

El poder de protección celular frente al envejecimiento oxidativo es una de las múltiples funciones que se han propuesto para el fitato. Dentro de la célula, se ha reportado que el InsP_6 participa en múltiples mecanismos metabólicos a través de la regulación de varias de las proteínas, como la protein-quinasa C[226], diversas fosfatasas[227] y los canales tipo L de Ca[227]. Se ha propuesto asimismo que podría cumplir algunas funciones en el contexto del tráfico vesicular [42]. Sin

embargo, hoy en día la atención se ha centrado en sus funciones dentro del núcleo celular. Ha sido descrito que este inositol fosfato es capaz de activar las enzimas que conducen la reparación del ADN[228], y que regula también procesos de edición y exportación del ARN mensajero [53,229,230]. Aún hoy no se conoce el mecanismo por el cual el fitato desempeña estas funciones, aunque se ha demostrado que podría ser a través de la unión a diversas proteínas, asistiendo al establecimiento de un correcto plegamiento [230].

4.4.5.4. Aplicaciones del fitato

El fitato ha servido para remover metales de productos vitivinícolas y ha sido aplicado satisfactoriamente como estabilizante en el proceso de blanqueo del papel. Su adición a alimentos inhibe la peroxidación lipídica y por tanto los efectos consecuentes de decoloración, putrefacción y sinéresis. Entre las aplicaciones industriales basadas en sus características antioxidantes, se cuenta el uso del fitato en la mejora de varias propiedades de los materiales metálicos de uso estructural, como por ejemplo la inhibición de la corrosión metálica, el aumento en la resistencia al rayado, la mejora en la soldabilidad y el incremento en la adhesión de terminaciones orgánicas [221]. Estos potenciales usos beneficiosos no son sólo producto del trabajo de investigación actual. En efecto, se remontan incluso a hace 30 años; ya en la década de 1980 Graf y Sands reportaban una revisión de cuantiosas aplicaciones médicas y no médicas del fitato [6,8,231].

5. Interacción inositol fosfatos-cationes metálicos: relevancia biológica

5.1. Fisiología inorgánica

Las células están constantemente captando una variedad de iones metálicos de su entorno. Ellas utilizan estos iones para fines tan diversos como la formación de estructuras, el mantenimiento de la presión osmótica, la transducción de señales, la regulación metabólica, etc. Muchas veces, algunos de estos metales son referidos como elementos traza, pero desde el punto de vista celular este es un concepto erróneo [232]. Estudios realizados sobre el organismo *Escherichia coli*, por ejemplo, revelan que las bacterias concentran Zn y Fe varios órdenes

de magnitud por encima de los niveles que ambos metales poseen en el medio de cultivo [233]. En general, las células logran aumentar la concentración intracelular de iones metálicos hasta ciertos valores prefijados, y luego mantienen esos niveles en un rango estrecho de concentración a saber: K y Mg > 10 mM; Ca, Zn y Fe ≈ 0,1 mM; Cu, Mn, Mo ≈ 10 µM; V, Co y Ni en muy baja concentración [232].

A partir de esta información surge naturalmente la cuestión de cómo la célula gestiona los niveles, la compartimentalización y la localización de una cantidad tan grande de estos metales. La complejidad de la respuesta a esta pregunta se expande al considerar que la célula debe regular todos estos procesos de manera "segura", evitando que algunos de estos cationes, los de transición, catalicen reacciones de formación de radicales libres citotóxicos. Un grupo de los iones metálicos se encuentra formando parte de la estructura de diversas proteínas. Actualmente, se sabe que muchas apoproteínas son quelantes muy específicos de ciertos metales. Éstos se unen a las mismas en el medio intracelular a través de difusión, colisión y reacciones de sustitución [232]. Esta afirmación ha llevado a los científicos a otro punto importante en relación a cuál es la especie química que reacciona con la apoproteína. Dos opciones se han manejado hasta el momento, e incluyen el ion metálico libre o algún tipo de complejo soluble con ligandos quelantes propios de la célula.

En este marco, la determinación de la especiación química se presenta como herramienta indispensable para abordar estas cuestiones. Es necesario ir más allá de la concentración total del metal en la célula para analizar en qué formas químicas se encuentra cada ion metálico, desde su forma libre hasta sus complejos con proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas pequeñas con capacidad quelante. Como se ha demostrado, para algunos metales como cobre y cinc, los niveles de metal libre, es decir, no asociados a ninguna estructura celular, son demasiado pequeños para que las proteínas que los usan como cofactores logren unirlos directamente [232]. Es así que, como resultado, deben existir moléculas pequeñas que no sólo asistan al intercambio de metales entre las grandes reservas proteicas, sino que también lo hagan de manera específica y segura desde el punto de vista redox.

El análisis de la especiación química en condiciones fisiológicas implica el estudio termodinámico del sistema a través de la determinación de las

constantes de equilibrio de las reacciones de protonación, complejación, precipitación y redox que compiten por el mismo metal. Un resultado directo de este análisis es el entendimiento de un fenómeno que, por lo complejo, ha quedado fuera de una explicación científica por mucho tiempo: el poder amortiguador que las células ejercen sobre los niveles intracelulares de los metales libres. Tómese como ejemplo el caso del ion magnesio. Con pocas excepciones, los valores de $[Mg]_{libre}$ caen en el estrecho rango 0,5 - 1,0 mM[234]. Cuando se comparan estos valores con los correspondientes al total de magnesio celular, entre 10 y 20 veces mayores, la capacidad amortiguadora de esta red de equilibrios químicos queda en evidencia. En especial para este metal, las moléculas pequeñas más afines que se conocen a nivel intracelular corresponden a nucleótidos de adenina, como el ATP[235,236], la creatinina en el músculo[237] y 2,3 bisfosfoglicerato en los glóbulos rojos[238]. Según estimaciones, en estos tipos celulares, la unión del metal a estos ligandos da cuenta aproximadamente del 75 % del contenido de magnesio total, por lo que todavía no hay una respuesta definitiva de qué ocurre con el resto del magnesio que queda en solución. Según R.D. Grubbs, un experto en este campo, la identificación y caracterización químico-estructural de estos "ligandos ocultos" es un reto complicado, pero su resolución proveerá la llave para el entendimiento cabal de los procesos celulares relacionados [234]. En relación a esto, los Ins*P* son parte, hoy en día, de la lista de potenciales "ligandos ocultos" relacionados con la gestión de los niveles intracelulares de varios iones metálicos.

5.2. Consecuencias de la interacción Ins*P*-metal

Existen dos argumentos principales para considerar que el proceso de complejación metálica por parte de los inositol fosfatos es relevante desde el punto de vista fisiológico. En primer término, tanto los iones metálicos como los Ins*P* coexisten en los mismos compartimentos celulares. Los inositol fosfatos, en especial aquellos de mayor grado de fosforilación, se encuentran altamente cargados, formando especies aniónicas que interaccionan fuertemente con los cationes. En efecto, dentro de la célula, se ha reportado que las concentraciones intracelulares de calcio son suficientemente importantes como para promover los procesos de complejación y que la

afinidad de los inositolfosfatos biológicamente relevantes (tris-, tetrakis-, pentakis- y hexakis-) por el calcio es suficientemente importante como para apoyar un rol fisiológico de la coordinación metálica [239]. Este punto debe ser, sin embargo, considerado con cuidado, ya que el ion magnesio se encuentra en franco exceso en medio intracelular. En segundo lugar, existen algunos ejemplos dentro del intrincado metabolismo celular, de rutas reguladas por la interacción inositolfosfatos-cationes metálicos [240]. Varios casos de este tipo de regulación dependiente de iones metálicos, a nivel fisiológico o farmacológico, ya han surgido en el marco de este capítulo introductorio. La fosforilación de ciertas proteínas por los inositol pirofosfatos ha sido descrita como dependiente del ion magnesio. De la misma manera, el tratamiento de desórdenes neurológicos involucra el uso del ion Li^+, el que modula varios procesos asociados al recambio intracelular de los derivados de inositol. Asimismo, la capacidad quelante del InsP_6 ha sido asociada a propiedades antioxidantes que permiten el uso del mismo como agente antineoplásico, así como a la regulación de la mineralización de ciertos tejidos. Más aún, la interacción fitato-cationes metálicos da lugar, en ciertas condiciones, a la precipitación de fases sólidas que da la posibilidad al parásito *Echinococcus granulosus* de aislarse de su huésped, mientras que permite a las células vegetales almacenar eficientemente nutrientes en forma de fitinas.

Como se desarrolló en este mismo capítulo, los inositol fosfatos se producen, en células eucariotas animales y de levaduras, por hidrólisis de los fosfatidil inositoles. La especificidad de la enzima fosfolipasa C está influenciada por la concentración del ion calcio. A bajos niveles del mismo, los productos mayoritarios son Ins(1,4)P_2 e Ins(1,4,5)P_3, mientras que se obtiene Ins(1)P_1 a niveles más altos [241]. Dado que de todos ellos el inositol trisfosfato es el compuesto metabólicamente activo, la importancia del calcio en la regulación de los procesos de transducción de señales surge de forma obvia. Varias conjeturas se han realizado sobre el mecanismo de esta regulación. Una de ellas, defendida por varios expertos, es que el complejo formado por el PtdIns(4,5)P_2 con el ion calcio es un mejor sustrato de la enzima que el fosfolípido libre [240]. Esta posibilidad debe ser, no obstante, evaluada en el contexto de un exceso de ion magnesio, como ocurre a nivel celular.

Ha sido propuesto que la formación de complejos de coordinación tiene incidencia directa en la modulación del volcado de las reservas intracelulares de Ca^{2+} [240]. Luego de la unión al receptor de membrana de un mensajero extracelular, la liberación de Ins(1,4,5)P_3 provoca la apertura de los canales de calcio del retículo endoplasmático y se produce una entrada masiva del ion al citosol. En condiciones fisiológicas basales, la concentración de calcio es extremadamente baja, por lo que la forma activa del Ins(1,4,5)P_3 corresponde al ligando libre [242]. Sin embargo, el aumento excesivo de la concentración de Ca^{2+} provoca la formación de un complejo de coordinación con el Ins(1,4,5)P_3, que, suponiendo que no se une al receptor IP_3R, inhibe la liberación de más catión divalente. La posterior dilución de la concentración del complejo en el citosol genera la disociación del mismo, y la célula retorna a su estado basal. Este mecanismo de autoregulación que presenta el ion calcio encuentra correlato experimental en las observaciones de Danoff *et al*. de que este metal inhibe la asociación Ins(1,4,5)P_3 - IP_3R [243].

Otros ejemplos en relación a este tema se pueden encontrar fácilmente en la bibliografía. La velocidad de fosforilación del Ins(1,4,5)P_3 por su quinasa específica también depende del calcio; esta proteína cataliza la reacción cinco veces más rápido en presencia del ion metálico [244]. Más aún, la enzima inositol fosfafo 1-fosfomonoesterasa es dependiente de magnesio, pero se ve inhibida en su acción por el litio y el calcio [245].

Al margen de toda esta evidencia, un avance sustancial en el área se logró con el trabajo de Byung-Chul y su grupo[246] sobre la interacción calcio-InsP_6 y su influencia en la especificidad del sustrato de la fitasa de hélice β. En este reporte, no solo se da evidencia de la capacidad regulatoria del calcio en la actividad enzimática, sino que se establece un modelo de unión proteína-sustrato que contiene de forma explícita al complejo calcio-InsP_6. Esta fitasa es capaz de hidrolizar selectivamente los grupos fosfatos de ciertas posiciones del anillo para dar Ins(2,4,6)P_3, mediante un mecanismo de acción basado en el reconocimiento de un patrón de coordinación bidentado ligando-metal.

Parece ser, por tanto, que la interacción de los derivados del inositol con iones metálicos presentes en medios biológicos afecta significativamente algunas etapas del metabolismo en el que estas moléculas participan. Esto da la idea de la importancia de la formación de complejos metálicos a la hora de sopesar los

distintos factores que regulan la maquinaria metabólica que soporta las diversas funciones celulares.

5.3. Artefactos experimentales: una visión crítica

El fenómeno de la asociación metal-ligando en los inositol fosfatos, originado en la alta carga negativa que pueden alcanzar sus especies en solución, ha traído varios problemas a bioquímicos y biólogos. En los experimentos con estas moléculas los investigadores usualmente obvian este factor, extendiendo en muchos casos el rango de concentraciones de los compuestos y metales de interés hacia valores que carecen de sentido fisiológico, en un intento por amplificar una respuesta biológica. Esto ha estimulado la publicación de algunos artículos de revisión que alertan a los científicos sobre estas prácticas "no fisiológicas" [21,239].

Fosfolipasa C. La ruptura de los fosfolípidos de inositol, estimulada por procesos de señalización, está regulada por el ion calcio, como ya se adelantó en la sección anterior. Se ha reportado que la reacción de clivaje del PtdIns(4,5)P_2 a pH fisiológico muestra cierta actividad a concentraciones de calcio muy bajas y poca sensibilidad al calcio en el rango de concentraciones de metal intracelular[247,248]. Pero la disminución importante de la actividad enzimática en el rango 10^{-3} M - 10^{-2} M[247,248] es explicada, según B.M. Luttrell, por la precipitación de alguna especie compleja Ins(1,4,5)P_3-Ca^{2+} [239].

Inositol fosfato 3-quinasa. Esta enzima cataliza un paso importante en el metabolismo del mensajero secundario Ins(1,4,5)P_3 (ver figura 1.6). Irvine *et al*. ha observado un importante decrecimiento en la actividad de esta proteína en preparados que contienen entre dos y tres veces más de calcio que el encontrado en condiciones fisiológicas [249]. En células RINm5F, el pico de actividad se encuentra a 10^{-5} M en calcio, pero nuevamente se observa una marcada disminución a partir de $[Ca^{2+}] = 5 \times 10^{-5}$ M [244]. Estas concentraciones máximas aplicadas son pequeñas pero claramente no fisiológicas para la célula. El principal factor que se cree interfiere con los resultados experimentales es la quelación del calcio por parte del Ins(1,4,5)P_3, provocando una baja en los niveles de metabolito activo [239].

Receptores y movilización de calcio. Las investigaciones abocadas a la dilucidación del mecanismo de acción del Ins(1,4,5)P_3 sobre la movilización de las reservas intracelulares de calcio se han basado en experimentos que, además de abarcar condiciones en el rango fisiológico, han extendido la concentración de calcio por encima del mismo hasta valores de 10^{-5} M [250,251] ó 10^{-4} M [243,252,253]. Estas observaciones "no fisiológicas" pueden alterar de manera dramática las conclusiones que se extraen, ya que la complejación que se espera en esas condiciones entre los inositol fosfato involucrados y los iones presentes en el medio afecta significativamente la carga y la estereoquímica de la interacción proteína-sustrato. En algunos casos la asociación metálica retirará del medio al metabolito biológicamente activo, mientras que en otros casos, cuando el complejo posea mayor afinidad por las proteínas involucradas, provocará una activación de ciertas vías metabólicas. En los reportes del tema existen además ejemplos de condiciones en donde el inositol fosfato ha sido adicionado en exceso. En los experimentos de activación de los canales de calcio de la membrana plasmática de células lacrimales, se han microinyectado cantidades de Ins(1,4,5)P_3 muy superiores a las fisiológicas (1 - 5 x 10^{-4} M) [254,255]. En estas condiciones se observa la entrada de calcio a la célula, pero no se detecta esta actividad en el rango fisiológico. Se espera, por tanto, que a grandes concentraciones el Ins(1,4,5)P_3 atrape completamente al calcio intracelular, una situación que es compatible con el modelo "capacitativo" de regulación en donde la depresión del nivel de calcio interno induce la activación de los canales de calcio de membrana [256].

Capacidad antioxidante del InsP_6. Como se expuso, el fitato es conocido por su capacidad para quelar el hierro y estabilizarlo en su estado de oxidación +3, lo que previene que este metal catalice reacciones de formación de radicales libres, convirtiéndolo en un agente antioxidante. Sin embargo, los experimentos que confirman esta propiedad se realizaron en condiciones muy lejanas al complejo medio intracelular [257]. Para poder trasladar estas afirmaciones a la célula y confirmar un rol protector del fitato desde el punto de vista redox es necesario considerar la cuestión de si estas propiedades de complejación no se exhiben también frente a otros metales de mayor concentración a nivel celular, compitiendo con la formación del complejo InsP_6-Fe(III). Este trabajo fue llevado a cabo en nuestra línea de investigación previo a esta tesis, y los resultados muestran que el fitato se predice completamente

asociado a magnesio en condiciones citosólico-nucleares [258,259]. Este descubrimiento pone en tela de juicio una de las funciones biológicas más importantes propuestas para el InsP_6 y da un claro ejemplo de cómo el estudio termodinámico de la especiación química de un sistema complejo brinda información vital para el entendimiento de los procesos involucrados a nivel molecular. Según R.F. Irvine, estos resultados han reenfocado la atención en otro inositol fosfato presente en células eucariotas de función desconocida, el Ins(1,2,3)P_3, como potencial sideróforo seguro de bajo peso molecular. Este ligando y las posibles implicaciones fisiológicas de sus propiedades químicas son parte integral de este trabajo de tesis.

Para finalizar, se ha visto que estas consideraciones y otras muchas relacionadas con los artefactos experimentales *in vitro* pueden crear respuestas a nivel experimental que no posean significado fisiológico ninguno. Es por esto que el especialista en el tema, S.B. Shears, ha descrito en un artículo[21] una revisión de los criterios más importantes para testear las posibles funciones biológicas de los inositol fosfatos en condiciones que aseguren resultados de relevancia fisiológica:

(i) los experimentos deben tener en cuenta la presencia de iones metálicos de importancia a nivel biológico,

(ii) el efecto de los Ins*P* no debe ser imitado por otros agentes quelantes como EDTA,

(iii) los inositol fosfatos deben estudiarse por separado, de forma de poder entender las características individuales y la especificidad en sus acciones,

(iv) las proteínas blanco deben formar complejos estables con los inositol fosfatos correspondientes, mostrando un sitio adecuado para la unión,

(v) la pureza de los inositol fosfatos de partida debe ser testeada con alguna técnica analítica, de forma de evitar la interferencia de diferentes fuentes.

Estas consideraciones son tenidas en cuenta en el marco de esta tesis, mediante un enfoque sistemático, riguroso e integral de los sistemas Ins*P*-ion metálico estudiados.

6. Referencias bibliográficas

1. Bachhawat, N.; Mande, S. C. *Journal of Molecular Biology* **1999,** *291*, 531-536.
2. Chen, L.; Zhou, C.; Yang, H.; Roberts, M. F. *Biochemistry* **2000,** *39*, 12415-12423.
3. Majumder, A. L.; Chatterjee, A.; Dastidar, K. G.; Majee, M. *FEBS Letters* **2003,** *553*, 3-10.
4. Loewus, F. A.; Murthy, P. P. N. *Plant Science* **2000,** *150*, 1-19.
5. Raboy, V.; Bowen, D. *Sub-cellular biochemistry* **2006,** *39*, 71-101.
6. Sands, S. H.; Biskobing, S. J.; Olson, R. M. Comercial aspects of phytic acid: an overview. En *Phytic Acid: Chemistry and Applications*, Graf, E., Ed.; Pilatus Press: Minneapolis, 1986; p 119.
7. Kaufman, H. W. Interaction of inositol phosphates with mineralized tissues. En *Phytic Acid: Chemistry and Applications*, Graf, E., Ed.; Pilatus Press: Minneapolis, 1986; p 303.
8. Graf, E. Chemistry and applications of phytic acid: an overview. En *Phytic Acid: Chemistry and Applications*, Graf, E., Ed.; Pilatus Press: Minneapolis, 1986; p 1.
9. Yang, L.; Liu, H.; Hu, N. *Electrochemistry Communications* **2007,** *9*, 1057-1061.
10. Rose, A. R. *Biochemical Bulletin* **1912,** *2*, 21-49.
11. Posternak, S. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III* **1919,** *169*, 138-140.
12. Irvine, R. F.; Schell, M. J. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001,** *2*, 327-338.
13. Berridge, M. J.; Irvine, R. F. *Nature* **1989,** *341*, 197-205.
14. Berridge, M. J. *Journal of the American Medical Association* **1989,** *262*, 1834-1841.
15. Shi, Y.; Azab, A. N.; Thompson, M. N.; Greenberg, M. L. *Sub-cellular biochemistry* **2006,** *39*, 265-292.
16. Posternak, T. *The cycitols;* Holden-Day, Inc.: San Francisco, CA, 1965.
17. Shears, S. B. *Biochemical Journal* **2004,** *377*, 265-280.
18. Toker, A. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2002,** *59*, 761-779.
19. Toker, A.; Cantley, L. C. *Nature* **1997,** *387*, 673-676.
20. Vanhaesebroeck, B.; Leevers, S.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P. C.; Woscholski, R.; Parker, P. J.; Waterfield, M. D. *Annual Review of Biochemistry* **2001,** *70*, 535-602.
21. Shears, S. B. *Cellular Signalling* **2001,** *13*, 151-158.
22. Low, M. G. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and their phospholipases. En *Frontiers in Molecular Biology Vol. 27. Biology of phosphoinositides*, Cockcroft, S., Ed.; Oxford University Press: New York, 2000; pp 211-238.
23. Parthasarathy, R.; Eisenberg, J. *Biochemical Journal* **1986,** *235*, 313-322.
24. Parthasarathy, R.; Eisenberg Jr, F. Biochemistry, stereochemistry, and nomenclature of the inositol phopshates. En *Inositol Phosphates and Derivatives: Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential*, Reitz, A. B., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1990; pp 1-19.
25. Murthy, P. P. *Sub-cellular biochemistry* **2006,** *39*, 1-19.
26. Loewus, F. A. Inositol metabolism: Precursor rol and breakdown. En *Inositol Metabolism in Plants*, Morre, D. J., Boss, W. F., Loewus, F. A., Eds.; Wiley-Liss: New York, 1990; pp 21-45.
27. Deitz, M. P.; Albersheim, P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1965,** *19*, 598-602.
28. Loewus, M. W.; Sasaki, K.; Laevitt, A. L.; Munsell, L.; Sherman, W. R.; Loewus, F. A. *Plant Physiology* **1982,** *70*, 1661-1663.
29. Loewus, F. A. Inositol biosynthesis: Precursor rol and breakdown. En *Inositol Metabolism in Plants*, Morre, D. J., Boss, W. F., Loewus, F. A., Eds.; Wiley-Liss: New York, 1990; pp 13-19.
30. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature . *Biochemical Journal* **1976,** *153*, 23-31.
31. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) . *European Journal of Biochemistry* **1989,** *180*, 485-486.
32. Irvine, R. F. *Journal of Physiology* **2005,** *566*, 295-300.
33. Reitz, A. B. *Inositol Phosphate and Derivatives;* ACS Symposium Series: Washington, DC, 1990.
34. York, J. D.; Hunter, T. *Science* **2004,** *306*, 2053-2055.
35. Agranoff, B. W. *Journal of Biological Chemistry* **2009,** *284*, 21121-21126.
36. Isbrandt, L. R.; Oertel, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1980,** *102*, 3144-3148.
37. Barrientos, L. G.; Murthy, P. P. N. *Carbohydrate Research* **1996,** *296*, 39-54.
38. Bauman, A. T.; Chateauneuf, G. M.; Boyd, B. R.; Brown, R. E.; Murthy, P. P. N. *Tetrahedron Letters* **1999,** *40*, 4489-4492.
39. Volkmann, C. J.; Chateauneuf, G. M.; Pradhan, J.; Bauman, A. T.; Brown, R. E.; Murthy, P. P. N. *Tetrahedron Letters* **2002,** *43*, 4853-4856.

40. Brigando, C.; Mossoyan, J. C.; Favier, F.; Benlian, D. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995,** 575-578.
41. Paton, G.; Noailly, M.; Mossoyan, J. C. *Journal of Physical Organic Chemistry* **1999,** *12*, 401-407.
42. Shears, S. B. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1998,** *1436*, 49-67.
43. Irvine, R. F.; Denton, R. M. *Science* **2011,** *334*, 770-771.
44. Hokin, M. R.; Hokin, L. E. *Journal of Biological Chemistry* **1953,** *203*, 967-977.
45. Agranoff, B. W.; Murthy, P.; Seguin, E. B. *Journal of Biological Chemistry* **1983,** *258*, 2076-2078.
46. Streb, H.; Irvine, R. F.; Berridge, M. J.; Schulz, I. *Nature* **1983,** *306*, 67-69.
47. Stephens, L.; Mcgregor, A.; Hawkins, P. Phosphoinositide 3-kinases: regulation by cell-surface receptors and function of 3-phosphorylated lipids. En *Frontiers in Molecular Biology Vol.27. Biology of Phosphoinositides*, Cockcroft, S., Ed.; Oxford University Press: New York, 2000; pp 32-108.
48. Lee, Y. C.; Ballou, C. E. *Journal of Biological Chemistry* **1964,** *239*, 1316-1327.
49. Becher, A.; Wissing, J. B.; Wylegalla, C.; Wagner, K. G. *Plant Science* **1994,** *97*, 143-151.
50. Dawson, R. M. C.; Hemington, N. *Biochemical Journal* **1977,** *162*, 241-245.
51. Dawson, R. M. C.; Hemington, N.; Richards, D. E.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1979,** *182*, 39-49.
52. Ongusaha, P. P.; Hughes, P. J.; Davey, J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **1998,** *335*, 671-679.
53. York, J. D.; Odom, A. R.; Murphy, R.; Ives, E. B.; Wente, S. R. *Science* **1999,** *285*, 96-100.
54. Stephens, L. R.; Kay, R. R.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1990,** *272*, 201-210.
55. Stephens, L. R.; Irvine, R. F. *Nature* **1990,** *346*, 580-583.
56. Brearley, C. A.; Hanke, D. E. *Biochemical Journal* **1996,** *314*, 227-233.
57. Balla, T.; Baukal, A. J.; Hunyady, L.; Catt, K. J. *Journal of Biological Chemistry* **1989,** *264*, 13605-13611.
58. Shears, S. B. *Journal of Biological Chemistry* **1989,** *264*, 19879-19886.
59. Raboy, V. *Phytochemistry* **2003,** *64*, 1033-1043.
60. Carman, G. M.; Henry, S. A. *Annual Review of Biochemistry* **1989,** *58*, 635-669.
61. Nelson, D. E.; Rammesmayer, G.; Bohnert, H. J. *Plant Cell* **1998,** *10*, 753-764.
62. Brearley, C. A.; Hanke, D. E. *Biochemical Journal* **1996,** *314*, 215-225.
63. Chang, S. C.; Miller, A. L.; Feng, Y.; Wente, S. R.; Majerus, P. W. *Journal of Biological Chemistry* **2002,** *277*, 43836-43843.
64. Saiardi, A.; Nagata, E.; Luo, H. R.; Sawa, A.; Luo, X.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001,** *98*, 2306-2311.
65. Schell, M. J.; Letcher, A. J.; Brearley, C. A.; Biber, J.; Murer, H.; Irvine, R. F. *FEBS Letters* **1999,** *461*, 169-172.
66. Wilson, M. P.; Majerus, P. W. *Journal of Biological Chemistry* **1996,** *271*, 11904-11910.
67. Wilson, M. P.; Majerus, P. W. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997,** *232*, 678-681.
68. Munnik, T.; Irvine, R. F.; Musgrave, A. *Biochimica et biophysica acta* **1998,** *1389*, 222-272.
69. York, J. D.; Guo, S.; Odom, A. R.; Spiegelberg, B. D.; Stolz, L. E. *Advances in Enzyme Regulation* **2001,** *41*, 57-71.
70. Fruman, D. A.; Meyers, R. E.; Cantley, L. C. *Annual Review of Biochemistry* **1998,** *67*, 481-507.
71. De Camilli, P.; Emr, S. D.; McPherson, P. S.; Novick, P. *Science* **1996,** *271*, 1533-1539.
72. Martin, T. F. *Current Opinion in Neurobiology* **1997,** *7*, 331-338.
73. Odorizzi, G.; Markus, B.; Emr, S. D. *TIBS* **2000,** *25*, 229-235.
74. Zhang, X.; Majerus, P. W. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **1998,** *9*, 153-160.
75. Whitman, M.; Kaplan, D. R.; Shaffhausen, B.; Cantley, L.; Roberts, T. M. *Nature* **1985,** *315*, 239-242.
76. Vivanco, I.; Sawyers, C. L. *Nature Reviews Cancer* **2002,** *2*, 489-501.
77. Maehama, T.; Dixon, J. E. *Trends in Cell Biology* **1999,** *9*, 125-128.
78. Maehama, T.; Dixon, J. E. *Journal of Biological Chemistry* **1998,** *273*, 13375-13378.
79. Cantley, L. C.; Neel, B. G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999,** *96*, 4240-4245.
80. Geier, S. J.; Algate, P. A.; Carlberg, K.; Flowers, D.; Friedman, C.; Trask, B.; Rohrschneider, L. R. *Blood* **1997,** *89*, 1876-1885.
81. Liu, Q.; Sasaki, T.; Kozieradzki, I.; Wakeham, A.; Itie, A.; Dumont, D. J.; Penninger, J. M. *Genes and Development* **1999,** *13*, 786-791.
82. Sattler, M.; Verma, S.; Byrne, C. H.; Shrikhande, G.; Winkler, T.; Algate, P. A.; Rohrschneider, L. R.; Griffin, J. D. *Molecular Cell Biology* **1999,** *19*, 7473-7480.
83. Shepherd, P. R.; Withers, D. J.; Siddle, K. *Biochemical Journal* **1998,** *333*, 471-490.

84. Nakashima, N.; Sharma, P. M.; Imamura, T.; Bookstein, R.; Olefsky, J. M. *Journal of Biological Chemistry* **2000,** *275*, 12889-12895.
85. Ono, H.; Katagiri, H.; Funaki, M.; Anai, M.; Inukai, K.; Fukushima, Y.; Sakoda, H.; Ogihara, T.; Onishi, Y.; Fujishiro, M.; Kikuchi, M.; Oka, Y.; Asano, T. *Molecular Endocrinology* **2001,** *15*, 1411-1422.
86. Blero, D.; De Smedt, F.; Pesesse, X.; Paternotte, N.; Moreau, C.; Payrastre, B.; Erneux, C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001,** *282*, 839-843.
87. Sbrissa, D.; Ikonomov, O. C.; Strakova, J.; Shisheva, A. *Endocrinology* **2004,** *145*, 4853-4865.
88. Audhya, A.; Foti, M.; Emr, S. D. *Molecular Biology of the Cell* **2000,** *11*, 2673-2689.
89. Hama, H.; Schnieders, E. A.; Thorner, J.; Takemoto, J. Y.; DeWald, D. B. *Journal of Biological Chemistry* **1999,** *274*, 34294-34300.
90. Walch-Solimena, C.; Novick, P. *Nature Cell Biology* **1999,** *1*, 523-525.
91. Hendricks, K. B.; Wang, B. Q.; Schnieders, E. A.; Thorner, J. *Nature Cell Biology* **1999,** *1*, 234-241.
92. Davie, J. K.; Kane, C. M. *Molecular Cell Biology* **2000,** *20*, 5960-5973.
93. Attree, O.; Olivos, I. M.; Okabe, I.; Bailey, L. C.; Nelson, D. L.; Lewis, R. A.; McInnes, R. R.; Nussbaum, R. L. *Nature* **1992,** *358*, 239-242.
94. Addis, M.; Loi, M.; Lepiani, C.; Cau, M.; Melis, M. A. *Human Mutation* **2004,** *23*, 524-525.
95. Lin, T.; Orrison, B. M.; Leahey, A. M.; Suchy, S. F.; Bernard, D. J.; Lewis, R. A.; Nussbaum, R. L. *American Journal of Human Genetics* **1997,** *60*, 1384-1388.
96. Monnier, N.; Satre, V.; Lerouge, E.; Berthoin, F.; Lunardi, J. *Human Mutation* **2000,** *16*, 157-165.
97. Europe-finner, G. N.; Gammon, B.; Newell, P. C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991,** *181*, 191-196.
98. Menniti, F. S.; Miller, R. N.; Putney, J.; Shears, S. B. *Journal of Biological Chemistry* **1993,** *268*, 3850-3856.
99. Bennett, M.; Onnebo, S. M. N.; Azevedo, C.; Saiardi, A. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006,** *63*, 552-564.
100. Stephens, L.; Radenberg, T.; Thiel, U.; Vogel, G.; Khoo, K. H.; Dell, A.; Jackson, T. R.; Hawkins, P. T.; Mayr, G. W. *Journal of Biological Chemistry* **1993,** *268*, 4009-4015.
101. Saiardi, A.; Erdjument-Bromage, H.; Snowman, A. M.; Tempst, P.; Snyder, S. H. *Current Biology* **1999,** *9*, 1323-1326.
102. Saiardi, A.; Sciambi, C.; McCaffery, J. M.; Wendland, B.; Snyder, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002,** *99*, 14206-14211.
103. Luo, H. R.; Saiardi, A.; Yu, H.; Nagata, E.; Ye, K.; Snyder, S. H. *Biochemistry* **2002,** *41*, 2509-2515.
104. Luo, H. R.; Huang, Y. E.; Chen, J. C.; Saiardi, A.; Iijima, M.; Ye, K.; Huang, Y.; Nagata, E.; Devreotes, P.; Snyder, S. H. *Cell* **2003,** *114*, 559-572.
105. York, S. J.; Armbruster, B. N.; Greenwell, P.; Petes, T. D.; York, J. D. *Journal of Biological Chemistry* **2005,** *280*, 4264-4269.
106. Pesesse, X.; Choi, K.; Zhang, T.; Shears, S. B. *Journal of Biological Chemistry* **2004,** *279*, 43378-43381.
107. Morrison, B. H.; Bauer, J. A.; Kalvakolanu, D. V.; Lindner, D. J. *Journal of Biological Chemistry* **2001,** *276*, 24965-24970.
108. Laussmann, T.; Eujen, R.; Weisshuhn, C. M.; Thiel, U.; Vogel, G. *Biochemical Journal* **1996,** *315*, 715-720.
109. Voglmaier, S. M.; Bembenek, M. E.; Kaplin, A. I.; Dorman, G.; Olszewski, J. D.; Prestwich, G. D.; Snyder, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996,** *93*, 4305-4310.
110. Saiardi, A.; Bhandari, R.; Resnick, A. C.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H. *Science* **2004,** *306*, 2101-2105.
111. Berridge, M. J. *Nature* **1993,** *361*, 315-325.
112. Stuart, J. A.; Anderson, K. L.; French, P. J.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **1994,** *303*, 517-525.
113. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Biología Molecular de la Célula;* 3^{era} ed.; Ediciones Omega S.A.: Barcelona, España, 1996.
114. Gould, T. D.; Quiroz, J. A.; Singh, J.; Zarate, J.; Manji, H. K. *Molecular Psychiatry* **2004,** *9*, 734-755.
115. Irvine, R. F.; Letcher, A. J.; Lander, D. J.; Downes, C. P. *Biochemical Journal* **1984,** *223*, 237-243.
116. Woodcock, E. A.; Lambert, K. A.; Phan, T.; Jacobsen, A. N. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1997,** *29*, 449-460.
117. Berridge, M. J. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987,** *494*, 39-51.
118. Muallem, S.; Pandol, S. J.; Beeker, T. G. *Journal of Biological Chemistry* **1989,** *264*, 205-212.
119. Nunn, D. L.; Taylor, C. W. *Biochemical Journal* **1990,** *270*, 227-232.

120. Patterson, R. L.; Boehning, D.; Snyder, S. H. *Annual Review of Biochemistry* **2004,** *73*, 437-465.
121. Marshall, I. C. B.; Taylor, C. W. *Biochemical Journal* **1994,** *301*, 591-598.
122. Martelli, A. M.; Manzoli, L.; Cocco, L. *Pharmacology and Therapeutics* **2004,** *101*, 47-64.
123. Zima, A. V.; Blatter, L. A. *Journal of Physiology* **2004,** *555.3*, 607-615.
124. Lorenzon, N. M.; Beam, K. G. *Kidney International* **2000,** *57*, 794-802.
125. Missiaen, L.; Robberecht, W.; van den Bosch, L.; Callewaert, G.; Parys, J. B.; Wuytack, F.; Raeymaekers, L.; Nilius, B.; Eggermont, J.; De Smedt, H. *Cell Calcium* **2000,** *28*, 1-21.
126. Berridge, M. J.; Downes, C. P.; Hanley, M. R. *Biochemical Journal* **1982,** *206*, 587-595.
127. LaFerla, F. M. *Nature Reviews Neuroscience* **2002,** *3*, 862-872.
128. Yamamoto, K.; Hashimoto, K.; Nakano, M.; Shimohama, S.; Kato, N. *Neuroscience* **2002,** *109*, 665-676.
129. Fujii, S.; Matsumoto, M.; Igarashi, K.; Kato, H.; Mikoshiba, K. *Learning and Memory* **2000,** *7*, 312-320.
130. Mellstrom, B.; Naranjo, J. R. *Current Opinion in Neurobiology* **2001,** *11*, 312-319.
131. Kitamura, N.; Hashimoto, T.; Nishino, N.; Tanaka, C. *Journal of Molecular Neuroscience* **1989,** *1*, 181-187.
132. Warsh, J. J.; Politsky, J. M.; Li, P. P.; Kish, S. J.; Hornykiewicz, O. *Journal of Neurochemistry* **1991,** *56*, 1417-1422.
133. Zecevic, N.; Milosevic, A.; Ehrlich, B. E. *Early Human Development* **1999,** *54*, 103-116.
134. Billington, D. C. *Chemical Society Reviews* **1989,** *18*, 83-122.
135. Chrétien, F.; Moitessier, N.; Roussel, F.; Mauger, J. P.; Chapleur, Y. *Current Organic Chemistry* **2000,** *4*, 513-534.
136. Roussel, F.; Moitessier, N.; Hilly, M.; Chrétien, F.; Mauger, J. P.; Chapleur, Y. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2002,** *10*, 759-768.
137. Sureshan, K. M.; Trusselle, M.; Tovey, S. C.; Taylor, C. W.; Potter, B. V. L. *Chemical Communications* **2006,** 2015-2017.
138. Sureshan, K. M.; Riley, A. M.; Rossi, A. M.; Tovey, S. C.; Dedos, S. G.; Taylor, C. W.; Potter, B. V. L. *Chemical Communications* **2009,** 1204-1206.
139. Keddie, N. S.; Ye, Y.; Aslam, T.; Luyten, T.; Bello, D.; Garnham, C.; Bultynck, G.; Galione, A.; Conway, S. J. *Chemical Communications* **2011,** *47*, 242-244.
140. Moitessier, N.; Chrétien, F.; Chaplcur, Y.; Humeau, C. *Tetrahedron Letters* **1995,** *36*, 8023-8026.
141. Takahashi, M.; Kagasaki, T.; Hosoya, T.; Takahashi, S. *Journal of Antibiotics* **1993,** *46*, 1643-1647.
142. Takahashi, K.; Tanzawa, K.; Takahashi, S. *Journal of Biological Chemistry* **1994,** *269*, 369-372.
143. Correa, V.; Riley, A. M.; Shuto, S.; Horne, G.; Nerou, E. P.; Marwood, R. D.; Potter, B. V. L.; Taylor, C. W. *Molecular Pharmacology* **2001,** *59*, 1206-1215.
144. Claxson, A.; Morris, C.; Blake, D.; Siren, M.; Halliwell, B.; Gustafsson, T.; Lofkvist, B.; Bergelin, I. *Agents and Actions* **1990,** *29*, 68-70.
145. Wahlestedt, C.; Reis, D. J.; Yoo, H.; Adamsson, M.; Andersson, D.; Edvinsson, L. *Neuroscience Letters* **1992,** *143*, 123-126.
146. Lund, T.; Reed, R. K. *Journal of Trauma* **1994,** *36*, 761-765.
147. Sylvia, V.; Curtin, G.; Norman, J.; Stec, J.; Busbee, D. *Cell* **1988,** *54*, 651-658.
148. York, J. D.; Saffitz, J. E.; Majerus, P. W. *Journal of Biological Chemistry* **1994,** *269*, 19992-19999.
149. Pittet, D.; Schlegel, W.; Lew, D. P.; Monod, A.; Mayr, G. W. *Journal of Biological Chemistry* **1989,** *264*, 18489-18493.
150. Connolly, T. M.; Bansal, V. S.; Bross, T. E.; Irvine, R. F.; Majerus, P. W. *Journal of Biological Chemistry* **1987,** *262*, 2146-2149.
151. Morris, A. P.; Gallacher, D. V.; Irvine, R. F.; Petersen, O. H. *Nature* **1987,** *330*, 653-655.
152. Smith, P. M.; Harmer, A. R.; Letcher, A. J.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **2000,** *347*, 77-82.
153. Luckhoff, A.; Clapham, D. *Nature* **1992,** *355*, 356-358.
154. Tsubokawa, H.; Oguro, K.; Robinson, H. P. C.; Masuzawa, T.; Kawai, N. *Journal of Physiology* **1996,** *497*, 67-78.
155. Vajanaphanich, M.; Schultz, C.; Rudolf, M. T.; Wasserman, M.; Enyedi, P.; Craxtonl, A.; Shears, S. B.; Tsien, R. Y.; Barrett, K. E.; Traynor-Kaplan, A. *Nature* **1994,** *371*, 711-714.
156. Ismailov, I. I.; Fuller, C. M.; Berdiev, B. K.; Shlyonsky, V. G.; Benos, D. J.; Barrett, K. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996,** *93*, 10505-10509.
157. Xie, W.; Kaetzel, M. A.; Bruzik, K. S.; Dedman, J. R.; Shears, S. B.; Nelson, D. J. *Journal of Biological Chemistry* **1996,** *271*, 14092-14097.
158. Ho, M. W. Y.; Shears, S. B.; Bruzik, K. S.; Duszyk, M.; French, A. S. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **1997,** *272*, C1160-C1168.

159. Ho, M. W. Y.; Yang, X.; Carew, M. A.; Zhang, T.; Hua, L.; Kwon, Y. U.; Chung, S. K.; Adelt, S.; Vogel, G.; Riley, A. M.; Potter, B. V. L.; Shears, S. B. *Current Biology* **2002,** *12*, 477-482.
160. Yang, X.; Rudolf, M.; Carew, M. A.; Yoshida, M.; Nerreter, V.; Riley, A. M.; Chung, S. K.; Bruzik, K. S.; Potter, B. V. L.; Schultz, C.; Shears, S. B. *Journal of Biological Chemistry* **1999,** *274*, 18973-18980.
161. Tan, Z.; Bruzik, K. S.; Shears, S. B. *Journal of Biological Chemistry* **1997,** *272*, 2285-2290.
162. Craxton, A.; Erneux, C.; Shears, S. B. *Journal of Biological Chemistry* **1994,** *269*, 4337-4342.
163. Menniti, F. S.; Oliver, K. G.; Nogimori, K.; Obie, J. F.; Shears, S. B.; Putney, J. *Journal of Biological Chemistry* **1990,** *265*, 11167-11176.
164. Razzini, G.; Berrie, C. P.; Vignati, S.; Broggini, M.; Mascetta, G.; Brancaccio, A.; Falasca, M. *FASEB Journal* **2000,** *14*, 1179-1187.
165. Odom, A. R.; Stahlberg, A.; Wente, S. R.; York, J. D. *Science* **2000,** *287*, 2026-2029.
166. Blum-Held, C.; Bernard, P.; Spiess, B. *Journal of the American Chemical Society* **2001,** *123*, 3399-3400.
167. Johnson, L. F.; Tate, M. E. *Canadian Journal of Chemistry* **1969,** *47*, 73.
168. Stephens, L. R.; Hawkins, P. T.; Stanley, A. F.; Moore, T.; Poyner, D. R.; Morris, P. J.; Hanley, M. R.; Kay, R. R.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1991,** *275*, 485-499.
169. Shears, S. B. *The Handbook of Cell Signalling;* Academic Press: San Diego, 2003; Vol. 2.
170. Lu, P. J.; Shieh, W. R.; Chen, C. S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996,** *220*, 637-642.
171. Riera, M.; Fuster, J. F.; Palacios, L. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **1991,** *260*, R798-R803.
172. Liang, Y.; Hua, Z.; Liang, X.; Xu, Q.; Lu, G. *Journal of Molecular Biology* **2001,** *313*, 123-137.
173. Orchiston, E. A.; Bennett, D.; Leslie, N. R.; Clarke, R. G.; Winward, L.; Downes, C. P.; Safrany, S. T. *Journal of Biological Chemistry* **2004,** *279*, 1116-1122.
174. Piccolo, E.; Vignati, S.; Maffucci, T.; Innominato, P. F.; Riley, A. M.; Potter, B. V. L.; Pandolfi, P. P.; Broggini, M.; Iacobelli, S.; Innocenti, P.; Falasca, M. *Oncogene* **2004,** *23*, 1754-1765.
175. Campbell, S.; Fisher, R. J.; Towler, E. M.; Fox, S.; Issaq, H. J.; Wolfe, T.; Phillips, L. R.; Rein, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001,** *98*, 10875-10879.
176. Steger, D. J.; Haswell, E. S.; Miller, A. L.; Wente, S. R.; O'Shea, E. K. *Science* **2003,** *299*, 114-116.
177. Szwergold, B. S.; Graham, R. A.; Brown, T. R. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987,** *149*, 874-881.
178. French, P. J.; Bunce, C. M.; Stephens, L. R.; Lord, J. M.; McConnell, F. M.; Brown Creba, G. J. A.; Michell, R. H. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **1991,** *245*, 193-201.
179. Guse, A. H.; Greiner, E.; Emmrich, F.; Brand, K. *Journal of Biological Chemistry* **1993,** *268*, 7129-7133.
180. Mountford, J. C.; Bunce, C. M.; French, P. J.; Michell, R. H.; Brown, G. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1994,** *1222*, 101-108.
181. Barker, C. J.; Wright, J.; Hughes, P. J.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **2004,** *380*, 465-473.
182. Bunce, C. M.; French, P. J.; Allen, P.; Mountford, J. C.; Moor, B.; Greaves, M. F.; Michell, R. H.; Brown, G. *Biochemical Journal* **1993,** *289*, 667-673.
183. Hartig, T. *Botanische Zeitung* **1856,** *14*, 257-260.
184. Hartig, T. *Botanische Zeitung* **1855,** *13*, 881-882.
185. Pfeffer, M. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* **1872,** *8*, 429-574.
186. Palladin, W. *Zeitschrift fur Biologie* **1894,** *31*, 191-203.
187. Schulze, E.; Winterstein, E. *Physiological Chemistry* **1896,** *40*, 120.
188. Mellanby, E. *A story of nutritional research;* Williams and Wilkins: Baltimore, MD, 1950.
189. Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. *Advances in Food Research* **1982,** *28*, 1-92.
190. Anderson, R. J. *Journal of Biological Chemistry* **1914,** *17*, 171-190.
191. Cosgrove, D. J. *Reviews of pure and applied chemistry* **1966,** *16*, 209-224.
192. Jiang, L.; Phillips, T. E.; Hamm, C. A.; Drozdowicz, Y. M.; Rea, P. A.; Maeshima, M.; Rogers, S. W.; Rogers, J. C. *Journal of Cell Biology* **2001,** *155*, 991-1002.
193. Ockenden, I.; Dorsch, J. A.; Reid, M. M.; Lin, L.; Grant, L. K.; Raboy, V.; Lott, J. N. A. *Plant Science* **2004,** *167*, 1131-1142.
194. Oatway, L.; Vasanthan, T.; Helm, J. H. *Food Reviews International* **2001,** *17*, 419-431.
195. Cosgrove, D. J. The P6-myo-inositol content of grains seed and foodstuffs. En *Inositol Phosphates. Their chemistry, biochemistry and physiology*, Cosgrove, D. J., Irving, G. C., Eds.; Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, 1980; pp 166-172.
196. Sathe, S. K.; Reddy, N. R. *Food Phytates;* CRC Press: 2002.

197. Reddy, N. R.; Pierson, M. D.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. *Phytates in Cereals and Legumes;* CRC Press: Boca Raton, FL, 1989.
198. Krebs, N. F. *Journal of Nutrition* **2000,** *130*, 1374S-1377S.
199. Rickard, S. E.; Thompson, L. U. Interactions and Biological Effects of Phytic Acid. En *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, 662 ed.; Shahidi, F., Ed.; ACS Symposium Series, American Chemical Society: 1997; pp 294-312.
200. World Health Organization *Reducing Risks, Promoting Healthy Life*; Geneva, Switzerland, 02.
201. Lott, J. N. A.; Ockenden, I.; Raboy, V.; Batten, G. D. En *Food Phytates*, Sathe, S. K., Reddy, N. R., Eds.; CRC Press: 2002.
202. Batten, G. D.; Lott, J. N. A. *Cereal Chemistry* **1986,** *63*, 14-18.
203. Loewus, F. A. En *Inositol Metabolism in Plants*, Wiley-Liss: 1990; pp 1-11.
204. Lott, J. N. A.; Greenwood, J. S.; Batten, G. D. En *Seeds Development and Germination*, Kigel, J., Galili, G., Eds.; Marcel Dekker Inc.: 1995; pp 215-235.
205. Thompson, L. U. *Food Research International* **1993,** *26*, 131-149.
206. Zhou, J. R.; Erdman, J. *Critical reviews in food science and nutrition* **1995,** *35*, 495-508.
207. Grases, F.; March, J. G.; Prieto, R. M.; Simonet, B. M.; Costa-Bauza, A.; Garcia-Raja, A.; Conte, A. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* **2000,** *34*, 162-164.
208. Urbano, G.; López-Jurado, M.; Aranda, P.; Vidal-Valverde, C.; Tenorio, E.; Porres, J. *Journal of Physiology and Biochemistry* **2000,** *56*, 283-294.
209. Grases, F.; Sanchis, P.; Costa-Bauza, A.; Bonnin, O.; Isern, B.; Perello, J.; Prieto, R. M. *Cardiovascular Pathology* **2008,** *17*, 139-145.
210. Grases, F.; Sanchis, P.; Perello, J.; Isern, B.; Prieto, R. M.; Fernández-Palomeque, C.; Torres, J. J. *Circulation Journal* **2007,** *71*, 1152-1156.
211. Grases, F.; Isern, B.; Sanchis, P.; Perello, J.; Torres, J. J.; Costa-Bauza, A. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **2007,** *12*, 2580-2587.
212. Magrill, D. S. *Journal of Dental Research* **1973,** *52*, 1342.
213. Addison, W. N.; McKee, M. D. *Bone* **2010,** *46*, 1100-1107.
214. Irigoín, F.; Ferreira, F.; Fernández, C.; Sim, R. B.; Díaz, A. *Biochemical Journal* **2002,** *362*, 297-304.
215. Casaravilla, C.; Brearley, C.; Soulé, S.; Fontana, C.; Veiga, N.; Bessio, M. I.; Ferreira, F.; Kremer, C.; Díaz, A. *FEBS Journal* **2006,** *273*, 3192-3203.
216. Matejuk, A.; Shamsuddin, A. *Current Cancer Therapy Reviews* **2010,** *6*, 1-12.
217. Fox, C. H.; Eberl, M. *Complementary therapies in medicine* **2002,** *10*, 229-234.
218. Vucenik, I.; Shamsuddin, A. M. *Journal of Nutrition* **2003,** *133*, 3778S-3784S.
219. Tantivejkul, K.; Vucenik, I.; Eiseman, J.; Shamsuddin, A. M. *Breast Cancer Research and Treatment* **2003,** *79*, 301-312.
220. Druzijanic, N.; Juricic, J.; Perko, Z.; Kraljevic, D. *Rev Oncologia* **2002,** *4*, 171.
221. Graf, E.; Eaton, J. W. *Free Radical Biology and Medicine* **1990,** *8*, 61-69.
222. Hawkins, P. T.; Poyner, D. R.; Jackson, T. R.; Letcher, A. J.; Lander, D. A.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1993,** *294*, 929-934.
223. Phillippy, B. O.; Graf, E. *FASEB Journal* **1996,** *10*.
224. Burkitt, M. J.; Gilbert, B. C. *Free Radical Research Communications* **1990,** *10*, 265-280.
225. Phillippy, B. Q.; Graf, E. *Free Radical Biology and Medicine* **1997,** *22*, 939-946.
226. Efanov, A. M.; Zaitsev, S. V.; Berggren, P. O. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997,** *94*, 4435-4439.
227. Larsson, O.; Barker, C. J.; Sjoholm, A.; Carlqvist, H.; Michell, R. H.; Bertorello, A.; Nilsson, T.; Honkanen, R. E.; Mayr, G. W.; Zwiller, J.; Berggren, P. O. *Science* **1997,** *278*, 471-474.
228. Hanakahi, L. A.; Bartlet-Jones, M.; Chappell, C.; Pappin, D.; West, S. C. *Cell* **2000,** *102*, 721-729.
229. Alcazar-Roman, A. R.; Tran, E. J.; Guo, S.; Wente, S. R. *Nature Cell Biology* **2006,** *8*, 711-716.
230. Macbeth, M. R.; Schubert, H. L.; Vandemark, A. P.; Lingam, A. T.; Hill, C. P.; Bass, B. L. *Science* **2005,** *309*, 1534-1539.
231. Graf, E. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1983,** *60*, 1861-1867.
232. Finney, L. A.; O'Halloran, V. *Science* **2003,** *300*, 931-936.
233. Outten, C. E.; O'Halloran, V. *Science* **2001,** *292*, 2488-2492.
234. Grubbs, R. D. *BioMetals* **2002,** *15*, 251-259.
235. Koss, K. I.; Putnam, R. W.; Grubbs, R. D. *American Journal of Physiology* **1993,** *264*, CI1259-CI1269.
236. Polimeni, P. I.; Page, E. *Circulation Research* **1973,** *33*, 367-374.
237. Gupta, R. K.; Moore, R. D. *Journal of Biological Chemistry* **1980,** *255*, 3987-3993.

238. Raftos, J. E.; Lew, B. L.; Flatman, P. W. *European Journal of Biochemistry* **1999,** *263*, 635-645.
239. Luttrell, B. M. *Cellular Signalling* **1994,** *6*, 355-362.
240. Luttrell, B. M. *Journal of Biological Chemistry* **1993,** *268*, 1521-1524.
241. Wilson, D. B.; Bross, T. E.; Hoffman, S. L.; Majerus, P. W. *Journal of Biological Chemistry* **1981,** *256*, 11718-11724.
242. Shuttleworth, T. J.; Thompson, J. L. *Cell Calcium* **1992,** *13*, 541-551.
243. Danoff, S. K.; Supattapone, S.; Snyder, S. H. *Biochemical Journal* **1988,** *254*, 701-705.
244. Biden, T. J.; Wollheim, C. B. *Journal of Biological Chemistry* **1986,** *261*, 11931-11934.
245. Inhorn, R. C.; Majerus, P. W. *Journal of Biological Chemistry* **1984,** *262*, 15946-15952.
246. Byung-Chul, O.; Myung, H. K.; Won-Chan, C.; Sung-Chun, P.; Suk-Chul, B.; Tae-Kwan, O. *Biochemistry* **2006,** *45*, 9531-9539.
247. Irvine, R. F.; Letcher, A. J.; Dawson, R. M. C. *Biochemical Journal* **1984,** *218*, 177-185.
248. Sasaguri, T.; Hirata, M.; Kuriyama, H. *Biochemical Journal* **1985,** *231*, 497-503.
249. Irvine, R. F.; Letcher, A. J.; Heslop, J. P.; Berridge, M. J. *Nature* **1986,** *320*, 631-634.
250. Iino, M. *Journal of General Physiology* **1990,** *95*, 1103-1122.
251. Richardson, A.; Taylor, C. W. *Journal of Biological Chemistry* **1993,** *268*, 11528-11533.
252. Worley, P. F.; Baraban, J. M.; Supattapone, S.; Wilson, V. S.; Snyder, S. H. *Journal of Biological Chemistry* **1987,** *262*, 12132-12136.
253. Finch, E. A.; Turner, T. J.; Goldin, S. M. *Science* **1991,** *252*, 443-446.
254. Bird, G. S. J.; Rossier, M. F.; Hughes, A. R.; Shears, S. B.; Armstrong, D. L.; Putney, J. *Nature* **1991,** *352*, 162-165.
255. Smith, P. M. *Biochemical Journal* **1992,** *283*, 27-30.
256. Putney, J. *Cell Calcium* **1986,** *7*, 1-12.
257. Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1984,** *259*, 3620-3624.
258. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
259. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.

Capítulo 2

Antecedentes en la temática

En este capítulo se exponen los resultados más relevantes de la producción científica sobre la química de los inositol fosfatos, a partir de una visión general del estado del arte en la temática. Se inicia con un breve repaso por la nomenclatura utilizada en el campo de la especiación química, así como también algunas puntualizaciones de las técnicas que han sido empleadas. Se avanza entonces hacia el análisis del comportamiento químico de estas moléculas, mediante la descripción de la especiación química del sistema desde el punto de vista de los procesos macroscópicos y microscópicos. Para finalizar, se exponen los progresos realizados en la racionalización del comportamiento biológico de los InsP, a partir de la información que brinda la especiación química.

1. Generalidades

En el primer capítulo se presentó la gran influencia que tiene en varias áreas el comportamiento químico y estructural de los inositol fosfatos, en especial sus características de protonación y complejación metálica, tanto al estado sólido como en solución. Desde hace ya unos años se está comenzando a observar dentro de la producción científica del tema cómo la biología, la bioquímica y la nutrición, entre otras áreas, se ven beneficiadas con datos de estabilidad, abundancia, estequiometrías, estructuras, simetría, distribución de carga, microprotonaciones y microcomplejaciones de las especies presentes en sistemas químicos complejos conteniendo inositol.

Los científicos han abordado este tema desde un ángulo principalmente termodinámico, a través de la caracterización de los diversos equilibrios químicos de protonación, complejación y precipitación que los inositol fosfatos establecen en presencia y ausencia de iones metálicos. En este trabajo de tesis se hará uso de la nomenclatura propia del campo de la Especiación Química. En

primer lugar, se denomina componentes al conjunto mínimo de formas químicas necesario para definir químicamente un sistema. En particular, si se considera un sistema compuesto por un inositol fosfato en solución acuosa, el mismo estará definido por dos componentes, el propio ligando, denominado genéricamente L, y el hidrogenión H^+. De esta manera, a partir de estos dos componentes se podrán derivar todas las especies químicas formadas por las diversas reacciones de protonación del ligando. En este sentido, L^{n-} representará al ligando completamente deprotonado, $HL^{(n-1)-}$ al ligando monoprotonado, y así sucesivamente, hasta la formación de la especie neutra completamente protonada, H_nL, donde n representa el número máximo de iones hidrogenión que pueden unirse a los grupos ionizables del ligando.

Considérese entonces las reacciones correspondientes a las sucesivas protonaciones del ligando. Las mismas están caracterizadas por las constantes sucesivas de protonación K^H_n, las cuales en general decrecen progresivamente hasta la correspondiente al proceso de obtención de la especie neutra H_nL, en donde todos los grupos ácidos se encuentran protonados:

$$L^{n-} + H^+ \longrightarrow HL^{(n-1)-} \qquad K^H_1$$

$$HL^{(n-1)-} + H^+ \longrightarrow H_2L^{(n-2)-} \qquad K^H_2$$

$$\vdots$$

$$H_{n-1}L^- + H^+ \longrightarrow H_nL \qquad K^H_n$$

Otra forma muy utilizada para la representación de los procesos anteriores es usar las denominadas ecuaciones globales. En ellas, cada una de las especies protonadas del ligando se obtiene a partir de L^{n-} y H^+. Así, las constantes que caracterizan a cada reacción se denominan β^H_n y se pueden obtener matemáticamente como producto de las constantes sucesivas correspondientes.

Este mismo esquema se puede ampliar para considerar sistemas más complejos, en donde se tengan en cuenta además procesos de complejación metálica. En estos casos, los componentes del sistema serán tres, ligando, protón y metal, siendo este último representado genéricamente por la letra M. Las etapas de complejación sucesiva estarán caracterizadas por las constantes sucesivas de formación K_{ijk}, donde los subíndices denotan los coeficientes

estequiométricos del metal, ligando y protón en la fórmula del complejo. En la misma línea de razonamiento, las reacciones globales de complejación, donde cada especie compleja se obtiene a partir de M^{n+}, L^{n-} y H^{+}, tendrán asociadas constantes globales de formación β_{ijk}. Dado que usualmente las constantes de equilibrio asociadas a estos procesos son números grandes, se suele reportar los logaritmos de los valores correspondientes. Por otra parte, las concentraciones de las especies solubles difieren de la actividad de las mismas y esta desviación depende de la naturaleza y concentración de las especies en el medio. Por tanto, las constantes de equilibrio determinadas mediante alguna técnica que mida las concentraciones en solución estarán afectadas por la fuerza iónica del sistema (simbolizada por *I*). Asimismo, existe una dependencia termodinámica de la constante de equilibrio con la temperatura, por lo que ambos parámetros deben ser controlados durante los experimentos e informados junto con los resultados obtenidos en todos los casos.

En el campo de los inositol fosfatos, las dos técnicas más utilizadas para la determinación de la especiación química del sistema son la potenciometría de alta resolución y la resonancia magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C y ^{31}P, ambas recomendadas por la IUPAC [1]. En términos generales, se basan en la titulación de los compuestos de interés y el registro simultáneo de una propiedad que varíe en la corrida experimental y dependa de la concentración de las especies. A posteriori se ajusta matemáticamente dicha variación, para obtener un modelo de especies químicas que reproduce el comportamiento de los datos experimentales. En detalle, la técnica potenciométrica monitorea el pH de una solución que contiene el ligando (o el ligando y otros componentes), a medida que se agregan alícuotas de una base o un ácido de concentración exactamente conocida. Las curvas obtenidas se ajustan a ecuaciones de balances de masa y carga, las cuales relacionan los datos experimentales con modelos teóricos de especies que se proponen de acuerdo a la experiencia y criterio químico. A partir de aquí se evalúan los distintos modelos utilizando herramientas estadísticas y se informa el que mejor explica el comportamiento químico del sistema en las condiciones de medida.

El segundo método utiliza una estrategia similar, pero en ese caso se registran los desplazamientos químicos (δ) para distintos valores de pH de la solución. Mediante un ajuste matemático de la contribución de las diversas especies

existentes al desplazamiento químico de cada núcleo en función del pH, se elije el modelo que mejor se ajusta a los valores experimentales. Esta técnica permite, además, discriminar los microequilibrios que se establecen en el sistema. Los microequilibrios corresponden a procesos donde se ven involucrados de forma individual los distintos grupos ionizables y se encuentran caracterizados por microconstantes de equilibrio. Para esto, la fracción protonada de un grupo ionizable i ($f_{i,p}$) se expresa de la siguiente manera:

$$f_{i,p} = \frac{\delta_i^{obs} - \delta_{i,d}}{\delta_{i,p} - \delta_{i,d}}$$

donde δ_i^{obs} corresponde al desplazamiento químico experimental, y $\delta_{i,p}$ y $\delta_{i,d}$ representan los desplazamientos químicos del grupo ionizable completamente protonado y deprotonado respectivamente. Los valores de $f_{i,p}$ pueden expresarse en función de las constantes de equilibrio macro y microscópicas y de la [H^+]. Mediante una regresión no lineal de este parámetro respecto de los datos experimentales de δ_i^{obs} en función del pH se extrae el modelo general de macro y microespecies y las constantes de equilibrio que las relacionan. De esta forma, para los sistemas conteniendo Ins*P*, se puede determinar cuantitativamente qué porcentaje de cada fosfato del inositol fosfato se encuentra protonado en ciertas condiciones experimentales. Esto amplía la información que se puede extraer del sistema, marcando el vínculo entre la especiación química y los estudios estructurales en solución.

En último lugar, desde el punto de vista químico, en relación con los procesos de complejación y protonación, los carbonos enantiotópicos se comportan de igual manera, por lo que los grupos sobre C1 ó C3 y sobre C4 ó C6 serán indistinguibles. Es así que se flexibilizará de aquí en más la nomenclatura introducida en el capítulo 1, haciendo que, por ejemplo, la notación Ins(1,4,5)P_3 represente a ambos enantiómeros (Ins(1,4,5)P_3 e Ins(3,5,6)P_3).

2. Especiación química de los inositol fosfatos

Comparado con el gran número de publicaciones sobre las características fisiológicas y las aplicaciones de los inositol fosfatos, pocos trabajos se pueden hallar en la literatura especializada concernientes a la caracterización

fisicoquímica y estructural de los procesos y especies presentes en estos sistemas. De ellos, los primeros reportes involucran, usualmente, un abordaje cualitativo o indirecto del problema. Como ejemplo, Xu *et al.*, realizó un estudio *in vitro* de la interacción entre varios inositol fosfatos y calcio, cinc e histidina, mediante el planteo de experimentos de precipitación de las fases sólidas respectivas y la determinación de la concentración de catión remanente en solución. Estos datos hicieron posible la identificación de aquellos factores que influyen en la solubilidad de los sólidos, como pH, fuerza iónica, grado de fosforilación, etc[2]. Por su parte, Spiers *et al*. evaluó la capacidad de coordinación de algunos Ins*P* frente al hierro, a través del estudio de su capacidad para inhibir la producción de radicales libres citotóxicos y de promover la captación del metal por parte de células de *Pseudomonas aeruginosa* [3]. De todas formas, ninguno de estos resultados permite una caracterización detallada de los equilibrios y especies que se forman en el sistema. En atención a esto, varios grupos de investigación han reportado hasta este momento trabajos con un encare de la problemática mayoritariamente cuantitativo, contribuyendo parcialmente a la elucidación del patrón de reactividad química de los diversos inositol fosfatos.

2.1. *myo*-inositol mono y bisfosfatos

La enorme mayoría de los trabajos publicados sobre la determinación de la especiación química de los inositol mono y bisfosfatos, en presencia o ausencia de iones metálicos, corresponden al grupo de Bernard Spiess. En la tabla 2.1 se detallan los resultados de las constantes de protonación para algunos inositol fosfatos mono y bisfosforilados. En términos generales, sólo se ha podido ajustar el proceso que implica la primera protonación del grupo fosfato, debido a la alta acidez que presenta el grupo R-O-PO_3H_2. De los valores de K^{H}_{1} correspondientes a Ins(1)P_1 e Ins(2)P_1 se deduce que la orientación del grupo ionizable afecta significativamente la basicidad del mismo, siendo el fosfato axial menos propenso que el ecuatorial a captar hidrogeniones del medio[4]. Sin embargo, por ajuste de los datos de desplazamiento químico de las señales en los espectros de RMN de ^{31}P se obtienen valores de $\delta_{i,d}$ que son muy parecidos entre sí, por lo que ambos grupos deprotonados experimentan un ambiente similar. Esto indica que la variación en la basicidad observada no es atribuible a

la estabilización del anión formado por deprotonación de la especie. Se cree entonces que las diferencias en K^{H}_{1} y $\delta_{i,p}$ son debidas, fundamentalmente, a la orientación diferencial de los grupos -OH cercanos al fosfato en consideración [4].

Tabla 2.1. Logaritmo de las constantes sucesivas de protonación para algunos *myo*-inositol mono y bisfosfatos.

	NEt_4ClO_4 0,1 M (25 °C)			KCl 0,2 M (37 °C)		Ref.
Ligando	log K^{H}_{1}	log K^{H}_{2}		log K^{H}_{1}	log K^{H}_{2}	
Ins(1)P_1	6,50	---		---	---	[4]
Ins(2)P_1	5,83	---		---	---	[4]
Ins(4,5)P_2	8,33	5,97		7,44	5,28	[5,6]
Ins(1,2)P_2	7,97	5,74		---	---	[4]
Ins(1,4)P_2	6,85	5,99		---	---	[5]

Para los miembros bisfosforilados el panorama cambia, ya que comienzan a exhibirse fenómenos relacionados con la interacción interfosfato. Los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas del Ins(1,2)P_2 son 7,97 y 5,74, y la relación K^{H}_{1}/K^{H}_{2} es cercana a 150. A través de los años se ha demostrado que la relación entre la primera y segunda constantes de protonación que presentan diversas bases conteniendo dos grupos ionizables dependen, además de un factor estadístico y electrostático, de la influencia de los sustituyentes y la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares [7-11]. Por comparación con los trabajos realizados por L. Eberson sobre un gran número de ácidos dicarboxílicos[11], B. Spiess y su grupo han hallado que los efectos electrostáticos permiten explicar el valor encontrado de K^{H}_{1}/K^{H}_{2}, por lo que la formación de fuertes enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato sólo parece tener influencia en la primera protonación, mientras que no es aplicable a la segunda. De acuerdo, K^{H}_{1} para el Ins(1,2)P_2 cae por encima del valor correspondiente a K^{H}_{1} en los compuestos Ins(1)P_1 e Ins(2)P_1, mientras que K^{H}_{2} es muy similar a K^{H}_{1} del Ins(2)P_1 [4]. Si se comparan las constantes de protonación sucesivas para los InsP_2 de la tabla 2.1, se advierte que K^{H}_{1} varía en el sentido Ins(4,5)P_2 > Ins(1,2)P_2 > Ins(1,4)P_2, lo que revela que la mayor interacción por enlace de hidrógeno intramolecular que acompaña la adición del primer protón

se establece entre grupos adyacentes, y dentro de este conjunto, entre aquellos grupos fosfato trans entre sí. Esto se confirma a posteriori mediante el análisis de las microconstantes de protonación [4].

Por último, es interesante notar la diferencia existente entre los valores obtenidos en NEt_4ClO_4 0,1 M a 25 °C y en KCl 0,2 M a 37 °C. Según algunos autores, estas variaciones no pueden explicarse solamente por el cambio en la fuerza iónica y temperatura entre ambos medios. El incremento de la fuerza iónica de 0,1 a 0,2 M no debería reportar una alteración mayor que 0,01 unidades en el valor de los logaritmos [12], mientras que la variación con la temperatura de las constantes de protonación de los grupos fosfato es usualmente baja [13,14]. Por tanto, es la naturaleza del electrolito soporte la que provee estas diferencias y, como se verá más adelante para otros inositol fosfatos, el fenómeno que subyace a este efecto corresponde a una interacción ion alcalino-Ins*P*, bastante importante en comparación con la observada para el cation "no interactuante".

2.2. *myo*-inositol trisfosfatos

2.2.1. Equilibrios de protonación

De todos los derivados trisfosforilados del inositol, el Ins(1,2,6)P_3 es, por amplio margen, el isómero que más se ha estudiado desde el punto de vista químico, ya que es muy fácilmente asequible por hidrólisis ácida o enzimática del ácido fítico. El grupo de B. Spiess ha determinado la especiación química del mismo en dos medios, de forma de describir las propiedades de protonación y complejación (n-NBu_4Br 0,1 M a 25 °C), y evaluar el patrón de reactividad química en condiciones fisiológicas (KCl 0,2 M a 37 °C)[15]. Los resultados obtenidos de las constantes sucesivas de protonación para este ligando se muestran en la tabla 2.2. Al igual que lo discutido en la sección anterior, las constantes de protonación usualmente se han podido ajustar para la primera adición de H^+ a cada grupo fosfato, aunque la cuarta protonación, bastante pequeña y con mayor incertidumbre, pudo ser ajustada para uno de los grupos fosfato en n-NBu_4Br. Las protonaciones quinta y sexta dan lugar a especies demasiado ácidas para poder ser analizadas satisfactoriamente.

Fijando la atención en los valores obtenidos en n-NBu_4Br 0,1 M a 25 °C, en general, los dos aspectos más importantes resaltados por el grupo de B. Spiess

son, por una parte, la diferencia notoria existente entre los valores de K^H (9,48, 7,22, 5,70 y 2,40) y, en segundo lugar, la variación de estos valores comparativamente a los correspondientes a Ins(1)P_1 e Ins(2)P_1 (tabla 2.1). Estos resultados dan cuenta de que la acidez de los grupos ionizables se encuentra gobernada por dos efectos contrapuestos: uno que la incrementa, a través de un ΔG de hidratación muy favorable para el anión formado, y otro que la disminuye, por formación de fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares [15].

Tabla 2.2. Logaritmo de las constantes sucesivas de protonación para algunos *myo*-inositoltrisfosfatos.

	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)				KCl 0,2 M (37 °C)				Ref.
Ligando	log K^H_1	log K^H_2	log K^H_3	log K^H_4	log K^H_1	log K^H_2	log K^H_3	log K^H_4	
Ins(4,5,6)P_3	---	---	---	---	9,81	7,00	5,22	---	[6]
Ins(1,2,3)P_3	---	---	---	---	9,37	7,68	5,43	---	[16]
Ins(1,2,6)P_3	9,48	7,22	5,70	2,40	8,22	6,38	5,21	---	[15]
Ins(1,4,5)P_3	8,74	7,02	5,80	2,61	7,85	6,40	5,31	---	[17]
Ins(1,4,6)P_3	---	---	---	---	8,17	6,09	5,21	---	[18]
Ins(2,4,6)P_3	8,20	6,84	5,81	2,64	---	---	---	---	[19]
Ins(1,3,5)P_3	8,05	6,99	6,01	2,63	---	---	---	---	[19]

A posteriori, este mismo grupo de investigación amplió sus estudios a otros *myo*-inositoltrisfosfatos, obtenidos a partir de síntesis orgánica o por separación cromatográfica de mezclas derivadas de la hidrólisis del ácido fítico[6,16-19]. Esto permitió realizar un análisis comparativo del comportamiento ácido-base de los InsP_3. Atendiendo a los valores de la tabla 2.2 para n-NBu_4Br 0,1 M a 25 °C, K^H_1 disminuye en el orden Ins(1,2,6)P_3 > Ins(1,4,5)P_3 > Ins(2,4,6)P_3 > Ins(1,3,5)P_3. A su vez, esta constante para Ins(1,2,3)P_3, Ins(4,5,6)P_3 e Ins(1,4,6)P_3 no está medida en estas condiciones, pero dadas las variaciones sistemáticas observadas en presencia y ausencia de K^+, se puede afirmar que son mayores a 9,37, 9,81 y 8,17 respectivamente. Esto hace que un orden tentativo de las K^H_1 que involucre todos los isómeros de la tabla 2.2 sea, por tanto, Ins(4,5,6)P_3 > Ins(1,2,3)P_3 ≈ Ins(1,2,6)P_3 > Ins(1,4,6)P_3 ≈ Ins(1,4,5)P_3 > Ins(2,4,6)P_3 > Ins(1,3,5)P_3. Esto evidencia que la interacción entre los grupos

fosfato frente al ingreso del primer protón es más acusada para grupos adyacentes y decrece a medida que éstos se separan. A su vez, la configuración donde los grupos adyacentes se encuentran en posición ecuatorial parece optimizar la unión L^{6-}-H^{+}. Por otra parte, la tendencia anterior se atenúa progresivamente a medida que el ligando se protona, llegando a invertirse para los últimos hidrogeniones. Este fenómeno se explica por los dos efectos contrapuestos ya mencionados, que modulan estrechamente los valores de las constantes para estados intermedios de protonación del inositol trisfosfato [20].

El conjunto de constantes de protonación determinadas en KCl 0,2 M a 37 °C difiere marcadamente del determinado en n-NBu_4Br. Como se aclaró para los derivados mono y bisfosforilados, la variación de la fuerza iónica y la temperatura entre ambos medios no explica esta diferencia. Las K^{H} obtenidas no sólo son siempre menores, sino además sólo pueden ser determinadas las primeras tres de ellas en KCl. Según el análisis de B. Spiess y su grupo[15], esto se debe a la interacción entre el catión K^{+} y el ligando, por lo que el electrolito soporte en estos experimentos deja de ser "no interactuante". Si se tiene en cuenta la alta carga que exhiben las especies de los Ins*P* en solución, es de esperar una interacción significativa a este respecto, tal como ocurre entre los iones alcalinos y ligandos aniónicos no macrocíclicos como EDTA, ácido nitriloacético, ácido difosfórico y ácido tripolifosfórico [13].

En el caso particular de los inositol fosfatos, los iones K^{+} compiten con los protones por los grupos fosfato, por lo que las constantes de protonación determinadas en presencia de este metal deben ser consideradas como "aparentes"; sólo describen de forma global las propiedades ácido-base del ligando en presencia de un exceso de K^{+}. En la figura 2.1A y B se muestran los diagramas de distribución de especies para el Ins(1,4,5)P_3 en ambos medios. Como se advierte, la ocurrencia de las diversas especies y su dependencia con el pH se ven alteradas por el ion K^{+}, haciendo que los máximos de las curvas se desplacen hacia medio ácido. Esto ocurre porque para conseguir maximizar la concentración de un cierto estado de protonación del ligando se necesita una mayor concentración de ion H^{+} en el medio. Adicionalmente, la especie H_4L^{2-} puede formarse a pH < 5 sólo en ausencia de ion alcalino, ya que la asociación del potasio al ligando acota este proceso, seguramente, a valores de pH por debajo del rango de estudio.

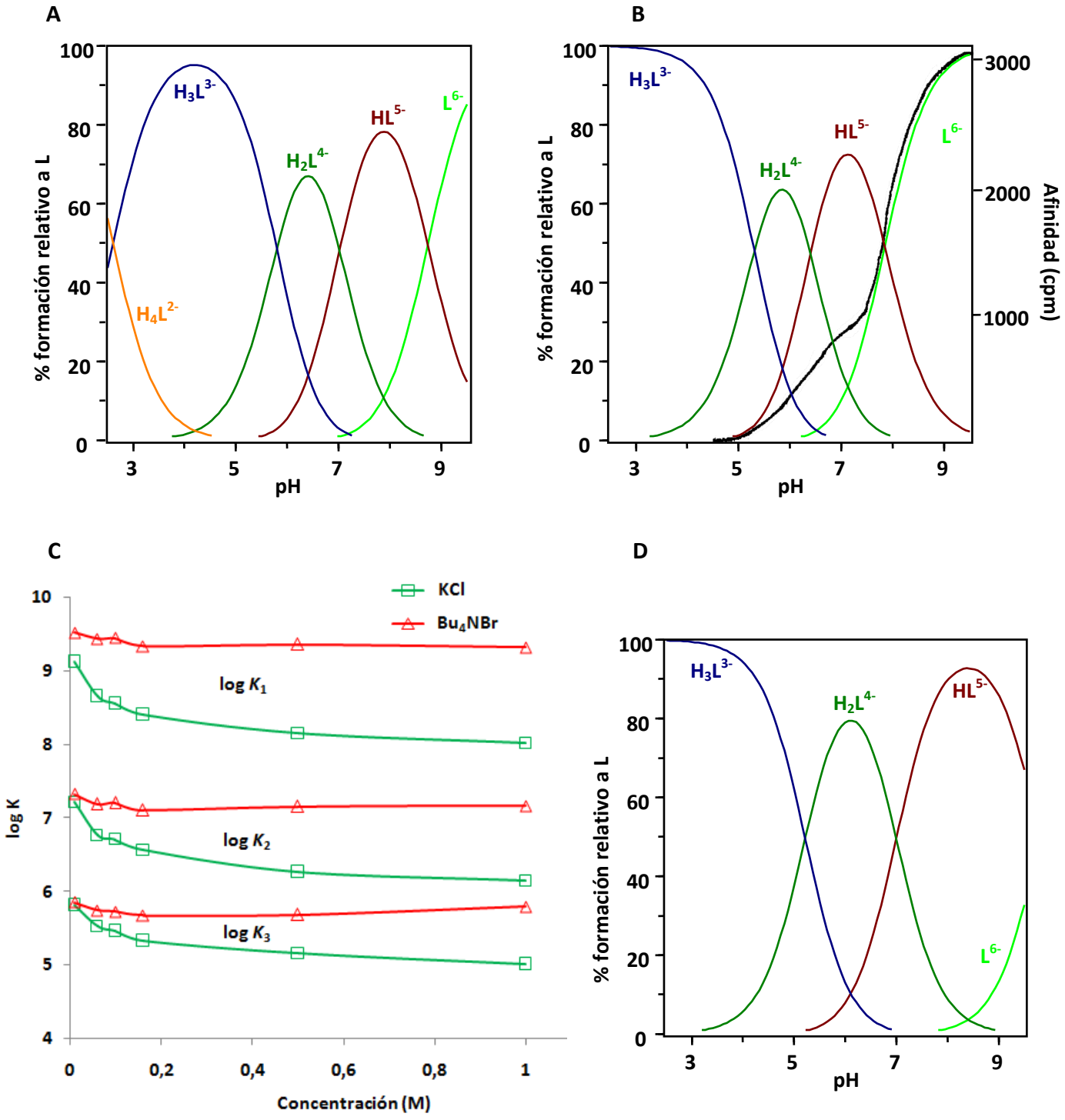


Figura 2.1. Diagramas de distribución de especies para el sistema Ins(1,4,5)P_3 en (A) NBu_4Br 0,1 M a 25 °C y (B) KCl 0,1 M a 37 °C. La curva negra en (B) corresponde a la afinidad del Ins(1,4,5)P_3 por su receptor[21], en cuentas por minuto. En (C) se muestra la variación del logaritmo de las constantes de protonación del Ins(1,2,6)P_3 con la concentración y naturaleza del electrolito soporte. (D) corresponde al diagrama de especies para el Ins(4,5,6)P_3 en KCl 0,1 M a 37 °C.

Se debe aclarar que en la figura 2.1B las especies que se muestran en el diagrama son en realidad "aparentes". Es decir, es posible encontrar varias especies complejas de potasio, las cuales subyacen debajo de las estequiometrías ajustadas para las especies del ligando libre. Esto brinda datos cuantitativos acerca de las características de protonación general de las especies en medios biológicos, pero no aporta información certera de las estequiometrías de las especies presentes.

En la figura 2.1C se grafica la variación de las constantes sucesivas de protonación del Ins(1,2,6)P_3 con la concentración y naturaleza del electrolito soporte. Este efecto de interacción K^+-ligando es más acusado para K^H_1 y K^H_2, por lo que se expresa principalmente en el rango de pH 6 - 9. Su influencia es asimismo máxima para valores de fuerza iónica (en M) en el rango 0 - 0,2 M. Ambas condiciones son compatibles con las encontradas en sistemas biológicos, por lo que la influencia de iones alcalinos, abundantes en medio fisiológico, debe ser tenida en cuenta a la hora del análisis riguroso de los posibles roles intracelulares de los InsP_3.

A partir de la información de la especiación química de los diversos inositol trisfosfatos en medio fisiológico, los investigadores comenzaron a explicar ciertos comportamientos que, a nivel biológico, no tenían causa aparente. Worley *et al*. estudió, en 1987, la dependencia con el pH de la afinidad del Ins(1,4,5)P_3 por su receptor de membrana en células cerebrales[21]. Los resultados obtenidos no eran nada fáciles de interpretar, ya que no había una tendencia clara y sistemática, sino que existían discontinuidades con el pH. A posteriori, L. Schmitt notó que si se superpone la curva de afinidad con el diagrama de especies correspondientes (figura 2.1B), la causa de este comportamiento se hace evidente [17]. La especie completamente deprotonada es la que posee mayor afinidad por el receptor, mientras que el primer protón provoca una disminución apreciable de la intensidad de la unión, originando un hombro en la curva. Por encima de la segunda protonación el sustrato pierde toda asociación, limitando su acción en los procesos de señalización, por lo que los autores proponen un posible rol de cambios menores y agudos de pH en relación con las funciones biológicas del Ins(1,4,5)P_3 como segundo mensajero intracelular. Dado que las especies de la figura 2.1B son "aparentes", es posible que además de estas características de protonación, los iones potasio unidos al

ligando puedan jugar algún rol en el reconocimiento proteína-sustrato. No obstante, no existen aún hoy datos estructurales que apoyen o rechacen esta idea.

Otro ejemplo es el isómero Ins(4,5,6)P_3, sintetizado por L. Schmitt en 1995 [6]. Este miembro posee una afinidad mucho menor por el receptor de membrana IP_3R que el sustrato natural. Esta pérdida en la capacidad de unión, además de deberse probablemente al cambio estructural asociado, se relaciona con las diferencias en las propiedades ácido-base de ambos Ins*P*. En efecto, en la figura 2.1D se muestra el diagrama de distribución de especies para el Ins(4,5,6)P_3 en KCl 0,1 M a 37 °C. Por comparación con el correspondiente al Ins(1,4,5)P_3 (figura 2.1B) la causa es clara: el Ins(4,5,6)P_3 se encuentra completamente protonado a pH fisiológico, provocando, como ya se mencionó para el sustrato natural, una caída en la capacidad de unión al receptor de membrana. De acuerdo con esto, las curvas de δ en función del pH en los espectros de RMN de ^{31}P para los fosfatos 4 y 5, se comportan de forma completamente diferente de un miembro a otro, por lo que el patrón de microprotonación sobre ambos ligandos será en consecuencia muy distinto, afectando el ajuste fino de la interacción del sustrato con el sitio activo [6].

La dilucidación de la especiación química a nivel microscópico ha tenido otras repercusiones en el ámbito de la bioquímica y la biología. De la misma forma que ha ocurrido con el estudio de los procesos macroscópicos, los inositol trisfosfatos mayoritariamente estudiados han sido Ins(1,2,6)P_3 [4] e Ins(1,4,5)P_3 [5,18]. Para el primero, analizado en NEt_4ClO_4 0,1 M a 25 °C, se ha logrado determinar que el orden de protonación es: fosfato unido a C1 (P1), fosfato unido a C6 (P6) y fosfato unido a C2 (P2), el cual se explica debido a consideraciones meramente electrostáticas. P1 está ubicado entre ambos fosfatos, P6 y P2, por lo que experimenta, seguramente, una mayor densidad de carga negativa, la que atrae fuertemente al primer protón que ingresa. Al disminuir la carga sobre P1, el segundo y tercer protón se ubican en los fosfatos restantes, de forma que los tres se encuentran protonados por debajo de pH 6 [4]. A pH fisiológico, los fosfatos involucrados en procesos de protonación son P1 y (en menor grado) P6. En este sentido, una evaluación de los determinantes químicos relacionados con las potenciales acciones farmacológicas, necesario para el diseño racional de los correspondientes agonistas y antagonistas,

deberá sopesar la posible incidencia que el cambio electrostático en ambos fosfatos tiene a nivel estructural. A partir de la evaluación de las distintas microconstantes de equilibrio fue posible, asimismo, determinar que la interacción interfosfato P1 - P6 es, por lejos, la mayor de todas, seguida por la correspondiente a P1 - P2, mientras que P2 y P6 tienden a comportarse de manera independiente[4]. La evaluación de las microconstantes de protonación en presencia de ion K^+, aunque aparentes, permitió también revelar que el orden en el cual los iones potasio interactúan progresivamente con el ligando sigue la misma tendencia que la observada para los cationes H^+, por lo que la capacidad de complejación aumenta con la basicidad del grupo ionizable [4].

Para el Ins(1,4,5)P_3, la resolución completa de su secuencia de protonación, en conjunto con la información aportada por las curvas de afinidad por los receptores IP_3R en función del pH, reveló el rol esencial que cumple el grupo fosfato en posición 5 en el establecimiento de la unión proteína-sustrato[5]. Años después, el estudio de los equilibrios de microprotonación fue revisado por Felemez *et al*.[18], estableciéndose otros factores que modulan la especificidad del receptor. Entre ellos se encuentran las interacciones del tipo C-H···O, establecidas entre los grupos fosfato y los H alquílicos del Ins*P*, las cuales estabilizan en ciertas condiciones una conformación del ligando que es compatible con la arquitectura y distribución de carga del sitio activo. En la búsqueda de datos estructurales, este mismo grupo de investigación trabajó con derivados del Ins(1,4,5)P_3 sustituidos en C6. Utilizando una metodología similar concluyeron sobre el rol esencial que cumple el grupo -OH ecuatorial en esta posición, el que transfiere la información del estado de ionización desde los grupos vecinos P4 y P5 hacia el distante P1, generando un rasgo particular que permite la selectividad del sustrato en su acción biológica[22]. Finalmente, es interesante notar cómo el estudio de la especiación química del sistema a nivel microscópico explica, al menos en forma parcial, la gran afinidad de la adenofostina A por los receptores IP_3R[23]. Si se comparan las constantes de protonación de este agonista (K^H_1 = 8,48, K^H_2 = 6,20, K^H_3 = 4,96) con las del propio Ins(1,4,5)P_3 (K^H_1 = 7,85, K^H_2 = 6,40, K^H_3 = 5,31) en KCl 0,2 M a 37 °C, se advierte que son similares entre sí, incluso en vista de que la diferencia estructural entre ambos compuestos es muy marcada. Más sorprendente aún es el hecho de que la fracción protonada de sus tres grupos fosfatos, P1, P4 y P5, es prácticamente idéntica a pH fisiológico (adenofostina: 5 %, 26 %, 61 %

respectivamente e Ins(1,4,5)P_3: 8 %, 26 %, 57 % respectivamente). Dado que un pequeño cambio estructural de un inositol fosfato a otro cambia drásticamente estos valores, esta similitud reafirma el protagonismo de la distribución de los protones a nivel microscópico y su influencia en la distribución de carga de la molécula, la cual se sabe participa de manera fundamental en la unión receptor-sustrato.

Otro inositol fosfato que ha cobrado importancia en estos últimos años, principalmente por ser uno de los posibles candidatos a sideróforo intracelular seguro desde el punto de vista redox, es el Ins(1,2,3)P_3. No obstante, en la literatura científica sólo se da cuenta de un sólo reporte concerniente a este miembro[16]. Dozol *et al*. ha contribuido mediante el estudio de las constantes de protonación macro y microscópicas y la descripción de algunos parámetros estructurales en relación con la conformación del ligando y tipos de enlaces de hidrógeno intramoleculares establecidos. Sin embargo, dado que los experimentos se realizaron en presencia de grandes cantidades de ion potasio el análisis químico-estructural se encuentra limitado al estado general de protonación del ligando, mientras que quedan fuera todas las interacciones específicas Ins(1,2,3)P_3-K^+. Este tema será abordado con más detalle en este trabajo de tesis.

2.2.2. Equilibrios de formación de complejos

En cuanto a la caracterización del comportamiento químico de los inositol trisfosfatos en presencia de iones metálicos, nuevamente, el miembro que más atención ha atraído es el Ins(1,2,6)P_3. De todas formas, la posterior mejora en los procedimientos sintéticos, hidrolíticos y de separación permitió la ampliación de estos estudios a otros inositol fosfatos. En la tabla 2.3 y 2.4 se resumen los logaritmos de las constantes globales de complejación para algunos InsP_3 con iones mono, di y trivalentes.

La notable avidez de estos ligandos por cationes alcalinos como potasio, provocó que se analizara la posibilidad de la formación de especies complejas estables, con estequiometrías definidas, las cuales tuvieran relevancia en medios ricos en estos iones como el fisiológico. Bieth *et al*. reportó para el Ins(1,2,6)P_3 el conjunto de constantes de formación con toda la familia de los alcalinos, en n-NBu_4Br 0,1 M a 25 °C (tabla 2.3) [24]. Los resultados muestran la

existencia en todos los casos de tres especies mononucleares con distinto grado de protonación del ligando, $[ML]^{5-}$, $[M(HL)]^{4-}$ y $[M(H_2L)]^{3-}$. Asimismo, para los cationes de menor radio, Li^+, Na^+ y K^+, se detecta una especie dinuclear de estequiometría $[M_2L]^{4-}$, la cual no se detecta o lo hace con un error muy grande para los otros dos iones.

Tabla 2.3. Logaritmo de las constantes globales de complejación para algunos *myo*-inositoltrisfosfatos con iones alcalinos.

	log *β* (n-NBu_4Br 0,1 M, 25 °C)*			
Ins(1,2,6)P_3	$[ML]^{5-}$	$[M(HL)]^{4-}$	$[M(H_2L)]^{3-}$	$[M_2L]^{4-}$
Li^+	2,38	11,24	17,83	3,60
Na^+	2,32	11,29	17,93	3,49
K^+	2,58	11,46	18,06	3,84
Rb^+	2,57	11,32	17,80	---
Cs^+	2,51	11,32	17,87	---

*Se muestran sólo los valores con incertidumbre menor a 0,1[24].

Respecto de la estabilidad de los complejos obtenidos, ésta parece ser bastante alta en todos los casos, por lo menos comparada con los valores que usualmente muestran especies complejas con estos mismos metales. La capacidad de quelación que presenta el Ins(1,2,6)P_3 es comparable, o aún mayor, que la correspondiente a ligandos como policarboxilatos (EDTA, NTA), ATP y polifosfatos[24]. A modo de comparación, para el EDTA las constantes de formación de los complejos 1:1 con Li^+, Na^+, K^+, Rb^+ y Cs^+, en condiciones similares, son 2,90, 1,84, 0,80, 0,59 y 0,15 respectivamente. Es importante notar que los procesos caracterizados por las constantes globales de la tabla 2.3, correspondientes a las especies $[M(HL)]^{4-}$ y $[M(H_2L)]^{3-}$, incluyen reacciones de protonación del ligando, por lo que al descontar esta contribución sus valores serían aún menores que los ajustados para $[ML]^{5-}$. El valor promedio de las constantes de formación de la especie $[ML]^{5-}$ es 2,47 ± 0,12, por lo que el ligando no exhibe selectividad alguna frente a los iones alcalinos. La muy baja selectividad del ligando, aunado a la estructura química del mismo, hacen pensar en un modelo estructural donde los tres fosfatos adyacentes cooperen

en la unión del catión M^+, dando un esquema de coordinación flexible, que se adapta a los distintos metales[24].

De acuerdo a los resultados anteriores, a pH = 7,5 y para una relación metal:ligando de 10:1, alrededor de un 40 % del ligando se predice complejado al metal alcalino, por lo que en condiciones fisiológicas, donde esta relación alcanza valores tan altos como 100, es imposible despreciar las formas complejas del ligando [24].

El grupo de B. Spiess ha realizado aportes, además, al análisis de la estabilidad de los complejos de varios InsP_3 con iones M(II) y M(III), como se advierte de los resultados detallados en la tabla 2.4. En general los experimentos se han conducido en un medio no interactuante (NBu_4Br 0,1 M, 25 °C) y, en algunos casos en particular, además en un medio que simula al fisiológico (KCl 0,2 M, 37 °C). Si se realiza una comparación entre ambos conjuntos de constantes de equilibrio la diferencia existente es notoria, incluso en el modelo de especies ajustado. De nuevo, aquí, los iones potasio se encuentran involucrados compitiendo con los diversos metales por los sitios de coordinación del ligando, por lo que, en consecuencia, las constantes determinadas en este segundo medio serán consideradas aparentes.

En ausencia de ion K^+, la interacción del Ins(1,2,6)P_3 con calcio y magnesio provoca la formación de especies de estequiometría 1:1 y 3:1. Específicamente para Ca^{2+}, se detecta una especie adicional, $[Ca_2(H_2L)]$, la cual también se encuentra en solución. El ligando no exhibe selectividad alguna frente a ambos metales, ya que las constantes de equilibrio correspondientes son muy similares. Según se muestra en la figura 2.2A, para una relación metal:ligando de 2:1, las especies $[ML]^{4-}$ y $[M(HL)]^{3-}$ presentan gran estabilidad en un amplio rango de pH (incluido el fisiológico), mientras que $[M(H_2L)]^{2-}$ ocurre sólo en medio ácido y con una baja predominancia. Por el contrario, la especie trinuclear es estable en medio básico, pero su fracción no llega a ser importante debido a la presencia de complejos de estequiometría 1:1. En presencia de potasio el panorama cambia (figura 2.2B), ya que la competencia del ion alcalino provoca la baja en los valores de las constantes de equilibrio y número de especies presentes, así como en la nuclearidad de las mismas[15].

Tabla 2.4. Logaritmo de las constantes globales de complejación para algunos *myo*-inositoltrisfosfatos con iones M(II) y M(III).

	log *β* (NBu_4Br 0,1 M, 25 °C)										log *β* (KCl 0,2 M, 37 °C)						Ref.
Mg^{2+}	$[MgL]^{4-}$	$[Mg(HL)]^{3-}$	$[Mg(H_2L)]^{2-}$				$[Mg_3L]$				$[MgL]^{4-}$			$[Mg_2(HL)]^{-}$			
Ins(1,2,6)P_3	5,61	13,50	19,41				11,28				3,91			13,71			15
Ca^{2+}	$[CaL]^{4-}$	$[Ca(HL)]^{3-}$	$[Ca(H_2L)]^{2-}$	$[Ca_2L]^{2-}$		$[Ca_2(H_2L)]$	$[Ca_3L]$				$[CaL]^{4-}$	$[Ca(HL)]^{3-}$		$[Ca_2(HL)]^{-}$			
Ins(1,2,6)P_3	5,80	13,57	19,33			22,15	11,58				4,06			13,95			15
Ins(1,4,5)P_3	4,59	12,20	18,44	7,22							3,12	10,14					25
Fe^{2+}	$[FeL]^{4-}$	$[Fe(HL)]^{3-}$		$[Fe_2L]^{2-}$	$[Fe_2(HL)]^{-}$				$[Fe(OH)L]^{5-}$		$[FeL]^{4-}$	$[Fe(HL)]^{3-}$	$[Fe_2L]^{2-}$				
Ins(1,2,6)P_3	5,81	13,59		9,92	17,40						4,14	11,30	6,85				19
Ins(1,3,5)P_3	5,02			9,77	16,22				-3,21								
Ins(2,4,6)P_3	5,85			10,60	16,85				-2,33								
Cu^{2+}	$[CuL]^{4-}$	$[Cu(HL)]^{3-}$		$[Cu_2L]^{2-}$	$[Cu_2(HL)]^{-}$				$[Cu(OH)L]^{5-}$		$[CuL]^{4-}$	$[Cu(HL)]^{3-}$		$[Cu_2(HL)]^{-}$		$[Cu(OH)L]^{5-}$	
Ins(1,2,6)P_3	7,91	15,14			18,91				-1,39		6,79	13,05		16,36		-1,18	19
Ins(1,3,5)P_3	6,25	13,26			17,21				-2,07								
Ins(2,4,6)P_3	7,21			12,77	17,49				-1,32								
Zn^{2+}	$[ZnL]^{4-}$	$[Zn(HL)]^{3-}$		$[Zn_2L]^{2-}$	$[Zn_2(HL)]^{-}$				$[Zn(OH)L]^{5-}$		$[ZnL]^{4-}$	$[Zn(HL)]^{3-}$				$[Zn(OH)L]^{5-}$	
Ins(1,2,6)P_3	7,59	14,91		12,90	18,33				-1,92		6,07	12,72				-3,07	19
Ins(1,3,5)P_3	5,45	12,30			15,84				-3,58								
Ins(2,4,6)P_3	6,40	12,86			16,77				-1,89								

Cd^{2+}	$[CdL]^{4-}$	$[Cd(HL)]^{3-}$	$[Cd(H_2L)]^{2-}$	$[Cd_2L]^{2-}$								$[CdL]^{4-}$			$[Cd_2(HL)]^{-}$	$[Cd_3L]$		
Ins(1,2,6)P_3	6,12	13,61	18,73	9,53								4,39			14,67	11,20		26
Pb^{2+}	$[PbL]^{4-}$	$[Pb(HL)]^{3-}$		$[Pb_2L]^{2-}$			$[Pb_3L]$					$[PbL]^{4-}$	$[Pb(HL)]^{3-}$	$[Pb_2L]^{2-}$		$[Pb_3L]$		
Ins(1,2,6)P_3	10,57	16,92		18,48			21,34					6,46	13,31	11,85		17,67		26
$Hg^{2+(*)}$		$[Hg(HL)]^{3-}$		$[Hg_2L]^{2-}$			$[Hg_3L]$											
Ins(1,2,6)P_3		18,75		20,92			25,54											26
Fe^{3+}	$[FeL]^{3-}$	$[Fe(HL)]^{2-}$		$[Fe_2L]$				$[Fe_3L_2]^{6-}$										
Ins(1,2,6)P_3	13,75	20,00		22,21														19
Ins(1,3,5)P_3	12,86	19,35		23,21														
Ins(2,4,6)P_3	13,52			25,05				42,86										
Al^{3+}	$[AlL]^{3-}$	$[Al(HL)]^{2-}$		$[Al_2L]$					$[Al(OH)L]^{4-}$	$[Al(OH)_2L]^{5-}$								
Ins(1,2,6)P_3	13,72	19,18		19,72					6,10									27
Ins(1,4,5)P_3	13,37	18,98							5,84	-1,82								

(*)NEt_4ClO_4 0,1 M a 25 °C.

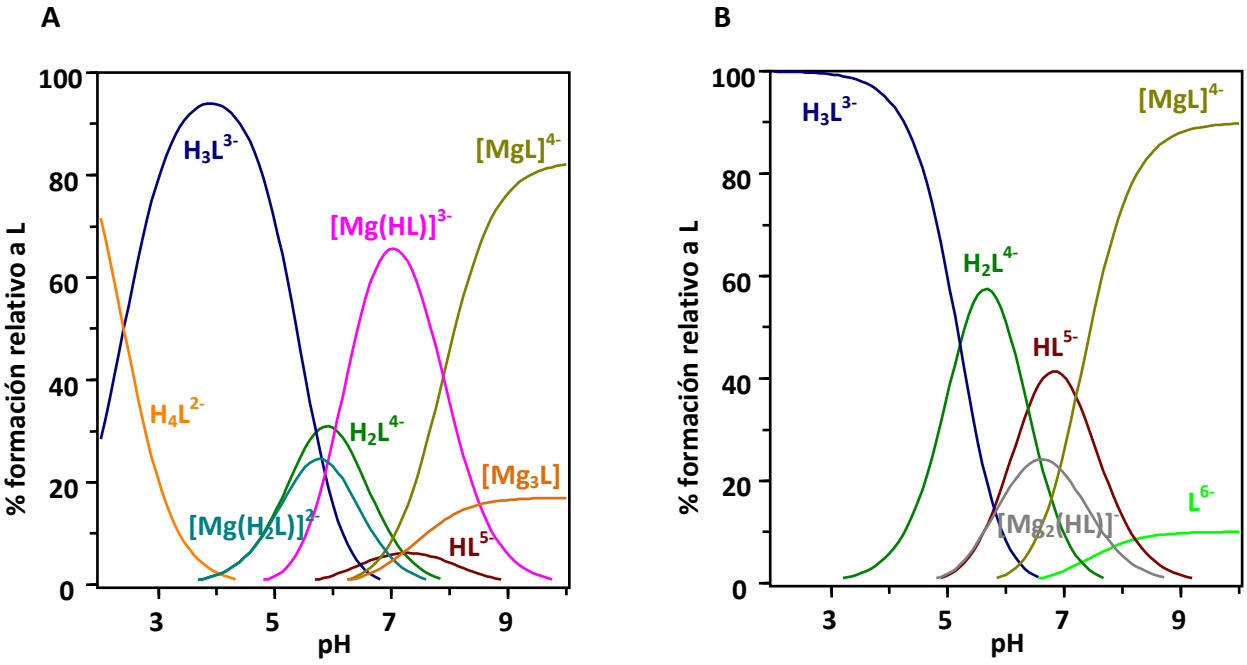


Figura 2.2. Diagramas de distribución de especies para el sistema Ins(1,2,6)P_3-Mg^{2+} en (A) NBu_4Br 0,1 M a 25 °C y (B) KCl 0,2 M a 37 °C ([Mg] = 2 mM y [L] = 1 mM).

El Ins(1,4,5)P_3 interactúa con el ion calcio de forma algo diferente. La pérdida del conjunto de tres fosfatos adyacentes provoca no sólo una disminución de las constantes ajustadas, sino además reduce el número y nuclearidad de las especies encontradas en el modelo[25]. Por comparación con el sistema ATP-Ca(II), los complejos Ins(1,4,5)P_3-Ca(II) son bastante más estables. Más aún, dada la gran diferencia existente para las especies monoprotonadas, diprotonadas y dinucleares, se deduce que la disposición de los grupos fosfatos alrededor de un anillo es más eficiente en los procesos de complejación que la ubicación de los mismos en línea, lo que reafirma el concepto de cooperativismo de los grupos ionizables en el esquema de coordinación. De todas formas, estas consideraciones están realizadas en ausencia de ion potasio, por lo que no deben ser extrapoladas a medios biológicos. En efecto, en KCl 0,2 M y a 37 °C los cálculos muestran que la unión del calcio al ATP está favorecida en todo el rango de pH, en especial cercano al fisiológico[25].

Las propiedades de complejación del Ins(1,2,6)P_3 fueron evaluadas, asimismo, en presencia de iones metálicos pesados como Cd^{2+}, Pb^{2+} y Hg^{2+} (tabla 2.4) [26]. Los complejos obtenidos en un medio no interactuante son más estables aún

que los ajustados en presencia de iones alcalinotérreos. Especies mono, di y trinucleares en distinto grado de protonación fueron detectadas en todo el rango de condiciones aplicadas. En comparación con los iones alcalinotérreos, los iones pesados forman más sistemáticamente el complejo $[M_3L]$ y poseen menor tendencia a la generación de especies protonadas, lo que resalta la mayor afinidad de estos cationes por el ligando[26]. La comparación entre estos valores y los obtenidos para el cadmio en presencia de nucleósidos trisfosfatos revelan que, en presencia de ambos ligandos, el ion Cd^{2+} se asociará preferencialmente al Ins(1,2,6)P_3[26]. Este resultado apoya la hipótesis de que uno de los efectos de este inositol fosfato a nivel biológico está relacionado con su capacidad para quelar cadmio. En detalle, ha sido patentada una composición farmacéutica conteniendo como compuesto activo una sal de este InsP_3, cuyos efectos están relacionados con el alivio y tratamiento de afecciones derivadas de la intoxicación con cadmio y aluminio (N° de patente: 4,735,936, USA) [28].

Las técnicas de potenciometría de alta resolución y RMN de ^{31}P han sido aplicadas también para el estudio del comportamiento químico del Ins(1,2,6)P_3, Ins(1,3,5)P_3 e Ins(2,4,6)P_3 con Cu^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{2+} [19]. En medio no interactuante, para todos los metales se observa la presencia de varias especies coexistiendo por encima de pH = 5. De medio ácido a básico, los complejos se suceden en el orden $[M_2(HL)]^-$, $[M_2L]^{2-}$, $[M(HL)]^{3-}$, $[ML]^{4-}$ y $[M(OH)L]^{5-}$. El primero de ellos es capaz de formarse a bajo pH ya que la carga que exhibe el ligando en estas condiciones es -3, debido fundamentalmente a la gran acidez de los grupos fosfato diprotonados. La presencia del complejo $[ML]^{4-}$ es generalizada en todos los sistemas, pero su forma protonada aparece solamente en algunos de ellos. A pH relativamente alto, la especie presenta como ligando el ion OH^-, derivado de la deprotonación de las moléculas de agua de coordinación, dando lugar al complejo hidroxilado[19].

Una comparación rigurosa entre los sistemas respecto de la capacidad de complejación que exhiben los ligandos es una tarea difícil, debido a las diferencias existentes entre los modelos químicos. Si se toma como guía las constantes de formación del complejo $[ML]^{4-}$, es posible afirmar que, en general, la disposición de tres fosfatos adyacentes es más efectiva a la hora de unir el centro metálico que tres fosfatos alternados sobre el anillo. Para este

último caso, la presencia de un grupo ionizable en posición axial provoca un aumento en la estabilidad de la especie compleja.

A través de los desplazamientos químicos obtenidos en presencia de iones Zn^{2+}, el grupo de B. Spiess ha logrado determinar el posible esquema de coordinación de los complejos mono y homodinucleares[29]. En el primero, los grupos fosfatos involucrados parecen ser P1 y P6, ambos en posición ecuatorial, dispuestos estratégicamente para quelar al catión. En este caso, el grupo fosfato sobre C2 establece un segundo sitio de coordinación, lo que permite la formación de un complejo dinuclear pobremente estabilizado. Estas conclusiones se derivan de una revisión de un reporte anterior del mismo grupo[19], en donde los autores fallaron en asignar adecuadamente los espectros de RMN. Este error se debió a una confusa intersección de las señales en medio básico, la cual varía apreciablemente en presencia de grandes cantidades de ion K^+ [29]. Esto enfatiza aún más la necesidad de considerar los efectos que este catión imparte en el sistema.

La fuerza de la interacción de los inositol trisfosfatos con cationes parece aumentar, según lo expuesto hasta el momento, con la carga del centro metálico. De acuerdo con esto, como se advierte de la tabla 2.4 los logaritmos de las constantes de formación de los InsP_3 con Fe^{3+} y Al^{3+} corresponden a los valores más altos ajustados. En estos sistemas, las especies que se forman poseen estequiometrías similares a las ya analizadas para los iones M(II), pero se detectan otras nuevas, como el complejo $[Fe_3L_2]^{6-}$ del Ins(2,4,6)P_3 y especies dihidroxiladas como $[Al(OH)_2L]^{5-}$ para el Ins(1,4,5)P_3 [19,27]. Ambas formas complejas del ligando muestran tres aspectos importantes: la gran afinidad de los inositol trisfosfatos por iones muy cargados, que provoca la formación de especies di y trinucleares deprotonadas, la aparición de los complejos en valores menores de pH, y la capacidad de hidrólisis del metal, que el aluminio retiene más allá de estar complejado.

Mediante la comparación de los valores de la tabla 2.4 para el aluminio, se deduce que no existe una selectividad real por parte de los InsP_3 analizados, por lo que las variaciones estructurales entre ellos no repercuten de manera significativa en la capacidad de complejación de estas moléculas. Mediante ciertas aproximaciones, Mernissi-Arifi y sus colaboradores[27] fueron capaces de estimar que en condiciones fisiológicas el Ins(1,4,5)P_3 se une al Al^{3+} más

fuertemente que el ATP. Aunque las implicancias biológicas de este fenómeno no quedan demasiado claras, debido principalmente a que en el medio intracelular existe un gran número de otro cationes en solución, esta asociación podría involucrar un trastorno en la concentración de Ins(1,4,5)P_3, afectando la cascada de procesos de señalización celular asociados y dando una explicación razonable a la relación que se ha visto que este metal tiene en la etiología de desórdenes neurológicos.

2.3. *myo*-inositol tetrakis y pentakisfosfatos

Para los inositol tetrakis y pentakisfosfatos, existe un muy bajo número de trabajos publicados concernientes sólo a sus características ácido-base. Hasta el momento, no existe tratamiento alguno de las características de complejación de estos Ins*P*.

En la tabla 2.5 se resumen los datos existentes de constantes sucesivas de protonación de algunos de los miembros tetrafosforilados. Analizando los valores en términos generales, se advierte que K^{H}_{1} ha aumentado en promedio desde los valores correspondientes a los InsP_3, de acuerdo con un aumento en dos unidades en la carga del ligando. Por otra parte, los valores de la primera constante de protonación disminuyen en el sentido Ins(1,3,4,5)P_4 > Ins(1,2,3,6)P_4 > Ins(1,2,3,5)P_4 > Ins(1,2,4,5)P_4, por lo que nuevamente la unión del primer H^+ se ve favorecida por la disposición adyacente y ecuatorial de los grupos fosfatos.

Tabla 2.5. Logaritmo de las constantes sucesivas de protonación para algunos *myo*-inositoltetrakisfosfatos.

	KCl 0,2 M (37 °C)				Ref.
Ligando	log K^{H}_{1}	log K^{H}_{2}	log K^{H}_{3}	log K^{H}_{4}	
Ins(1,3,4,5)P_4	9,92	7,66	6,36	5,23	[30]
Ins(1,2,3,6)P_4	9,75	8,18	6,78	5,56	[16]
Ins(1,2,3,5)P_4	9,41	7,79	6,23	5,50	[16]
Ins(1,2,4,5)P_4	9,39	7,65	6,06	5,23	[30]

Mediante el uso de experimentos de RMN de ^{31}P Dozol *et al*. han discutido cualitativamente aspectos como la pobre interacción existente entre P5 y P1/P2/P3 en el Ins(1,2,3,5)P_4 y el cooperativismo ácido-base entre los grupos P6 y P1 en el Ins(1,2,3,6)P_4 [16]. Por su parte, Guédat *et al*. han resuelto los microequilibrios de protonación para los miembros Ins(1,3,4,5)P_4 e Ins(1,2,4,5)P_4, lo que les permitió determinar el grado en el que cada grupo fosfato se encuentra protonado en condiciones fisiológicas[30]. Los resultados muestran que existen grandes diferencias en el nivel de basicidad del grupo fosfato en C5; P5 es más básico en Ins(1,3,4,5)P_4 que en Ins(1,2,4,5)P_4. En este sentido, estos datos dan una explicación al hecho confuso de que al igual que el Ins(1,4,5)P_3, un aumento del pH favorece la unión del Ins(1,2,4,5)P_4 a los receptores IP_3R, mientras que la afinidad del Ins(1,3,4,5)P_4 decrece de forma continua desde pH = 5,5 hasta pH = 9,0 [30].

El único InsP_5 que ha sido estudiado desde el punto de vista de su comportamiento químico en solución es el Ins(1,3,4,5,6)P_5, cuyo rol en el metabolismo de los inositol fosfato es capital; constituye un nodo metabólico en células eucariotas, por el que todos los inositol fosfatos deben pasar en su biosíntesis o catabolismo. Más allá de su gran importancia, sólo se encuentra en la bibliografía especializada un único reporte, en el cual se realiza la síntesis del mismo y se determinan sus características ácido-base macro y microscópicas a pH fisiológico (KCl 0,2 M, 37 °C)[31]. No existe al momento ningún reporte concerniente al comportamiento ácido-base microscópico del ligando a otros valores de pH, que incluyan, por ejemplo, compartimientos vesiculares ácidos, ni respecto de su comportamiento en presencia de iones M(I), M(II) o M(III) relevantes desde el punto de vista biológico.

Para culminar esta sección es necesario remarcar que todos los experimentos descritos aquí se realizaron en presencia de un importante exceso de ion K^+, en un intento por simular condiciones fisiológicas intracelulares. Por esto, las constantes anteriores siguen siendo "aparentes", y es imposible desligar los efectos que el protón y el ion potasio ejercen sobre el inositol fosfato. Esto desdibuja las conclusiones a nivel estructural, oscureciendo la posibilidad de la descripción de los sitios de unión del ion potasio y su concomitante influencia en la geometría, estado de ionización y densidad de carga de las formas biológicamente activas del ligando.

2.4. *myo*-inositol hexakisfosfato

2.4.1. Especiación química en solución

La habilidad inusual de complejación metálica que exhiben los inositol fosfatos llega a su extremo en el miembro de mayor grado de fosforilación, el fitato. Este Ins*P* incorpora seis grupos fosfato, por lo que su carga en forma totalmente deprotonada asciende a -12. Este anión y sus especies protonadas no sólo presentan un grado de hidratación desmedido, sino además la capacidad, en un amplio rango de pH, de formar especies complejas con distinta estequiometría. Si a este fenómeno se le adiciona la posibilidad, revisada en el capítulo 1, de asumir dos conformaciones diferentes en solución, la complejidad del sistema se incrementa.

Luego de varios años de estudio del comportamiento químico del fitato en diversos ambientes, un artículo de revisión publicado en el año 2008 por el grupo de S. Sammartano afirma que no se tiene claro su patrón de reactividad química [32]. Esto se debe, fundamentalmente, a que para la mayoría de los sistemas no existen datos termodinámicos cuantitativos, mientras que en otros casos, dada la complejidad existente, los datos presentan grandes discrepancias entre los diversos autores. Comparado con el gran número de reportes que han salido a la luz concernientes a las propiedades y aplicaciones del fitato (ver capítulo 1), existen relativamente pocos que enfrenten desde un punto de vista cuantitativo las características ácido-base del mismo [33-51]. Esto ha sido de esta manera incluso frente al hecho de que los equilibrios ácido-base afectan marcadamente fenómenos como la solubilidad y capacidad de complejación del fitato. No obstante este campo está en continuo crecimiento y se pueden encontrar reportes bastante recientes que amplían y revisan los datos termodinámicos existentes [52-55], algunos publicados incluso de forma simultánea o con posterioridad a aquellos derivados de esta tesis.

En la tabla 2.6 se resumen algunos conjuntos de constantes sucesivas de protonación para el fitato, seleccionadas en base a la calidad de la metodología experimental utilizada. Como se advierte, existen discordancias significativas entre los datos termodinámicos reportados por distintas fuentes. Las mismas se asocian, predominantemente, al efecto ya discutido de la naturaleza del electrolito soporte utilizado para fijar la fuerza iónica, aunque la complejidad

del sistema constituye un aporte no menor. En efecto, existen trece especies del InsP_6 con distinto grado de protonación, las que coexisten en un amplio rango de pH y poseen estabilidades muy similares, haciendo que su caracterización precisa sea un reto. Un claro ejemplo lo brinda el primer reporte realizado sobre las protonaciones del fitato[37], donde los autores publican sólo tres valores promedio de constantes de equilibrio. Pocos trabajos describen el ajuste de constantes de protonación en diferentes medios[40,41,47,48,51,56], la gran mayoría se restringe al trabajo en un sólo medio, principalmente sales de tetraalquilamonio[33,34,36], sodio[35,37,42-45,50] y potasio[38,39,49]. Esto hace que un análisis comparativo sea muy complejo, ya que la naturaleza del catión del electrolito soporte genera una influencia importante sobre los resultados; a una fuerza iónica dada, los valores de log *K* pueden variar hasta dos o tres unidades en presencia o ausencia de ion alcalino.

Este fenómeno, ya descrito para otros inositol fosfatos, se expresa aquí de manera exacerbada. Como se advierte de la figura 2.3A, la interacción fitato-catión monovalente es incluso importante a bajos valores de fuerza iónica. El número promedio de protones unidos al ligando disminuye sustancialmente por competencia del Li^+ o el Cs^+ con los H^+ a una concentración de metal de sólo 0,1 M [32]. Este efecto repercute de forma directa sobre las constantes de protonación aparentes ajustadas. Por ejemplo, en presencia de sodio, el logaritmo de K^H_3 disminuye drásticamente y cambia incluso su variación con la fuerza iónica, como se muestra en la figura 2.3B [46]. En este marco, el grupo de investigación liderado por Silvio Sammartano ha realizado varios trabajos en relación con la derivación de ecuaciones que modelen la dependencia de las constantes de equilibrio con la fuerza iónica[46-48,50,51]. Los resultados muestran que los parámetros dependen fuertemente no sólo del valor de *I*, sino además de las características del medio. Como era de esperar, la naturaleza del anión del electrolito soporte no afecta de forma importante la estabilidad de las especies del ligando, como lo confirma un reporte actual [50].

Respecto de las características ácido-base del fitato, aunque las primeras tres especies protonadas del ligando poseen similar estabilidad, esta se ve trastocada por la presencia en exceso de iones alcalinos de manera diferencial. En términos generales, el LiCl provoca que log K^H_1 > log K^H_2 > log K^H_3, mientras

que el NaCl genera que log K^{H}_{2} > log K^{H}_{1} > log K^{H}_{3} y para KCl y CsCl se observa que log K^{H}_{1} > log K^{H}_{3} > log K^{H}_{2} (ver tabla 2.6). Las entalpías y entropías de protonación han sido reportadas en NaCl a diferentes fuerzas iónicas[47] y en 0,2 M de KCl [38,57]. Más allá de las diferencias en las condiciones aplicadas, los resultados dejan claro que los Δ*H* de protonación aumentan levemente a medida que se adicionan más H^{+} al ligando, mientras que el término *T*Δ*S* es significativamente mayor que Δ*H* debido, entre otros factores, al aumento en los grados de libertad del sistema por disminución de la carga de las especies y liberación de las moléculas de agua de hidratación[38,47,57].

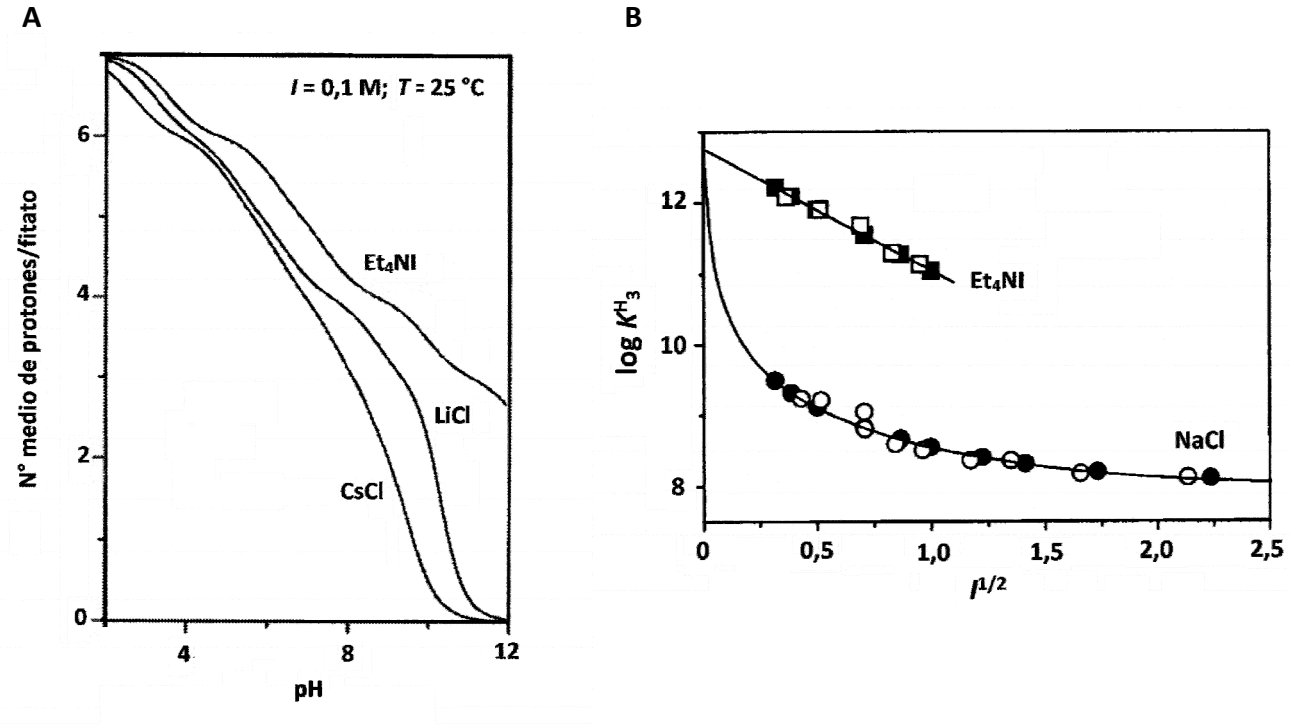


Figura 2.3. (A) Número promedio de protones unidos al fitato *vs.* pH en tres medios diferentes ([L] = 1 mM)[32]. (B) Logaritmo de K^{H}_{3} del fitato en función de la fuerza iónica en NaCl y NEt_4I[46]. Los puntos en negro y blanco corresponden a los valores calculados y experimentales respectivamente.

Las constantes de formación de complejos con iones alcalinos han sido determinadas por varios autores, principalmente mediante potenciometría [32]. Li y Wahlberg[42], analizando datos de protonación a 25 °C en $NaClO_4$ a 0,15 M ≤ *I* ≤ 3,0 M, encontraron que las especies complejas presentes son $[Na_7L]^{5-}$, $[Na_7(HL)]^{4-}$, $[Na_5(H_2L)]^{5-}$, $[Na_4(H_3L)]^{5-}$, $[Na_3(H_4L)]^{5-}$, $[Na_2(H_5L)]^{5-}$ y $[Na_4(H_6L)]^{2-}$. El fitato resultó complejado en un 90 % a pH entre 4 y 10 para una *I* = 1 M.

Tabla 2.6. Selección de constantes sucesivas de protonación para el *myo*-inositolhexakisfosfato.[a]

Condiciones			Constantes sucesivas de protonación del InsP_6												Ref.
I (M)	T (°C)	Medio	log K^H_1	log K^H_2	log K^H_3	log K^H_4	log K^H_5	log K^H_6	log K^H_7	log K^H_8	log K^H_9	log K^H_{10}	log K^H_{11}	log K^H_{12}	
0,10	25	NEt_4I	16,70	14,40	12,21	9,92	7,53	6,11	3,53						46
0,10	25	n-NBu_4Br	>12	>12	>12	11,50	7,97	6,41	3,93	2,73	2,00	<1,50	<1,50	<1,50	41
0,10	25	LiCl	9,71	9,46	8,63	7,60	6,27	5,00	2,63						48
0,10	25	$NaNO_3$	9,48	9,98	9,53	8,20	6,49	5,17	3,02						50
0,10	25	NaCl	9,58	9,84	9,50	8,14	6,50	5,25	2,88						46
0,10	25	KCl	10,24	9,50	9,93	8,37	6,62	5,35	2,93						48
0,10	25	CsCl	10,42	10,33	10,11	8,62	6,53	5,16	3,18						51
0,10	36	KCl	10,81	9,90	9,76	9,33	7,48	6,00	3,78	2,06					49
0,15	25	$NaClO_4$	8,59	10,53	9,02	7,82	6,13	4,88	2,49	1,98					42
0,15	**37**	**NMe_4Cl**	**10,8**	**10,5**	**10,33**	**8,79**	**6,90**	**5,72**	**3,10**	**1,9**	**1,9**				**56**
0,17	25	NEt_4ClO_4	>13	>13	12,3	9,92	7,42	6,13	3,59	2,0	2,4	1,0	<1	<1	34
0,20	25	KCl	9,53	9,53	9,19	7,98	6,25	5,20	3,16	2,38	2,38	1,92	1,92	1,92	39
0,50	25	NEt_4I	14,91	13,29	11,55	9,79	7,50	6,12	3,61						46
0,50	25	LiCl	9,06	8,81	7,96	6,93	5,63	4,39	2,08						48
0,50	25	$NaNO_3$	8,73	9,39	8,82	7,57	5,88	4,59	2,60						50
0,50	25	NaCl	8,93	9,19	8,83	7,48	5,88	4,65	2,37						46
0,50	25	KCl	9,59	8,85	9,26	7,71	6,01	4,77	2,43						48

0,50	25	CsCl	9,79	9,54	9,51	7,93	5,78	4,51	2,49						51
1,00	25	NEt_4I	13,60	12,48	11,06	9,71	7,50	6,16	3,72						46
1,00	25	LiCl	8,83	8,57	7,69	6,67	5,40	4,15	1,92						48
1,00	25	$NaNO_3$	8,36	9,22	8,51	7,34	5,66	4,39	2,52						50
1,00	25	NaCl	8,69	8,95	8,56	7,21	5,65	4,42	2,22						46
1,00	25	$NaClO_4$	8,41	9,19	8,29	7,03	5,38	4,14	1,77	1,80					42
1,00	25	KCl	9,35	8,61	8,99	7,45	5,77	4,54	2,28						48
1,00	25	CsCl	9,82	9,38	9,41	7,77	5,57	4,34	2,33						51
3,00	25	LiCl	8,60	8,34	7,34	6,35	5,18	3,95	2,00						48
3,00	25	NaCl	8,47	8,71	8,21	6,89	5,43	4,22	2,30						46
3,00	25	$NaClO_4$	8,29	8,62	8,01	6,61	5,07	3,86	1,52	1,63					42
3,00	25	KCl	9,13	8,38	8,64	7,13	5,56	4,34	2,36						48

[a] En negrita se resaltan los resultados obtenidos en condiciones fisiológicas previo a este trabajo de tesis.

Por medidas potenciométricas en NEt_4I, LiCl, NaCl, KCl y CsCl, a T = 25 °C [46,48,51], el grupo de S. Sammartano detectó las especies $[M_6L]^{6-}$, $[M_5(HL)]^{6-}$, $[M_4(H_2L)]^{6-}$, $[M_3(H_3L)]^{6-}$, $[M_2(H_4L)]^{6-}$, $[M(H_5L)]^{6-}$, $[M(H_6L)]^{5-}$, $[M_2(H_5L)]^{5-}$, $[M_3(H_4L)]^{5-}$, $[M_4(H_3L)]^{5}$, $[M_5(H_2L)]^{5-}$, $[M_6(HL)]^{5-}$ y $[M_7L]^{5-}$, cuyas estabilidades siguen el orden $Li^+ > Na^+ > K^+ \geq Cs^+$. En el año 2005, mediante la comparación de constantes de protonación medidas en $NaClO_4$ y NMe_4Cl, se reportaron las especies presentes del fitato en condiciones similares a las fisiológicas (I = 0,15 M a 37,0 °C)[56] : $[Na_2(H_5L)]^{5-}$, $[Na_3(H_4L)]^{5-}$, $[Na_4(H_3L)]^{5-}$, $[Na_5(H_2L)]^{5-}$ y $[Na_6L]^{6-}$. Debido a la alta carga del fitato y sus especies en solución, es posible que en un ambiente complejo se formen especies mixtas con los iones alcalinos. Sin embargo, un estudio reciente demuestra que este tipo de complejos no es particularmente estable[51], por lo que su predominancia estará dictada por factores estadísticos.

La alta densidad de carga negativa a la que se hace alusión también origina una fuerte asociación del InsP_6 por iones di y trivalentes. En la tabla 2.7 se resume una selección de constantes de formación de complejos metálicos del fitato con iones M(II) y M(III). El trabajo en el área ha proveído de información extremadamente útil sobre la naturaleza de los complejos formados y su solubilidad en variadas condiciones, tanto en el caso de iones alcalinotérreos[40,58-60] como para iones de transición[57,60-64]. Sin embargo, existen diferencias no menores entre los resultados, nuevamente aquí originadas en las distintas condiciones experimentales aplicadas.

Graf[58] reportó constantes de formación de especies InsP_6-Ca^{2+} a varias temperaturas y valores de fuerza iónica. Encontró que las constantes de equilibrio aparentes variaban con la concentración del fitato (debido a su alta carga, que influye en la fuerza iónica ajustada) y la temperatura. A pH 4,8 se identificaron tres complejos, aunque las estequiometrías no fueron definidas por el autor. Entre pH 4,8 y 10,4 se observa un incremento en un factor del orden de 10^3 en la afinidad metal-ligando, y se estiman más de tres sitios de coordinación metálica. Por medidas calorimétricas y potenciométricas, Marini *et al*.[65] concluyeron que la unión fitato-calcio es en un amplio rango de pH un proceso reversible. El proceso de asociación es endotérmico (ΔH = 94,1 kJ/mol) y la remoción de los protones parece transcurrir al mismo tiempo que la adición de los iones metálicos.

Tabla 2.7. Selección de constantes de formación de complejos para el *myo*-inositolhexakisfosfato.[a]

Metal	Condiciones			$i\ M^{n+} + H_jL^{(12-j)-} \rightarrow M_iH_jL^{(12-in-j)-}$				Otras especies *i*:*j*	Método*	Ref.
	I (M)	*T* (°C)	Medio	log K_{13}	log K_{14}	log K_{15}	log K_{16}			
Mg^{2+}	0,00	10	---	7,93	6,49	5,47		2:3; 2:4; 2:5; 3:2; 3:3; 3:4; 3:5	Pot.	66
	0,00	25	---	7,82	6,66	6,03			Pot.	
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**	**10,5**	**9,76**	**8,76**	**7,25**	**1:2**	**Pot.**	**56**
Ca^{2+}	0,00	10	---	7,67	6,34	5,31		2:3; 2:4; 2:5; 3:2; 3:3; 3:4; 3:5	Pot.	66
	0,00	25	---	7,64	5,82	5,41			Pot.	
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**		**8,3**	**8,4**	**7,4**		**Pot.**	**56**
Cd^{2+}	0,10	25	$NaNO_3$	6,04	4,84	4,22	4,02	1:1; 1:2; 1:7	DP-ASV	55
	0,15	25	NaCl		5,25	4,71	4,42	1:7; 2:4; 2:5; 2:6; 2:7; 3:4	Pot.	67
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**	**9,70**	**8,76**	**7,53**	**6,92**	**1:2**	**Pot.**	**56**
Cu^{2+}	0,00	25	---		10,28	7,79		2:5	Pot.	50
	0,13	25	$NaNO_3$	7,53	5,88	4,47	3,28	1:2	DP-ASV	54
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**	**13,50**	**12,15**	**9,07**	**5,73**		**Pot.**	**56**
Zn^{2+}	0,15	25	$NaNO_3$	8,30	6,75	5,24	4,62	1:2; 2:1; 2:2; 2:3; 2:4	Pot.	52
	0,15	25	$NaNO_3$	6,99	5,42	4,03	3,30	1:1; 1:2	DP-ASV	54
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**	**11,30**	**10,30**	**8,54**	**6,94**		**Pot.**	**56**
Ni^{2+}	0,13	25	$NaNO_3$	6,11	4,48	3,90	2,28	1:1; 1:2	Pot.	54
	0,13	25	$NaNO_3$	6,03	4,72	3,41	2,10	1:1; 1:2	DP-ASV	
	0,10	36	KCl	7,27	5,96	5,18	5,05	1:0; 1:1; 1:2; 1:7	Pot.	49
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**		**8,78**	**8,44**	**7,20**		**Pot.**	**56**

Co^{2+}	0,10	36	KCl	7,04	5,02	3,76	3,27	1:0; 1:1; 1:2; 1:7	Pot.	53
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**	**9,1**	**7,90**	**6,96**	**6,26**	**1:2; 1:7**	**Pot.**	56
Mn^{2+}	0,10	36	KCl	9,47	7,84	6,51	5,98	1:0; 1:1; 1:2; 1:7	Pot.	53
	0,15	**37**	**$NaClO_4$**		**8,78**	**8,44**	**7,20**		**Pot.**	56
Fe^{2+}	**0,15**	**37**	**$NaClO_4$**	**10,52**	**8,99**	**7,71**	**5,94**	**1:2**	**Pot.**	56
Hg^{2+}	0,15	25	NaCl	15,64	15,94	16,26	16,45	1:0; 1:1; 1:2; 1:7; 2:0; 2:1; 2:2	Pot.	68
	1,00	25	NaCl	14,74	15,17	15,54	15,70		Pot.	
Pb^{2+}	0,12	25	$NaNO_3$	7,42	5,95	4,52	3,16	1:1; 1:2	Pot.	54
	0,14	25	$NaNO_3$	6,89	5,70	4,73	3,35	1:1; 1:2	DP-ASV	54
Fe^{3+}	**0,15**	**37**	**$NaClO_4$**	**18,20**	**12,7**	**8,89**		**1:2**	**Pot.**	56
Al^{3+}	**0,15**	**37**	**$NaClO_4$**	**20,1**	**16,4**	**12,2**	**8,48**	**1:2**	**Pot.**	56

[a] En negrita se resaltan los resultados obtenidos por nuestro grupo en condiciones fisiológicas.

* Potenciometría (Pot). Voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial (DP-ASV).

Unos pocos trabajos reportan constantes de estabilidad de complejos del fitato con iones alcalinotérreos[56,66,69]. Pequeñas variaciones fueron observadas al variar el ion metálico; en general, aquellos con menor radio iónico poseen mayores valores de constantes de estabilidad, por lo que un modelo electrostático de interacción metal-ligando es la opción más factible [70]. Un estudio detallado de la capacidad de complejación del InsP_6 frente al calcio y magnesio fue realizado por Crea *et al*.[66], utilizando el método potenciométrico con electrodos de vidrio sensibles a H^+ y a Ca^{2+}/Mg^{2+}, en NaCl a 10 y 25 °C y para diferentes valores de fuerza iónica. Los resultados muestran una distribución de especies muy similar para ambos cationes, con la formación de especies $[M_i(H_jL)]^{(12-2i-j)-}$ con $1 \le i \le 3$ y $2 \le j \le 5$. El modelo de especies ajustado está de acuerdo con un reporte anterior de Odani *et al*., los que trabajaron a 25 °C en NEt_4ClO_4 0,1 M[69], y las constantes de estabilidad resultaron muy dependientes del valor de fuerza iónica establecido, seguramente por la formación de especies fitato-Na^+. Los únicos datos termodinámicos publicados en condiciones fisiológicas y en presencia de ion calcio ($NaClO_4$ 0,15 M, T = 37,0 °C)[56], muestran especies solubles de estequiometría $[Ca(H_4L)]^{6-}$, $[Ca(H_5L)]^{7-}$ y $[Ca(H_6L)]^{4-}$ en exceso de ligando, mientras que ocurre la precipitación de una fase sólida a valores altos de relación metal/InsP_6.

La solubilidad de las formas complejas es dependiente del pH y un factor siempre limitante a la hora del estudio en solución de los sistemas. Tamim y Angel[71] han analizado varios resultados reportados, los que señalan que la estabilidad de los complejos con fitato decrece en el orden $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+}$. Entre tanto, otros investigadores[72] relacionan la afinidad del InsP_6 por los iones metálicos con la capacidad de los mismos de inhibir su hidrólisis a pH neutro, encontrando el orden $Zn^{2+} >> Fe^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$.

De entre todos los iones divalentes de transición, quien posee más reportes en el tema es el cadmio. Dado que este metal es tóxico y considerado como un contaminante ambiental, el uso del fitato como potencial secuestrante ha motivado el estudio de la especiación química en sistemas mixtos Cd^{2+}-InsP_6. Muchos de los reportes abordan el tema de la interacción metal-fitato, pero sólo unos pocos proveen de datos termodinámicos cuantitativos [34,56,67,73-75]. En detalle, existen algunas diferencias en los modelos de especies propuestos.

Mientras De Stefano *et al*.[67] proponen la formación de complejos polinucleares del tipo $[Cd_i(H_jL)]^{(12-2i-j)-}$ con $i = 1, 2$ y $4 \leq j \leq 7$ (en NaCl, a 25 °C, para diferentes valores de fuerza iónica), Bebot-Brigaud *et al*.[34] considera sólo la generación de complejos solubles 1:1 (NEt_4ClO_4, a 20 °C, I = 0,17 M). Esta discrepancia se debe a dos factores: en primer lugar las diferencias en las relaciones metal:ligando utilizadas en ambos casos, y por otra parte la presencia de Cl^- en los experimentos de De Stefano, el cual interactúa con el cadmio de manera significativa. En el año 2010, De Stefano y sus colaboradores determinaron nuevos valores de constantes de formación de complejos fitato-cadmio (ver tabla 2.7) y éstos resultaron compatibles con los reportados hasta el momento en las mismas condiciones[55]. Otros resultados fueron publicados por Vasca *et al*[75]. Estos autores detectaron la presencia de una única especie, $[Cd(H_5L)]^{5-}$, con un logaritmo de la constante de formación a partir de H_5L^{7-} de 3,64, trabajando en $NaClO_4$ 3 M a 25 °C. Un interesante estudio calorimétrico fue realizado por Evans y Martin[73] en KNO_3 0,2 M a 25 °C, de donde resultan calores de protonación endotérmicos (4,3 kJ/mol ≤ ΔH ≤ 14,1 kJ/mol), los que concuerdan con los de otros sistemas metal/fitato[61,63]. El factor entrópico resulta positivo, debido a que, como ya se comentó, ocurre una liberación de moléculas de agua en el proceso que aumenta los grados de libertad del sistema. En condiciones fisiológicas simuladas (en $NaClO_4$, I = 0,15 M, T = 37,0 °C), los datos muestran la formación, en condiciones de exceso de ligando, de especies del tipo $[Cd(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $2 \leq j \leq 6$ [56].

Respecto de la interacción del fitato con el ion cobre(II), pocos reportes tratan el tema cuantitativamente. Algunos trabajos publican datos solo de tipo cualitativo, estimando la afinidad metal-ligando[74,76,77]. Otros estudios han sido llevados a cabo por Martin y Evans[61,63] y, al igual que en el caso del cadmio, los autores caracterizaron los procesos de complejación como endotérmicos. Los primeros datos termodinámicos cuantitativos de la interacción Cu^{2+}-fitato provienen de Bebot-Brigaud *et al*. [34] en NEt_4ClO_4 a 20 °C, I = 0,17 M. Se detectan en estas condiciones complejos 1:1 metal:ligando, debido al leve exceso de ligando utilizado en las corridas experimentales. Por su parte, Crea *et al*. realizaron medidas potenciométricas con electrodos sensibles a H^+ y Cu^{2+} en $NaNO_3$ a diferentes fuerzas iónicas, ajustando la temperatura a 25 °C [50]. Usando relaciones metal:ligando entre 1:1 y 4:1 las especies detectadas fueron $[Cu(H_5L)]^{5-}$, $[Cu_2(H_5L)]^{3-}$ y $[Cu(H_4L)]^{6-}$. En una etapa posterior, este mismo grupo

amplió sus estudios utilizando técnicas electroquímicas[54], y los resultados, detallados en la tabla 2.7, están de acuerdo con los determinados anteriormente en condiciones similares. En acuerdo parcial a estos resultados, el modelo de mejor ajuste que encontraron Vasca *et al*.[75] en $NaClO_4$ 3 M a 25 °C incluye las especies $[Cu(H_5L)]^{5-}$ y $[Cu_2(H_3L)]^{5-}$, con log K_{15} = 2,63 y K_{23} = 8,97 (ver definición de las constantes en tabla 2.7). Los resultados obtenidos en condiciones similares a las fisiológicas[56] están de acuerdo con aquellos revisados para Bebot-Brigaud *et al*.[34] y comprenden un modelo muy similar al del sistema fitato-cadmio(II), excepto que la especie $[Cu(H_2L)]^{8-}$ no llega a ser detectada.

El fitato se comporta de manera similar frente al resto de los iones +2 de transición. Bebot-Brigaud *et al*. [34], trabajando en las condiciones mencionadas anteriormente, reportaron la formación de especies 1:1 metal:ligando para los iones Co(II), Ni(II) y Zn(II). Para los dos primeros los complejos poseen estequiometrías del tipo $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $1 \le j \le 7$, mientras que en el caso del cinc se observa la formación adicional del complejo $[ZnL]^{10-}$ en medio altamente básico. Mediante el uso de RMN de ^{31}P, se reportan en ese mismo trabajo los posibles sitos de coordinación del metal con el ligando. Sin embargo, el análisis está realizado por inspección visual de las curvas, por lo que las conclusiones son solo cualitativas. De acuerdo con lo comentado para otros iones M(II), Martin y Evans[57] determinaron un valor positivo del ΔH de asociación. No obstante, estos estudios arrojaron el extraño valor de 3,5 moles de iones Zn^{2+} unidos por mol de ligando, lo que no es coherente con el resto de los estudios aquí citados. En el año 2009 Crea *et al*. realizaron un estudio detallado de la capacidad de complejación del fitato por el ion Zn(II), mediante el uso de titulaciones potenciométricas y calorimétricas[52]. Trabajando a 25 °C en $NaNO_3$ y utilizando diversos valores de fuerza iónica las especies detectadas fueron del tipo $[Zn_i(H_jL)]^{(12-2i-j)-}$ con $i = 1$ y $3 \le j \le 6$ e $i = 2$ y $1 \le j \le 4$. Por su parte Vasca *et al*. [75] trabajando en $NaClO_4$ 3 M a 25 °C, caracterizaron los complejos $[Ni(H_5L)]^{5-}$ y $[Ni_2(H_3L)]^{5-}$, con log K_{15} = 3,78 y K_{23} = 11,85 (ver definición en tabla 2.7). Para otros iones +2 estos mismos autores proponen modelos similares, a saber: Co^{2+} (log K_{15} = 3,84 y K_{23} = 11,96), Mn^{2+} (log K_{15} = 3,85 y K_{23} = 12,43), Pb^{2+}(log K_{15} = 3,87 y K_{23} = 12,87). En 2010 el grupo de S. Sammartano extendió sus estudios electroquímicos a los sistemas conteniendo plomo, níquel y cinc[54], obteniendo modelos de especies similares consistentes en complejos

$[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $1 \leq j \leq 6$, cuyas constantes de estabilidad para alguno de ellos se detallan en la tabla 2.7. Respecto de las especies presentes en condiciones fisiológicas, los únicos datos termodinámicos disponibles corresponden a Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II) y Zn(II)[56], y Mn(II), Co(II) y Ni(II)[49,53], detallados en la tabla 2.7. Existen discrepancias entre los modelos ajustados por ambos grupos y en parte esto se debe a las diferencias en las condiciones utilizadas. Sin embargo, en forma sistemática, De Carli y sus colaboradores[49,53] detectan especies con menor grado de protonación del ligando, posiblemente porque sus corridas potenciométricas se extienden por encima de pH = 10, lo que permite la detección (con mayor error experimental) de complejos del tipo $[ML]^{10-}$ y sus formas levemente protonadas.

El único reporte que trata la interacción InsP_6-Hg^{2+} corresponde al trabajo de De Stefano *et al*[68]. En él, trabajando con dos valores de fuerza iónica (0,15 y 1 M en NaCl) a 25 °C, se detectaron ocho complejos mononucleares y tres dinucleares, cuyos datos se resumen en la tabla 2.7. Como resultado, el fitato resultó ser un agente secuestrante de Hg^{2+} muy eficiente, indicando un posible uso en la remediación de sitios contaminados por este catión.

Finalmente, los parámetros termodinámicos reportados en la literatura concernientes a la asociación del InsP_6 con iones trivalentes son realmente escasos[45,56,73]. De ellos, los de la referencia[56] corresponden a determinaciones realizadas en condiciones fisiológicas, y por tanto extrapolables a medios biológicos. En estas condiciones se detectaron complejos de estequiometría $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $2 \leq j \leq 5$ para Fe(III) y $2 \leq j \leq 6$ para Al(III) (tabla 2.7). En general y más allá de las discrepancias entre los valores, la interacción metal-ligando admite ser modelada en término electrostáticos, en acuerdo con lo visto hasta el momento. Por esto, las constantes ajustadas se ubican varios órdenes de magnitud por encima de las correspondientes a iones mono y divalentes. Asimismo, la formación de las especies complejas es altamente endotérmica, con un factor entrópico muy favorable[73].

2.4.2. Estudios al estado sólido

Las características de complejación del InsP_6 no sólo se limitan a la formación de complejos solubles. Según los trabajos en el tema, la precipitación de fases

sólidas se ve favorecida a altos valores de pH y relación metal:ligando. Un análisis detallado de la literatura muestra, además, una gran variación en los resultados de la caracterización al estado sólido, debido fundamentalmente a las disímiles condiciones de obtención, entre las cuales se destacan concentración relativa de metal y fitato, pH y presencia adicional de iones alcalinos. Más aún, las fases aisladas son, en términos generales, extremadamente amorfas y difíciles de purificar por su baja solubilidad. En efecto, una búsqueda de estructuras cristalinas en la base de datos cristalográfica de Cambridge sólo reporta tres resultados: el ligando Ins(2)P_1·H_2O(s)[78], el compuesto [$(C_6H_{14}N)_4Na(HL)$]·6,5H_2O·CH_3OH(s) del Ins(1,2,3)P_3[79] y la sal dodecasódica del InsP_6 $Na_{12}L$·38H_2O(s)[80,81]. Muchos de los primeros reportes abordan la problemática desde un punto de vista meramente cualitativo[57,61-63,77,82-86], no reportando las estequiometrías de los complejos sólidos. Estos trabajos reafirman la complejidad de los procesos involucrados; las relaciones estequiométricas de las fases sólidas se reportan dependientes del tiempo de precipitación[77] y se detectan incluso fenómenos de cooperativismo y competencia en soluciones mixtas de iones metálicos[83]. Es de destacar el trabajo denodado de C.J. Martin y W.J. Evans en este campo. Sin embargo, aunque su serie de estudios calorimétricos[57,61,62,84-86] arrojó algo de luz respecto de los procesos de formación de algunos fitatos sólidos, la caracterización de las fases resultó muy primaria y los calores de precipitación medidos no corresponden a datos termodinámicos que puedan ser adjudicados sólo a los procesos de precipitación, ya que están afectados por fenómenos como complejación y variación de la solvatación de las especies. A este panorama se debe agregar la publicación de artículos cuya metodología de trabajo hace poco fiables los resultados y las conclusiones extraídas. Como ejemplo, Z. He y sus colaboradores[87] sintetizaron en 2006 compuestos metálicos del InsP_6 a los cuales caracterizaron a través de análisis elemental de P, C y metal. Sin embargo, las estequiometrías propuestas carecen de sentido, ya que al no ajustarse a los datos experimentales se le asignó un valor de pureza a cada complejo. No en vano, un artículo de revisión del año 2008[32] caracteriza a una gran parte de las contribuciones al tema como muy poco confiables.

Respecto de los fitatos sólidos de metales alcalinos y alcalinotérreos los resultados cuantitativos son diversos. Algunos autores reportan la formación

de precipitados de fórmula general Ca_5H_2L [59,88,89]. Estas fases parecen estar altamente hidratadas, ya que luego de un secado en condiciones extremas siguen conservando hasta 8 aguas de hidratación[89]. Más recientemente, Nash *et al*.[90] asumen la generación de la fase no estequiométrica $[Ca_{4,6}(H,Na)_{2,8}L]$ a pH entre 6 y 7,5 y relación molar metal:ligando desde 1:1 a 6:1. Gryspan y Cheryan[88] y Crea *et al*.[91] han investigado la dependencia de los procesos de precipitación con el pH y relación molar de los componentes, y han llegado a la conclusión de que a bajos valores de pH se promueve la formación de especies sólidas protonadas, y que el estado de protonación disminuye con el aumento de concentración del metal. En medio básico y a altas relaciones metal:ligando ocurre la generación de complejos del tipo $Ca_6L(s)$[58,91]. Más aún, si se encuentran presentes los iones Na^+ o K^+ en exceso, es posible observar la formación de especies del tipo $Ca_5M_2L{\cdot}xH_2O(s)$, con M = Na^+ o K^+ [91,92]. Esto no parece ocurrir a pH más bajos [89], incluso utilizando grandes cantidades de ion potasio.

La variación en la composición propuesta de estas especies sólidas es enorme, y otros autores han reportado la aparición de complejos como $Ca_2Na_8L{\cdot}3H_2O(s)$[93], $Na_{12}L{\cdot}3H_2O(s)$[93] y $Na_2Mg_5L(s)$[94]. En contraposición a todos estos datos químico-estructurales, un estudio integral de la capacidad de complejación del fitato al estado sólido llevó a Evans y Pierce Jr.[95] a reconocer que en medio neutro no se obtienen fases simples. En presencia de relación P:Mg^{2+} 1:1 se obtiene un sólido no estequiométrico con 1,31:1≤ P:Mg^{2+} ≤1,37:1. Trabajando en condiciones de exceso de metal y alto pH, se han logrado caracterizar de forma completa las fases sólidas estequiométricas $Mg_5H_2L{\cdot}22H_2O(s)$ y $Ca_5H_2L{\cdot}16H_2O(s)$, compatibles con las fórmulas químicas de las especies solubles detectadas en condiciones fisiológicas[56,96]. El alto grado de hidratación de las estructuras y su variación con las condiciones de obtención y almacenamiento provee, en parte, de una causa viable a la diversidad de estequiometrías ajustadas hasta el momento.

Respecto de los complejos al estado sólido del fitato con iones de transición el panorama es muy similar, reinando una importante discordancia en los resultados. Por una parte, Evans y Pierce Jr.[95] destacan que en medio neutro los sólidos obtenidos en presencia de exceso de Co(II), Mn(II), Cu(II) y Fe(II) resultan no estequiométricos, no llegando a concordancia en los resultados

incluso luego de un número muy grande de repeticiones. Sin embargo, en las mismas condiciones pero en presencia de defecto de ion metálico, De Carli y sus colaboradores[53] obtienen complejos del tipo $[K_6M(H_4L)](s)$ para Mn(II) y Co(II) por precipitación lenta luego de algunas semanas. Este mismo grupo estudió asimismo el sistema fitato-Ni(II) pero no aventuran ninguna información sobre la naturaleza de el o los sólidos formados[49]. El pH parece ser un factor importante, ya que en presencia de exceso de ion cobalto y a pH = 11,5, el complejo que se logra aislar es $[Co(H_2L)]\cdot nH_2O(s)$, con n = 19 - 22 [34]. Más aún, las características del medio en el que se realiza la síntesis provee de otro parámetro a tener en cuenta; ha sido reportado que el uso de una mezcla agua:metanol 1:20 (v:v) da lugar en medio neutro a compuestos del tipo $Na_3M_5L(OH)\cdot 9H_2O(s)$ con M = Mn(II) y Zn(II) [97]. Adicionalmente, la presencia de grandes cantidades de anión cloruro se ha relacionado con la obtención de fases con estequiometrías del tipo $[M_6(H_iL)Cl_i]\cdot nH_2O(s)$, con (*i*:*n*) = (4:2) para Mn(II), Co(II) y Ni(II), (2:2,5) para Cu(II), (2:1) para Zn(II) y (6:6) para Sn(II) [75].

Algunos reportes han ahondado en el tema intentando generar modelos estructurales de las fases sólidas. Rodrigues-Filho *et al*.[97] han estudiado complejos mixtos del tipo $Na_3M_5L(OH)\cdot 9H_2O(s)$ con M = Mn(II) y Zn(II) y, mediante el uso de espectroscopía de RMN de ^{13}C al estado sólido, EPR y espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), han logrado establecer un modelo tentativo de arreglo espacial de los complejos metálicos. Por otra parte, Mali y sus colaboradores[98], analizaron el entorno del hierro(III) en el fitato correspondiente, mediante RMN de ^{31}P y espectroscopía de absorción de rayos X. Encontraron estequiometrías variables para las fases obtenidas y una geometría octaédrica del poliedro de coordinación del centro metálico. El modelo estructural propuesto involucra la unión de varias moléculas de ligando a varios iones Fe^{3+}, en una red de enlaces covalentes que se extiende en las tres dimensiones.

Al margen de lo antedicho, poco se sabe aún en esta área. Además de su importancia a nivel nutricional, estas fases están siendo probadas en varios campos aplicados, entre los cuales se cuenta la formación de nanopartículas biocompatibles[99] y la remoción de actínidos en aguas naturales.[90]. Esto aumenta la necesidad y el interés por la dilucidación de las características químicas y estructurales de estos sólidos del InsP_6.

2.4.3. Comportamiento en condiciones fisiológicas

La descripción del comportamiento químico del InsP_6 en condiciones similares a las fisiológicas ha sido reportada en dos publicaciones recientes[56,96]. En estos trabajos, conducidos en $NaClO_4$ 0,15 M a 37 °C, se reportan los valores de constantes de protonación y complejación del fitato con Mg(II), Ca(II), Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Al(III) y Fe(III), como además la caracterización de las fases sólidas de Mg(II) y Ca(II), a través de la determinación de las estequiometrías de los complejos y su solubilidad. Los resultados, resaltados en negrita en la tabla 2.7, muestran que los procesos químicos involucrados son básicamente dos, dependientes de la relación molar InsP_6-metal: la formación de especies aniónicas solubles de estequiometría 1:1 en condiciones de exceso de fitato y la formación de compuestos poco solubles con relación molar metal:fitato igual a 5:1 ($Mg_5H_2L{\cdot}22H_2O(s)$ y $Ca_5H_2L{\cdot}16H_2O(s)$) en caso de exceso de metal.

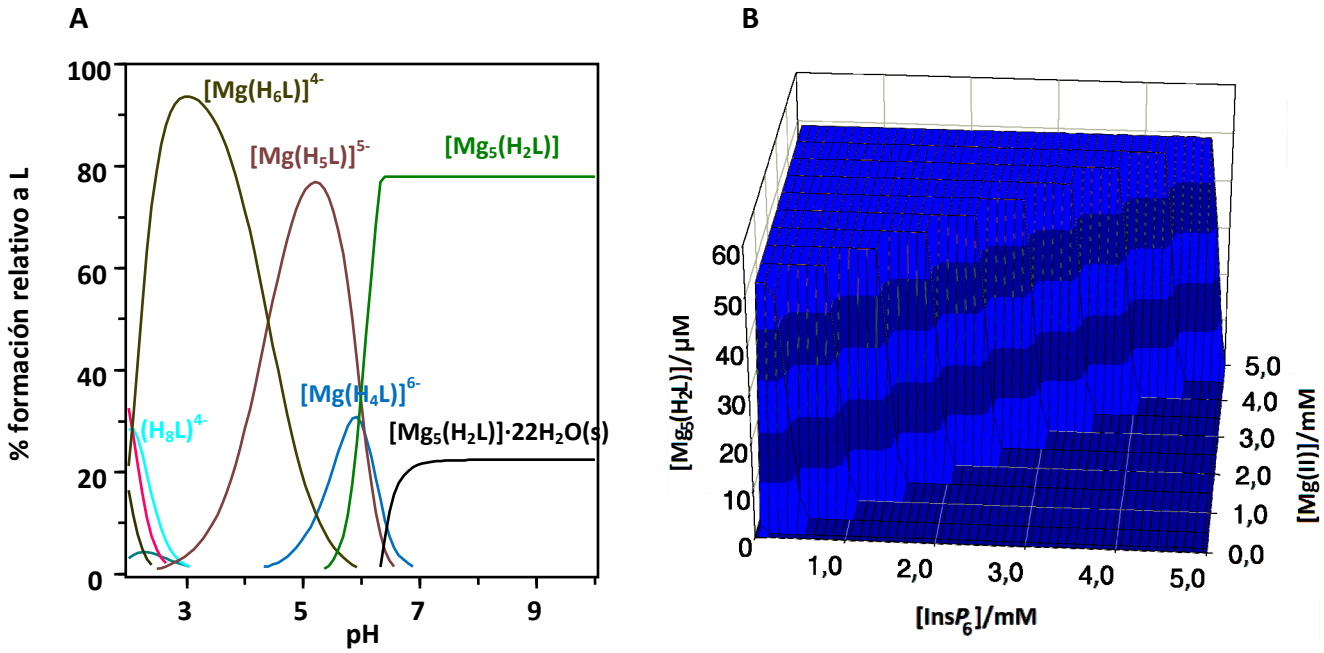


Figura 2.4. Comportamiento químico del fitato en presencia de magnesio en $NaClO_4$ 0,15 M a 37 °C. (A) Diagrama de distribución de especies en condiciones citosólico-nucleares ([L] = 60 µM, $[Mg]_{libre}$ = 0,5 mM). (B) Variación de la concentración de la especie pentamagnésica soluble con la concentración de metal y ligando a pH = 7,5.

Estos datos permitieron dar cuenta de las especies químicas predominantes en el interior y exterior de las células y evaluar algunos de los roles biológicos propuestos para el fitato. En condiciones que simulan el compartimento citosólico-nuclear ($[L]_{total}$ = 60 µM, $[Mg]_{libre}$ = 0,5 mM, 37,0 °C), el diagrama de distribución de especies es el que se muestra en la figura 2.4A. Se predice en base a estos resultados una asociación completa del ligando al magnesio intracelular, en forma de una especie soluble de estequiometría $[Mg_5(H_2L)]$, idéntica a la del sólido correspondiente. Este complejo pentamagnésico, correspondiente a la forma citosólico-nuclear del fitato, posee un comportamiento singular a pH = 7,5, como se detalla en la figura 2.4B. Su formación está favorecida, en estas condiciones, por un aumento en la concentración de ion metálico, pero debido a la precipitación del fitato de magnesio su nivel se encuentra limitado a un máximo de 49 µM. Por tanto, se deduce que la concentración intracelular de fitato soluble está limitada a este valor; dado que la $[L]_{total}$ se estima en 60 µM, el resto debe encontrarse unido a alguna estructura celular o precipitado junto al ion magnesio. Estos resultados se mantienen incluso considerando los valores máximos de $[Ca^{2+}]$ durante los procesos de señalización celular, por lo que, contrariamente a lo que ha sido sugerido, el InsP_6 no interaccionaría con este ion en el núcleo y citosol de las células.

El análisis de la especiación química del fitato en condiciones citosólico-nucleares tiene consecuencias, igualmente, en la interacción Fe-InsP_6. Una de las funciones biológicas potenciales del fitato es la de ser un agente antioxidante intracelular de bajo peso molecular. Sin embargo, el uso de los datos termodinámicos adquiridos en condiciones fisiológicas permite rechazar esta hipótesis. En presencia de concentraciones de hierro (50 µM) mucho mayores que las reportadas a nivel intracelular, el fitato continúa asociado completamente a magnesio, por lo que químicamente no constituye un buen sideróforo. Esto ha redirigido la atención de los investigadores a otro miembro de los inositol fosfatos, el Ins(1,2,3)P_3, cuyo análisis químico-estructural es parte fundamental de esta tesis.

Otra aplicación de los datos potenciométricos obtenidos en condiciones fisiológicas, corresponde a la predicción de las formas químicas del ligando en presencia de exceso de ion calcio. El valor de solubilidad del fitato de calcio es

aún menor que el de magnesio. Como consecuencia, en condiciones vesiculares o extracelulares, donde el ion Ca^{2+} se presenta en gran concentración, las simulaciones demuestran que el fitato se encuentra completamente precipitado en forma de fitato de calcio. Este fenómeno es el que explica uno de los roles del InsP_6 revisado en el capítulo 1: la acumulación de un sólido exógeno de fitato y calcio(II) que protege al organismo *Echinococcus granulosus* de su hospedador.

3. Referencias bibliográficas

1. Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R. *Pure and Applied Chemistry* **2000,** *72*, 1453-1470.
2. Xu, P.; Price, J.; Wise, A.; Aggett, P. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1992,** *47*, 119-130.
3. Spiers, I. D.; Barker, C. J.; Chung, S. K.; Chang, Y. T.; Freeman, S.; Gardiner, J. M.; Hirst, P. H.; Lambert, P. A.; Michell, R. H.; Poyner, D. R.; Schwalbe, C. H.; Smith, A. W.; Solomons, K. R. H. *Carbohydrate Research* **1996,** *282*, 81-99.
4. Mernissi-Arifi, K.; Schmitt, L.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Analytical Chemistry* **1995,** *67*, 2567-2574.
5. Schmitt, L.; Bortmann, P.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1993,** 2257-2263.
6. Schmitt, L.; Spiess, B.; Schlwerer, G. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1995,** *5*, 1225-1230.
7. Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. *Inorganic Chemistry. Principles of Structure and Reactivity;* cuarta ed.; HarperCollins College: New York, 1993.
8. Bjerrum, N. Z. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1923,** *106*, 219-242.
9. Westheimer, F. H.; Shookhoff, M. W. *Journal of the American Chemical Society* **1939,** *61*, 555-560.
10. Kirkwood, J. G.; Westheimer, F. H. *The Journal of Chemical Physics* **1938,** *6*, 506-517.
11. Eberson, L.; Wadso, I. *Acta Chemica Scandinavica* **1963,** *17*, 1552-1562.
12. Daniele, P. G.; Rigano, C.; Sammartano, S. *Talanta* **1983,** *30*, 81-87.
13. Daniele, P. G.; Rigano, C.; Sammartano, S. *Analytical Chemistry* **1985,** *57*, 2956-2960.
14. Ashby, J. H.; Crook, E. M.; Datta, S. P. *Biochemical Journal* **1954,** *56*, 198-207.
15. Bieth, H.; Jost, P.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *39*, 59-73.
16. Dozol, H.; Blum-Held, C.; Guedat, P.; Maechling, C.; Lanners, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Molecular Structure* **2002,** *643*, 171-181.
17. Schmitt, L.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1991,** *1075*, 139-140.
18. Felemez, M.; Bernard, P.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122*, 3156-3165.
19. Mernissi-Arifi, K.; Wehrer, C.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1994,** *55*, 263-277.
20. Shvets, V. I.; Stepanov, A. E.; Schmitt, L.; Spiess, B.; Schlewer, G. Synthesis and complexation properties of inositol-phosphates. En *Inositol Phosphates and Derivatives. Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential*, Reitz, A. B., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1991; pp 155-171.
21. Worley, P. F.; Baraban, J. M.; Supattapone, S.; Wilson, V. S.; Snyder, S. H. *Journal of Biological Chemistry* **1987,** *262*, 12132-12136.
22. Felemez, M.; Ballereau, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *New Journal of Chemistry* **2000,** *24*, 631-638.
23. Felemez, M.; Marwood, R. D.; Potter, B. V. L.; Spiess, B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999,** *266*, 334-340.
24. Bieth, H.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1991,** *41*, 37-44.
25. Schmitt, L.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1992,** *45*, 13-19.
26. Lapp, C.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1991,** *42*, 257-266.

27. Mernissi-Arifi, K.; Bieth, H.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1995,** *57*, 127-133.
28. Siren, M. Pharmaceutical Composition containing Inositol trisphosphate. U.S. Patent. N° 4,735,936, 1988.
29. Mernissi-Arifi, K.; Wehrer, C.; Schiewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1996,** *61*, 63-67.
30. Guédat, P.; Schlewer, G.; Krempp, E.; Riley, A. M.; Potter, B. V. L.; Spiess, B. *Chemical Communications* **1997,** 625-626.
31. Riley, A. M.; Trusselle, M.; Kuad, P.; Borkovec, M.; Cho, J.; Choi, J. H.; Qian, X.; Shears, S. B.; Spiess, B.; Potter, B. V. L. *ChemBioChem* **2006,** *7*, 1114-1122.
32. Crea, F.; De Stefano, C.; Milea, D.; Sammartano, S. *Coordination Chemistry Reviews* **2008,** *252*, 1108-1120.
33. Costello, A. J. R.; Glonek, T.; Myers, T. C. *Carbohydrate Research* **1976,** *46*, 159-171.
34. Bebot-Brigaud, A.; Dange, G.; Fauconnier, N.; Gérard, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999,** *75*, 71-78.
35. Isbrandt, L. R.; Oertel, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1980,** *102*, 3144-3148.
36. Brigando, C.; Mossoyan, J. C.; Favier, F.; Benlian, D. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995,** 575-578.
37. Barré, R.; Courtois, J. E.; Wormser, G. *Bulletin de la Societe de chimie biologique* **1954,** *36*, 455-474.
38. Marini, M. A.; Evans, W. J.; Martin, C. J. *Analytical Letters* **1981,** *14*, 707-717.
39. Evans, W. J.; McCourtney, E. J.; Shrager, R. I. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1982,** *59*, 189-191.
40. Bieth, H.; Jost, P.; Spiess, B.; Wehrer, C. *Analytical Letters* **1989,** *22*, 703-717.
41. Bieth, H.; Spiess, B. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* **1986,** *182*, 1935-1943.
42. Li, N.; Wahlberg, O. *Acta Chemica Scandinavica* **1989,** *43*, 401-406.
43. Li, N.; Wahlberg, O. *Acta Chemica Scandinavica* **1989,** *43*, 331-339.
44. Balogi, Z.; Làsztity, L. S. *Acta chimica academiae scientarium hungaricae* **1991,** *128*, 393-400.
45. Siddiqi, K. S.; Shah, S. A.; Aqra, F. M. A. M.; Tabassum, S.; Zaidi, S. A. A.; Benlian, D. *Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry* **1993,** *32A*, 421-423.
46. De Stefano, C.; Milea, D.; Sammartano, S. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2003,** *48*, 114-119.
47. De Stefano, C.; Milea, D.; Sammartano, S. *Thermochimica Acta* **2004,** *423*, 63-69.
48. De Stefano, C.; Milea, D.; Pettignano, A.; Sammartano, S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003,** *376*, 1030-1040.
49. De Carli, L.; Rosso, N. D.; Schnitzler, E.; Carneiro, P. I. B. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **2006,** *26*, 19-26.
50. Crea, P.; De Stefano, C.; Milea, D.; Porcino, N.; Sammartano, S. *Biophysical Chemistry* **2007,** *128*, 176-184.
51. Crea, F.; Crea, P.; De Stefano, C.; Milea, D.; Sammartano, S. *Journal of Molecular Liquids* **2008,** *138*, 76-83.
52. Crea, F.; De Stefano, C.; Milea, D.; Sammartano, S. *Journal of Solution Chemistry* **2009,** *38*, 115-134.
53. De Carli, L.; Schnitzler, E.; Ionashiro, M.; Szpoganicz, B.; Rosso, N. D. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2009,** *20*, 1515-1522.
54. Cigala, R. M.; Crea, F.; Stefano, C. D.; Lando, G.; Milea, D.; Sammartano, S. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2010,** *55*, 4757-4767.
55. De Stefano, C.; Lando, G.; Milea, D.; Pettignano, A.; Sammartano, S. *Journal of Solution Chemistry* **2010,** *39*, 179-195.
56. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
57. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *26*, 169-183.
58. Graf, E. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1983,** *31*, 851-855.
59. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *27*, 17-30.
60. Nolan, K. B.; Duffin, P. A.; McWeeny, B. J. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1987,** *40*, 79-85.
61. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *28*, 39-55.
62. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *30*, 101-119.
63. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *29*, 241-248.

64. Champagne, E. T.; Hinojosa, O. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *30*, 15-33.
65. Marini, M. A.; Evans, W. J.; Morrist, N. M. *Journal of Applied Biochemistry* **1985,** *7*, 180-191.
66. Crea, P.; de Robertis, A.; De Stefano, C.; Sammartano, S. *Biophysical Chemistry* **2006,** *124*, 18-26.
67. De Stefano, C.; Milea, D.; Porcino, N.; Sammartano, S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006,** *386*, 346-356.
68. De Stefano, C.; Milea, D.; Porcino, N.; Sammartano, S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006,** *54*, 1459-1466.
69. Odani, A.; Takamido, R.; Yamauchi, O. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1997,** *67*, 378.
70. Martell, A. E.; Hancock, R. D. *Metal Complexes in Aqueous Solutions;* Plenum Press: New York, 1996.
71. Tamim, N. M.; Angel, R. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003,** *51*, 4687-4693.
72. Maenz, D. D.; Engele-Schaan, C. M.; Newkirk, R. W.; Classen, H. L. *Animal Feed Science and Technology* **1999,** *81*, 177-192.
73. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1988,** *34*, 11-18.
74. Persson, H.; Türk, M.; Nyman, M.; Sandberg, A. S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998,** *46*, 3194-3200.
75. Vasca, E.; Materazzi, S.; Caruso, T.; Milano, O.; Fontanella, C.; Manfredi, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002,** *374*, 173-178.
76. Lonnerdal, B. *International Journal of Food Science and Technology* **2002,** *37*, 749-758.
77. Champagne, E. T.; Fisher, M. S. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 217-223.
78. Yoo, C. S.; Blank, G.; Pletcher, J.; Sax, M. *Acta Crystallographica Section B* **1974,** *30*, 1983-1987.
79. Spiers, I. D.; Freeman, S.; Schwalbe, C. H. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications* **1995,** 2219-2220.
80. Blank, G. E.; Pletcher, J.; Sax, M. *Acta Crystallographica* **1975,** *B31*, 2584-2592.
81. Blank, G. E.; Pletcher, J.; Sax, M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1971,** *44*, 319-325.
82. Champagne, E. T.; Fisher, M. S.; Hinojosa, O. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 199-215.
83. Champagne, E. T. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *31*, 29-42.
84. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1988,** *32*, 259-268.
85. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1992,** *45*, 105-113.
86. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1991,** *41*, 245-252.
87. He, Z.; Honeycutt, C. W.; Zhang, T.; Bertsch, P. M. *Journal of Environmental Quality* **2006,** *35*, 1319-1328.
88. Grynspan, F.; Cheryan, M. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1983,** *60*, 1761-1764.
89. Evans, W. J.; Pierce, A. G. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1981,** *58*, 850-851.
90. Nash, K. L.; Jensen, M. P.; Schmidt, M. A. *Journal of Alloys and Compounds* **1998,** *271-273*, 257-261.
91. Crea, F.; Crea, P.; de Robertis, A.; Sammartano, S. *Chemical Speciation and Bioavailability* **2004,** *16*, 53-59.
92. Evans, W. J.; Marini, M. A.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1983,** *19*, 129-132.
93. Posternak, S. *Helvetica Chimica Acta* **1921,** *4*, 150-157.
94. O'Dell, B. L.; De Boland, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1976,** *24*, 804-808.
95. Evans, W. J.; Pierce, A. G. *Journal of Food Science* **1982,** *47*, 1014-1015.
96. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.
97. Rodrigues-Filho, U. P.; Vaz, J.; Felicissimo, M. P.; Scarpellini, M.; Cardoso, D. R.; Vinhas, R. C. J.; Landers, R.; Schneider, J. F.; McGarvey, B. R.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 1973-1982.
98. Mali, G.; Sala, M.; Arcon, I.; Kaucic, V.; Kolar, J. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110*, 23060-23067.
99. Ganesan, K.; Epple, M. *New Journal of Chemistry* **2008,** *32*, 1326-1330.

Sección I

myo-inositolhexakisfosfato (InsP_6)

Capítulo 5

Especiación química del InsP_6 en solución

En este capítulo se discuten los resultados de la especiación química del fitato en solución acuosa y en presencia de variados iones metálicos. Dado que los experimentos potenciométricos fueron realizados en un medio no interactuante, esto dará oportunidad de estudiar el comportamiento ácido-base y de complejación del InsP_6, a la vez que se analiza cuantitativamente la influencia que los iones tienen sobre la estabilidad relativa de las especies del ligando. La inclusión de iones con distintos radios y configuraciones electrónicas hará posible, asimismo, la evaluación de los diversos factores que modulan la interacción metal-InsP_6. Se finaliza el análisis con un estudio del desempeño del fitato como agente secuestrante, evaluando su selectividad frente a varios iones metálicos y comparando sus propiedades de complejación con las de otros ligandos.

1. Introducción

El *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato, denominado también InsP_6, ácido fítico o fitato, es una molécula que presenta seis grupos fosfato esterificados sobre el anillo de inositol. Éstos pueden asociarse cada uno a dos protones, haciendo que la forma completamente protonada del ligando se represente entonces como $H_{12}L$.

La mayoría de las propiedades y aplicaciones del fitato están moduladas sustancialmente por su particular comportamiento químico en solución, en donde interacciona de forma importante con muchos iones metálicos y no metálicos, proteínas y almidón, principalmente por fuerzas de tipo electrostático [1-4]. Más aún, la biología y bioquímica de esta molécula están fuertemente interrelacionadas con su capacidad quelante de cationes multivalentes. Los científicos han afrontado la problemática desde hace ya tres décadas, a través del estudio de la especiación química de los sistemas InsP_6-

M(I)/M(II)/M(III)[5]. Estos trabajos se han conducido en condiciones que simulan los ambientes en los cuales el fitato ejerce su acción, donde existen grandes cantidades de cationes que regulan la fuerza iónica del medio. Éstos interaccionan fuertemente con el InsP_6, dificultando un análisis de la capacidad ácido-base y de complejación del ligando. Es necesario para un entendimiento de estos determinantes químicos, por tanto, un estudio termodinámico del comportamiento químico de esta molécula en ausencia y en presencia de variados iones metálicos, en condiciones que simulen las fisiológicas y en un medio no interactuante. Se presentan en este capítulo los resultados a este respecto.

2. Parte experimental

Los equilibrios de formación de complejos del InsP_6 con los iones Li^+, Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{3+} y Al^{3+} fueron estudiados en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, mediante la determinación potenciométrica de las constantes de equilibrio respectivas, de acuerdo con las condiciones detalladas en el capítulo 4. Al menos 7 titulaciones fueron llevadas a cabo en un rango de concentraciones de 0,5 a 5 mM para el ligando, 1 a 100 mM para metales alcalinos, 1 a 5 mM para metales alcalinotérreos, 0,4 a 1,5 mM para metales M(II) de transición y 0,5 a 2 mM para los iones Fe^{3+} y Al^{3+}. En estas condiciones, se cubrieron las relaciones molares InsP_6:M 0,01 a 2,5 para metales alcalinos, 0,3 a 3 para metales alcalinotérreos, 0,5 a 5 para iones +2 de transición y 1 a 5 para los iones +3. Debido a la relativa baja afinidad de los iones M^+ por el ligando, se utilizaron altas concentraciones de metal y bajas relaciones InsP_6:M^+. Para el sistema conteniendo litio, la constante de celda se determinó en presencia de una cantidad del ion metálico similar a la empleada en las corridas experimentales. Usando la misma estrategia se determinaron, asimismo, las constantes de formación de complejos de InsP_6 con los iones Sr^{2+} y Ba^{2+}, en $NaClO_4$ 0,15 M a 37,0 °C.

Las constantes de hidrólisis para los iones Fe^{3+} y Al^{3+} se determinaron en las mismas condiciones de temperatura y fuerza iónica, de acuerdo con la metodología expuesta en el capítulo 4. El proceso de hidrólisis del Fe(III) en presencia de fitato se estudió, además, por espectroscopía UV-visible, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, y en las condiciones también citadas en el capítulo 4.

Se utilizaron concentraciones de ligando y metal de 1,02 mM y 0,32 mM respectivamente. Se empleó una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico, se ajustó el ancho de rendija a 5 nm y se estableció la línea de base con una solución 0,15 M de cloruro de tetrametilamonio.

3. Resultados y discusión

3.1. Interacción del fitato con los iones alcalinos

La tabla 5.1 resume los valores de constantes de formación de los complejos del InsP_6 con iones alcalinos y alcalinotérreos. Este conjunto de datos termodinámicos corresponden a los mejores resultados (menores valores de σ) obtenidos del ajuste del comportamiento químico en solución del ligando en presencia de los iones correspondientes, por lo que deben ser tomados como los mejores modelos de especies en las condiciones de medida. Para los iones alcalinos, los complejos detectados son todos polinucleares, de fórmula general $[M_i(H_jL)]^{(12-i-j)-}$ con *i:j* = (3:4), (4:3), (5:2) y (6:0). La presencia de otras especies mononucleares y dinucleares fue considerada en el análisis, pero su inclusión no permitió una reproducción satisfactoria de las curvas potenciométricas.

Miradas en conjunto, las constantes de estabilidad revelan que el fitato interacciona moderadamente con los iones alcalinos. Una comparación entre los valores obtenidos y los correspondientes a otros ligandos de bajo peso molecular se hace dificultosa por la diferencia existente en las estequiometrías de los complejos. La estabilidad de estas especies del InsP_6 es comparable con la de los complejos alcalinos de estequiometría 1:1 metal:ligando de un ligando quelante como el EDTA (valores medios de las constantes de estabilidad 2,85, 1,75 y 0,7 para M = Li^+, Na^+ y K^+, *T* = 25 °C e *I* = 0,10 M)[6]. Respecto de este último, el fitato posee un mayor número de especies complejas con mayor nuclearidad, agregando un factor que incrementa su capacidad secuestrante relativa.

Los valores de las constantes de formación (tabla 5.1) disminuyen continuamente con la nuclearidad de la especie: $[M_6L]^{6-}$ > $[M_5(H_2L)]^{5-}$ > $[M_4(H_3L)]^{5-}$ > $[M_3(H_4L)]^{5-}$, por lo que la capacidad secuestrante del InsP_6 se reduce a medida que se neutraliza la carga negativa del ligando por protonación. Esto está de acuerdo con una asociación de tipo

predominantemente electrostática, como cabría esperar teniendo en cuenta la alta carga del anión y los bajos potenciales iónicos (carga/radio iónico) que exhiben los iones alcalinos.

Tabla 5.1. Logaritmos de las constantes de formación de complejos del InsP_6 con los iones alcalinos y alcalinotérreos (I = 0,15 M a 37 °C)[a].

Metal	Equilibrio	log K (NMe_4Cl)[b]	σ	log K ($NaClO_4$)[b]	σ
Li(I)	$3\,Li^+ + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Li_3(H_4L)]^{5-}$	**3,3(1)**	2,0	---	---
	$4\,Li^+ + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Li_4(H_3L)]^{5-}$	**5,52(8)**		---	
	$5\,Li^+ + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Li_5(H_2L)]^{5-}$	**7,97(9)**		---	
	$6\,Li^+ + L^{12-} \leftrightarrow [Li_6L]^{6-}$	**10,2(1)**		---	
Na(I)	$3\,Na^+ + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Na_3(H_4L)]^{5-}$	**3,38(8)**	2,1	---	---
	$4\,Na^+ + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Na_4(H_3L)]^{5-}$	**5,49(7)**		---	
	$5\,Na^+ + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Na_5(H_2L)]^{5-}$	**7,60(7)**		---	
	$6\,Na^+ + L^{12-} \leftrightarrow [Na_6L]^{6-}$	**9,83(8)**		---	
K(I)	$3\,K^+ + H_4L^{8-} \leftrightarrow [K_3(H_4L)]^{5-}$	**3,36(5)**	3,0	---	---
	$4\,K^+ + H_3L^{9-} \leftrightarrow [K_4(H_3L)]^{5-}$	**5,42(5)**		---	
	$5\,K^+ + H_2L^{10-} \leftrightarrow [K_5(H_2L)]^{5-}$	**7,45(5)**		---	
	$6\,K^+ + L^{12-} \leftrightarrow [K_6L]^{6-}$	**9,70(6)**		---	
Mg(II)	$Mg^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Mg(H_2L)]^{8-}$	**6,50(8)**	0,7	10,6(1)	4,2
	$Mg^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Mg(H_3L)]^{7-}$	**5,34(6)**		10,5(1)	
	$Mg^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Mg(H_4L)]^{6-}$	**3,80(6)**		9,76(7)	
	$Mg^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Mg(H_5L)]^{5-}$	**3,24(7)**		8,76(7)	
	$Mg^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Mg(H_6L)]^{4-}$	**2,68(6)**		7,25(4)	
	$5\,Mg^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Mg_5(H_2L)]$	**21,11(5)**		28,6(2)	
Ca(II)	$Ca^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Ca(H_2L)]^{8-}$	**6,39(3)**	1,3	---	4,6
	$Ca^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Ca(H_3L)]^{7-}$	**4,86(2)**		---	
	$Ca^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Ca(H_4L)]^{6-}$	**3,14(7)**		8,3(1)	
	$Ca^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Ca(H_5L)]^{5-}$	**---**		8,4(1)	
	$Ca^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Ca(H_6L)]^{4-}$	**----**		7,4(1)	
Sr(II)	$Sr^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Sr(H_2L)]^{8-}$	**6,74(3)**	1,6	**---**	3,8
	$Sr^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Sr(H_3L)]^{7-}$	**5,10(2)**		**---**	

	$Sr^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Sr(H_5L)]^{5-}$	---		**5,50(4)**	
	$Sr^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Sr(H_6L)]^{4-}$	---		**5,26(3)**	
	$5\ Sr^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Sr_5(H_2L)]$	**21,70(4)**		**25,0(1)**	
Ba(II)	$Ba^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Ba(H_2L)]^{8-}$	**6,18(2)**	0,9	---	4,9
	$Ba^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Ba(H_3L)]^{7-}$	**5,00(2)**		---	
	$Ba^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Ba(H_6L)]^{4-}$	---		**5,32**	
	$5\ Ba^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Ba_5(H_2L)]$	**23,22(3)**		**28,2**	

[a] Se destacan en negrita los valores ajustados en este trabajo de tesis. El resto fue tomado de la referencia[7]. [b] Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa.

En la figura 5.1 se muestra, en condiciones de exceso de ion metálico ([L] = 1 mM, [M] = 150 mM), la distribución calculada de las especies químicas detectadas en los tres sistemas en estudio. Los tres cationes dan lugar a una especiación química prácticamente idéntica, debido a que el modelo de especies que presentan y los valores de constantes de equilibrio que las caracterizan son muy similares (tabla 5.1).

Los procesos de complejación se hacen evidentes a valores de pH > 5 y el ligando se encuentra completamente asociado al metal a partir de pH neutro. Aunque la estabilidad relativa de las especies es grande, el valor absoluto de las constantes ajustadas es bajo, por lo que estas especies complejas sólo tienen existencia significativa a altas concentraciones de ion metálico y relaciones metal:ligando. Este tipo de condiciones ocurren en medio fisiológico, por lo que, al igual que se discutió para otros inositol fosfatos (capítulo 2), el comportamiento bioquímico del fitato debe ser analizado en presencia de niveles fisiológicos de K^+.

Comenzando desde medio ácido y en condiciones de exceso de metal alcalino, a medida que se aumenta el pH, el ligando se deprotona sucesivamente hasta alcanzar la especie H_6L^{6-}, la que posee un protón por cada uno de los grupos fosfato de la molécula. En las condiciones de estudio, esta forma del fitato no es capaz de asociarse al metal alcalino para formar complejos estables de estequiometría definida. No obstante, la pérdida de los dos protones siguientes para dar lugar a las especies H_5L^{7-} y H_4L^{8-}, desencadena la aparición del

complejo $[M_3(H_4L)]^{5-}$, forma que llega a constituir más del 60 % del ligando total en solución en medio neutro.

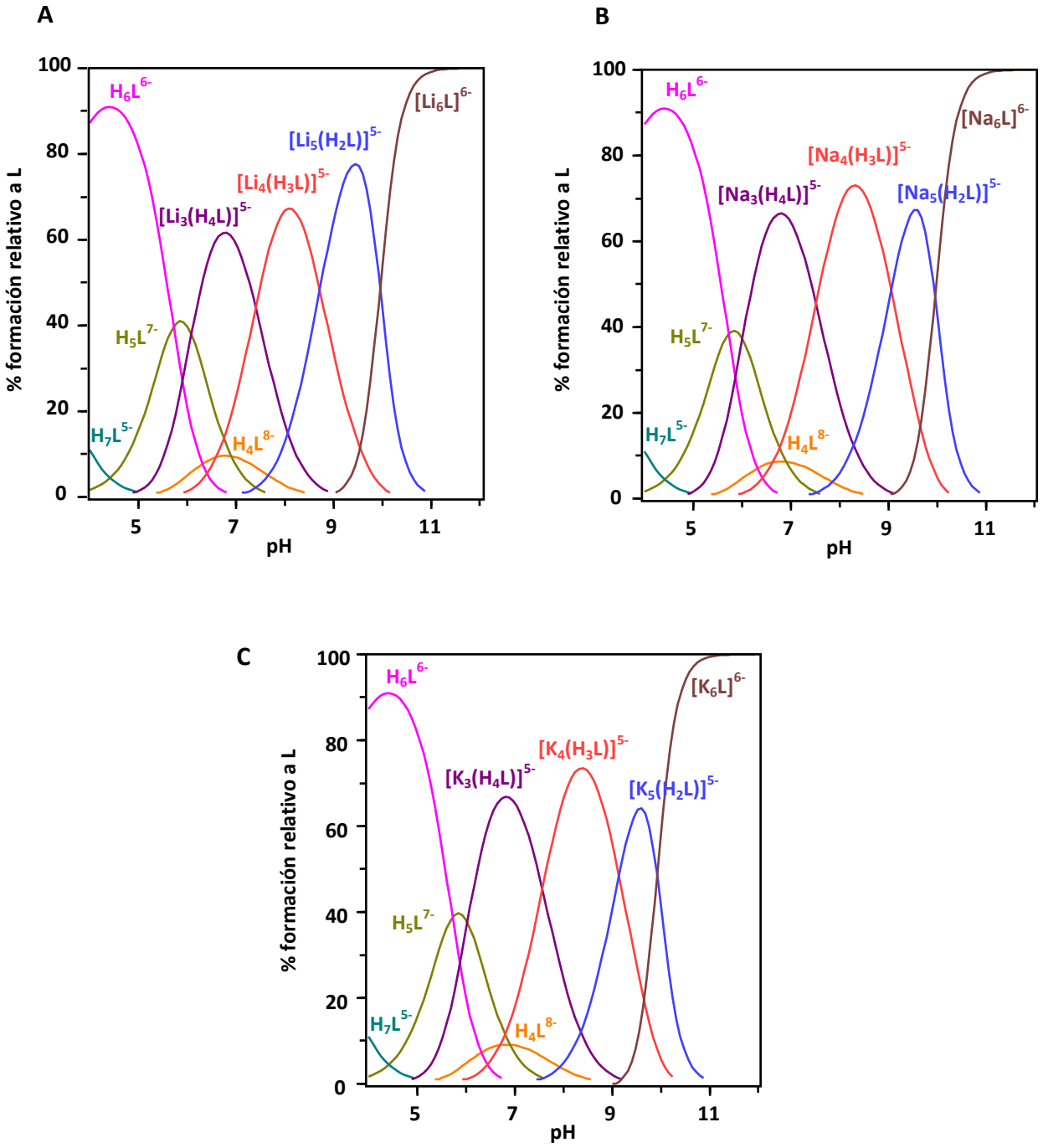


Figura 5.1. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(I), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 150 mM). M = Li^+ (A), Na^+ (B) y K^+ (C).

En apariencia, de estos hechos se desprende que es necesaria la presencia de al menos un grupo fosfato completamente deprotonado para una efectiva coordinación de los centros metálicos. A partir de aquí, un aumento subsecuente de pH provoca dos fenómenos paralelos y dependientes uno del otro: la deprotonación del complejo y la ganancia de iones M^+, en un proceso que mantiene aproximadamente constante la carga de la especie. Como será analizado en el capítulo siguiente, esta característica de la especiación química de los sistemas InsP_6-M(I) tiene origen en la secuencia de complejación y protonación que exhibe el ligando, en donde ocurre un intercambio de protones por cationes metálicos que logra optimizar los diversos factores estructurales y electrónicos asociados a la estabilidad de los complejos en solución.

En la figura 5.2 se muestra comparativamente las gráficas de las constantes de formación de la tabla 5.1 para los tres cationes considerados. La estabilidad de los complejos varía muy levemente con el radio iónico, por lo que el InsP_6 no es selectivo frente a los iones alcalinos. De acuerdo con esto, los diagramas de distribución de especies de la figura 5.1 son prácticamente indistinguibles, sobre todo en el caso del par Na^+ - K^+. Sin embargo, a medida que la carga de la especie del ligando que reacciona con el metal aumenta, los efectos electrostáticos de la interacción metal-ligando se acentúan, provocando que el litio, que es el que posee el mayor valor de potencial iónico, interactúe más fuertemente, dando lugar a un leve aumento en el valor de las constantes de estabilidad de las especies $[M_6L]^{6-}$ y $[M_5(H_2L)]^{5-}$ al pasar del K^+ al Li^+. En este sentido, si se observan los diagramas de la figura 5.1, se advierte que mientras que los iones de mayor radio, Na^+ y K^+, favorecen levemente la formación de la especie $[M_4(H_3L)]^{5-}$ frente a la $[M_5(H_2L)]^{5-}$, lo contrario ocurre con el Li^+. Por encima de pH = 10, los tres sistemas muestran la formación de la especie $[M_6L]^{6-}$. La misma parece ser particular, ya que la transformación $[M_5(H_2L)]^{5-} \rightarrow [M_6L]^{6-}$ involucra, a diferencia de lo observado para el resto de los complejos, una liberación simultánea de dos protones, provocando el aumento de una unidad en la carga total. Esto hechos encuentran explicación en los detalles moleculares de la reacción en medio acuoso, en donde, como se discute en el capítulo siguiente, la disposición de los iones metálicos sobre el ligando y la conformación del mismo son distintas a las encontradas para los complejos $[M_5(H_2L)]^{5-}$, $[M_4(H_3L)]^{5-}$ y $[M_3(H_4L)]^{5-}$.

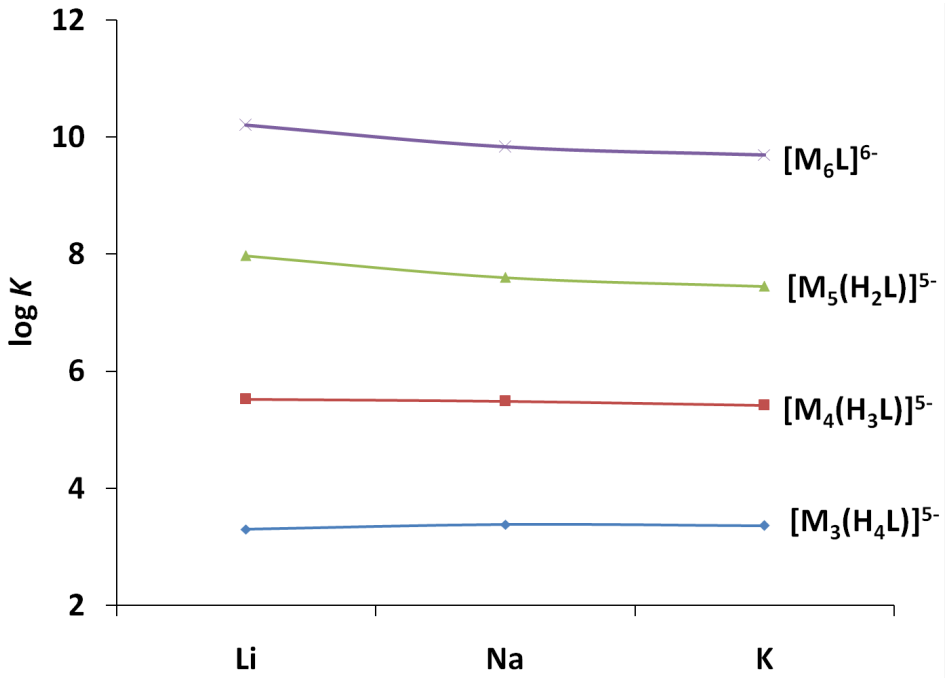


Figura 5.2. Valores de logaritmo de las constantes de formación para las especies complejas del fitato con iones M^+, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C. Los valores correspondientes fueron extraídos de la tabla 5.1.

3.2. Interacción del fitato con los iones alcalinotérreos

La tabla 5.1 muestra los valores ajustados de constantes de estabilidad para los complejos formados entre el fitato y los cationes alcalinotérreos. A diferencia de lo observado con los metales alcalinos, la estequiometría de la mayoría de los compuestos es del tipo 1:1 metal:ligando, de fórmula general $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $2 \leq j \leq 6$ para Mg(II), $2 \leq j \leq 4$ para Ca(II) y $j = 2, 3$ para Sr(II) y Ba(II), mientras que se detecta una especie neutra pentametálica ($[M_5(H_2L)]$) para todos los sistemas excepto el de calcio. La estabilidad de los complejos 1:1 es mayor a la encontrada para los sistemas InsP_6-iones alcalinos. No obstante, poseen constantes de equilibrio más pequeñas que las correspondientes a especies 1:1 M(II)-EDTA (log K = 10,54 y 9,01 para Ca^{2+} y Mg^{2+}, T = 37 °C e I = 0,15 M)[8]. Es razonable en estos sistemas una interpretación del enlace metal-fitato a partir de un modelo predominantemente electrostático, donde la afinidad del ligando por los cationes sea dictada en gran proporción por la carga de la especie que reacciona.

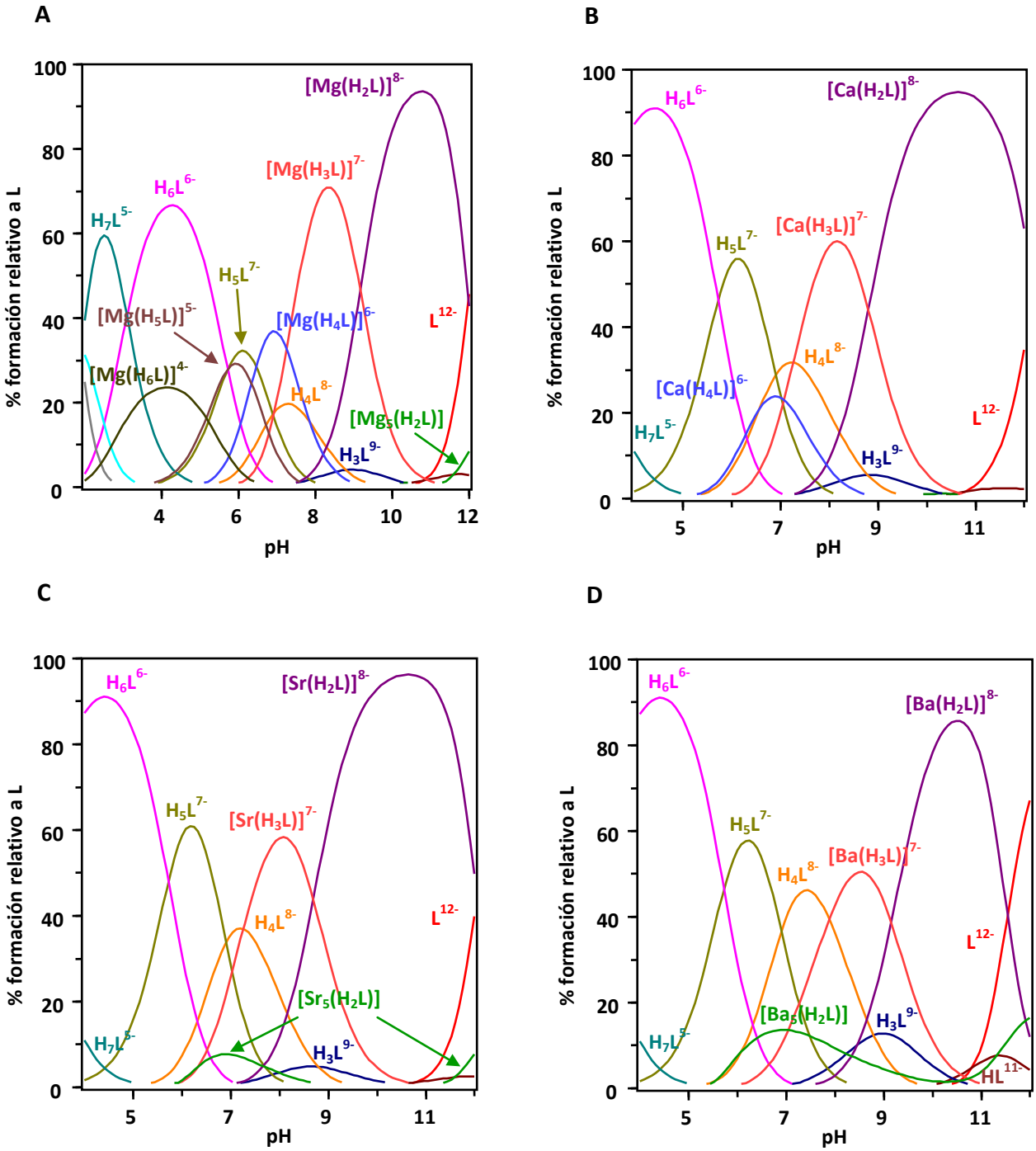


Figura 5.3. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(II), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 1 mM). M = Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Sr^{2+} (C) y Ba^{2+} (D).

Un análisis comparativo de la química de estos sistemas en base a los valores de las constantes de estabilidad es una tarea muy compleja, debido a que los modelos de especies difieren de un metal a otro. De forma de asistir al análisis, en la figura 5.3 se exponen los diagramas de distribución de especies correspondientes, construidos para una concentración de metal y ligando de 1

mM. En términos generales, al igual que ocurría con los iones alcalinos, la protonación del ligando provoca una disminución en los valores de log *K* (ver tabla 5.1), lo que enfatiza la competencia de los iones H^+ por los grupos ionizables del ligando. Para los cationes monovalentes, este fenómeno no afectaba demasiado la predominancia de los complejos, debido al intercambio metal - protón que modificaba de forma sucesiva la relación estequiométrica M(I)/ligando. En presencia de iones alcalinotérreos, sin embargo, dado que la mayoría de las especies detectadas poseen la misma estequiometría (1:1), esto redunda en una disminución progresiva de la estabilidad relativa de las mismas, limitando la capacidad del fitato frente a los procesos de complejación a medida que disminuye el pH.

Las diferencias observadas en el conjunto de especies detectado en cada caso, se hacen evidentes al revisar de forma colectiva los diagramas de la figura 5.3. Para el ion Mg^{2+} se detecta la asociación con el ligando a partir de pH = 2 y hasta pH = 12. En contraposición, los iones Ca^{2+}, Sr^{2+} y Ba^{2+} sólo consiguen unirse al fitato a valores de pH por encima de 5 - 6. Esto es debido, probablemente, al menor radio del ion magnesio, que le permite competir más efectivamente con los protones por los sitios de coordinación. Según la figura 5.3, para condiciones equimolares de InsP_6 y metal, los iones magnesio, estroncio y bario dan lugar a las especies neutras $[Mg_5(H_2L)]$, $[Sr_5(H_2L)]$ y $[Ba_5(H_2L)]$, cuya predominancia se restringe a valores de pH por encima de 7. Debido a que por cada mol de fitato, estos complejos contienen 5 moles de catión M^{2+}, la predominancia de los mismos tiene una significación no menor en la alta eficiencia que exhibe este inositol fosfato frente a la captación metálica en medio neutro-básico.

El modelo ajustado de especies químicas no muestra complejos de estequiometría intermedia entre aquellos 1:1 y 5:1 metal:ligando mencionados. Aunque se ensayó su inclusión, el ajuste del comportamiento ácido base y de complejación del InsP_6 no evidencia la formación de especies de nuclearidad intermedia. Compuestos con relación 2:1, 3:1 y 4:1 metal:ligando, si existen, deben encontrarse por debajo del límite de detección de la técnica potenciométrica. En este marco, químicamente el sistema está dominado por dos procesos de complejación, cuya extensión es dependiente de la relación M/L. En la figura 5.4 se muestran los diagramas de especiación

obtenidos a pH = 7, para una concentración de ligando de 1 mM y cantidades variables de magnesio o calcio. En primer lugar, para relaciones molares M/L cercanas a la unidad, la formación de complejos 1:1 se ve termodinámicamente favorecida. En estos procesos, los aniones $H_iL^{(12-i)-}$ unen un ion metálico, formando especies $[M(H_iL)]^{(12-2-i)-}$ cuyo grado de protonación depende de la concentración hidrogeniónica. En particular para ellas, a diferencia de los que se observa en presencia de iones monovalentes, un cambio en el pH no provoca una alteración en las relaciones estequiométricas metal a ligando de los complejos.

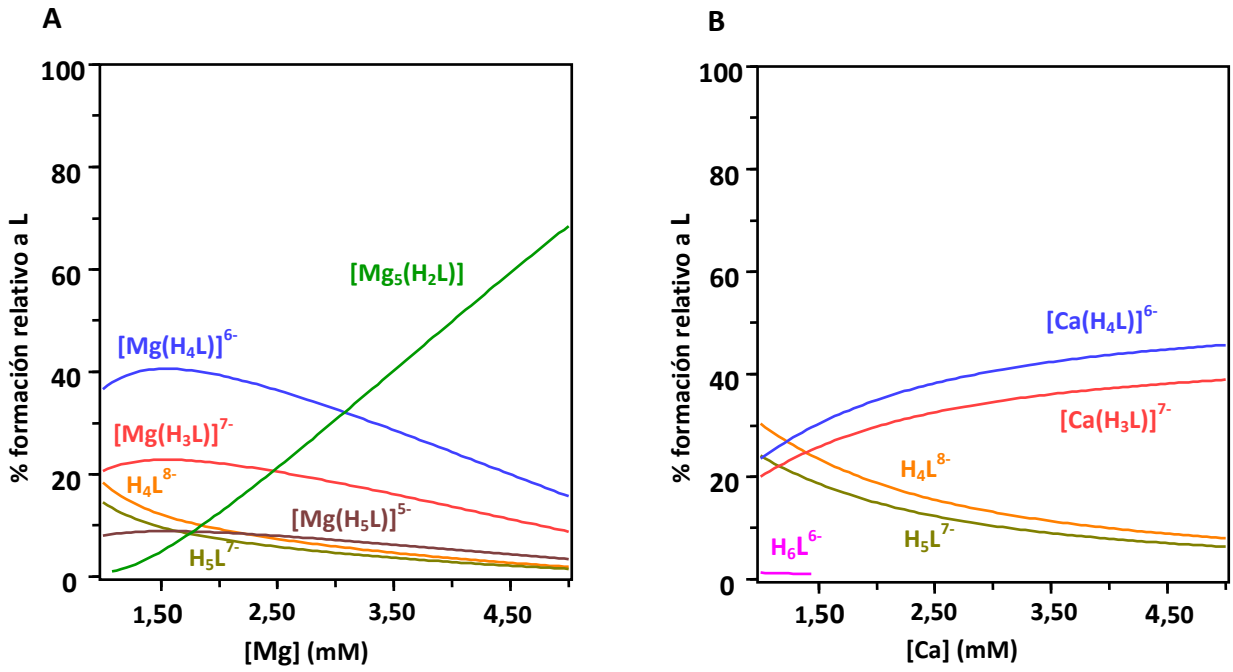


Figura 5.4. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(II), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, pH = 7). M = Mg^{2+} (A) y Ca^{2+} (B).

A medida que aumenta la concentración de ion metálico respecto de la de ligando, la distribución de especies en el sistema permanece relativamente constante para el calcio, en donde los complejos $[Ca(H_4L)]^{6-}$ y $[Ca(H_3L)]^{7-}$ se vuelven progresivamente más abundantes. Sin embargo, para el magnesio (y también para el estroncio y el bario) los complejos 1:1 comienzan a perder predominancia en función de la aparición del complejo neutro de estequiometría 5:1 metal:ligando. Es probable que esta etapa, la cual se ve favorecida en presencia de exceso de ion metálico, se corresponda con un

proceso independiente de coordinación, en donde la unión de un segundo catión M^{2+} gatille un cambio estructural que provoque la unión consecuente de otros tres.

Finalmente, un aumento ulterior en la concentración de metal provoca la aparición de fases sólidas, las cuales son, como se adelantaba en el capítulo 2, amorfas y muy poco solubles. La ocurrencia de las mismas es ubicua en todos los sistemas InsP_6-M(II)/M(III) analizados; esto constituye un impedimento al estudio en solución de los complejos neutros solubles, ya que la predominancia de los mismos se incrementa con un aumento de la relación metal:ligando, formándose usualmente en un rango estrecho de condiciones experimentales, entre las especies 1:1 y las fases sólidas correspondientes.

3.3. Interacción del fitato con iones de transición +2

Los resultados del estudio del comportamiento químico del fitato frente a iones M^{2+} de transición *d*, en condiciones fisiológicas simuladas y en un medio no interactuante, se detallan en la tabla 5.2. De acuerdo con lo discutido en la sección anterior, se detecta la formación de dos tipos de especies claramente diferenciadas: complejos de estequiometría 1:1 metal:ligando en distinto grado de protonación $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ para todos los sistemas y una especie pentanuclear $[M_5(H_2L)]$ para aquellos conteniendo Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} y Cd^{2+}. La estabilidad de los complejos 1:1 es significativamente menor que para aquellos obtenidos en presencia de EDTA (por ejemplo, para el complejo Ni^{2+}-EDTA, log K = 18,60, para T = 25 °C e I = 1,50 M)[9].

Tabla 5.2. Logaritmo de las constantes de formación de complejos del InsP_6 con iones de transición +2 (I = 0,15 M a 37 °C)[a].

Metal	Equilibrio	log K (NMe_4Cl)[b]	σ	log K ($NaClO_4$)[b]	σ
Mn(II)	$Mn^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Mn(HL)]^{9-}$	**8,9(1)**	0,74	---	4,2
	$Mn^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Mn(H_2L)]^{8-}$	**8,44(6)**		10,6(1)	
	$Mn^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Mn(H_3L)]^{7-}$	**4,99(8)**		10,5(1)	
	$Mn^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Mn(H_4L)]^{6-}$	**3,35(6)**		9,76(7)	
	$Mn^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Mn(H_5L)]^{5-}$	**---**		8,76(7)	
	$Mn^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Mn(H_6L)]^{4-}$	**---**		7,25(4)	

Fe(II)	$Fe^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{9-}$	**9,89(4)**	0,55	---	2,1
	$Fe^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Fe(H_2L)]^{8-}$	**8,27(2)**		11,44(8)	
	$Fe^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Fe(H_3L)]^{7-}$	**5,73(1)**		10,52(6)	
	$Fe^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Fe(H_4L)]^{6-}$	---		8,99(6)	
	$Fe^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Fe(H_5L)]^{5-}$	---		7,71(6)	
	$Fe^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Fe(H_6L)]^{4-}$	---		5,95(5)	
	$5\ Fe^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Fe_5(H_2L)]$	**26,17(5)**		---	
Co(II)	$Co^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Co(HL)]^{9-}$	**9,93(9)**	0,76	---	3,0
	$Co^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Co(H_2L)]^{8-}$	**8,68(6)**		9,7(1)	
	$Co^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Co(H_3L)]^{7-}$	**4,97(1)**		9,1(1)	
	$Co^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Co(H_4L)]^{6-}$	**3,39(7)**		7,90(8)	
	$Co^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Co(H_5L)]^{5-}$	---		6,96(9)	
	$Co^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Co(H_6L)]^{4-}$	---		6,26(7)	
	$Co^{2+} + H_7L^{5-} \leftrightarrow [Co(H_7L)]^{3-}$	---		4,0(1)	
Ni(II)	$Ni^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Ni(HL)]^{9-}$	**10,05(8)**	0,63	---	4,4
	$Ni^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Ni(H_2L)]^{8-}$	**8,56(5)**		---	
	$Ni^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Ni(H_3L)]^{7-}$	**4,99(8)**		---	
	$Ni^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Ni(H_4L)]^{6-}$	**3,30(6)**		8,78(5)	
	$Ni^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Ni(H_5L)]^{5-}$	---		8,44(4)	
	$Ni^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Ni(H_6L)]^{4-}$	---		7,20(3)	
Cu(II)	$Cu^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Cu(H_2L)]^{8-}$	**8,89(4)**	0,34	---	2,8
	$Cu^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Cu(H_3L)]^{7-}$	**6,47(2)**		13,5(1)	
	$Cu^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Cu(H_4L)]^{6-}$	**4,08(1)**		12,15	
	$Cu^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Cu(H_5L)]^{5-}$	---		9,07(7)	
	$Cu^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Cu(H_6L)]^{4-}$	---		5,73(7)	
	$5\ Cu^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Cu_5(H_2L)]$	**29,07(5)**		---	
Zn(II)	$Zn^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Zn(H_2L)]^{8-}$	**9,31(4)**	0,42	---	0,7
	$Zn^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Zn(H_3L)]^{7-}$	**6,67(3)**		11,3(1)	
	$Zn^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Zn(H_4L)]^{6-}$	**4,77(4)**		10,3(1)	
	$Zn^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Zn(H_5L)]^{5-}$	---		8,54(9)	
	$Zn^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Zn(H_6L)]^{4-}$	---		6,94(7)	
	$5\ Zn^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Zn_5(H_2L)]$	**29,71(7)**		---	
Cd(II)	$Cd^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Cd(HL)]^{9-}$	**11,97(4)**	0,97	---	1,6
	$Cd^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Cd(H_2L)]^{8-}$	**8,54(8)**		9,5(1)	
	$Cd^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Cd(H_3L)]^{7-}$	**5,87(3)**		9,7(1)	
	$Cd^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Cd(H_4L)]^{6-}$	---		8,76(7)	
	$Cd^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Cd(H_5L)]^{5-}$	---		7,53(7)	

	$Cd^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Cd(H_6L)]^{4-}$	---		6,92(5)	
	$5\ Cd^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Cd_5(H_2L)]$	**24,8(1)**		---	

[a] Se destacan en negrita los valores ajustados en este trabajo de tesis. El resto fue tomado de la referencia[7]. [b] Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa.

Una inspección general de la tabla 5.2 advierte la presencia de tres modelos de especies diferentes, dando lugar a tres grupos de iones metálicos con patrones de reactividad química similar frente al fitato. Por una parte se encuentran los iones Mn^{2+}, Co^{2+} y Ni^{2+}, cuyas especies son todas de estequiometría 1:1 con fórmula general $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $1 \leq j \leq 4$. En la figura 5.5A se muestra el diagrama de distribución de especies para el fitato en presencia de uno de los miembros de este grupo, el Mn, para concentraciones equimolares de metal y ligando. Los procesos de complejación son significativos a partir de pH = 5, aunque el ligando sólo se ve involucrado de forma importante en la formación de complejos a valores de pH por encima de 7,5. Los complejos $[Mn(HL)]^{9-}$ y $[Mn(H_2L)]^{8-}$ son sustancialmente más estables que el resto, y dominan gran parte de la distribución de especies en estas condiciones. Al igual que ocurría para los iones alcalinotérreos, la pérdida de más de 6 protones desencadena el proceso de complejación, mientras que los iones H^+ compiten con el metal de forma importante hasta medio neutro.

El siguiente grupo lo componen el Cu^{2+} y el Zn^{2+}. En este caso se detecta la formación de las mismas especies 1:1, excepto el complejo $[M(HL)]^{9-}$, que no posee una predominancia lo suficientemente importante como para ser ajustado en las condiciones de medida. Asimismo, se forma en este tipo de sistemas el complejo pentametálico neutro, cuya estabilidad es levemente mayor para el ion cinc. En la figura 5.5B se muestra la distribución de especies típica para este grupo, ejemplificada por el sistema InsP_6-Zn(II), para concentraciones 1 mM de ligando y metal. El esquema general es similar al discutido para el grupo anterior (figura 5.5A), aunque surgen algunas diferencias asociadas al cambio en el modelo de especies. Los procesos de complejación se activan a pH = 4, por formación de la especie $[M_5(H_2L)]$, en un medio donde la forma H_2L^{10-} no existiría en ausencia de M(II). Esto enfatiza la capacidad del metal para competir con el protón por los sitios de coordinación sobre el ligando, desplazándolos del mismo y logrando la estabilización del

complejo polinuclear en medio ácido, donde la especie predominante del fitato es H_6L^{6-}. En segundo término, la no detección del complejo 1:1 monoprotonado provoca el aumento en el rango de predominancia de la especie $[M(H_2L)]^{8-}$, la cual se extiende ahora hasta valores de pH por encima de 10.

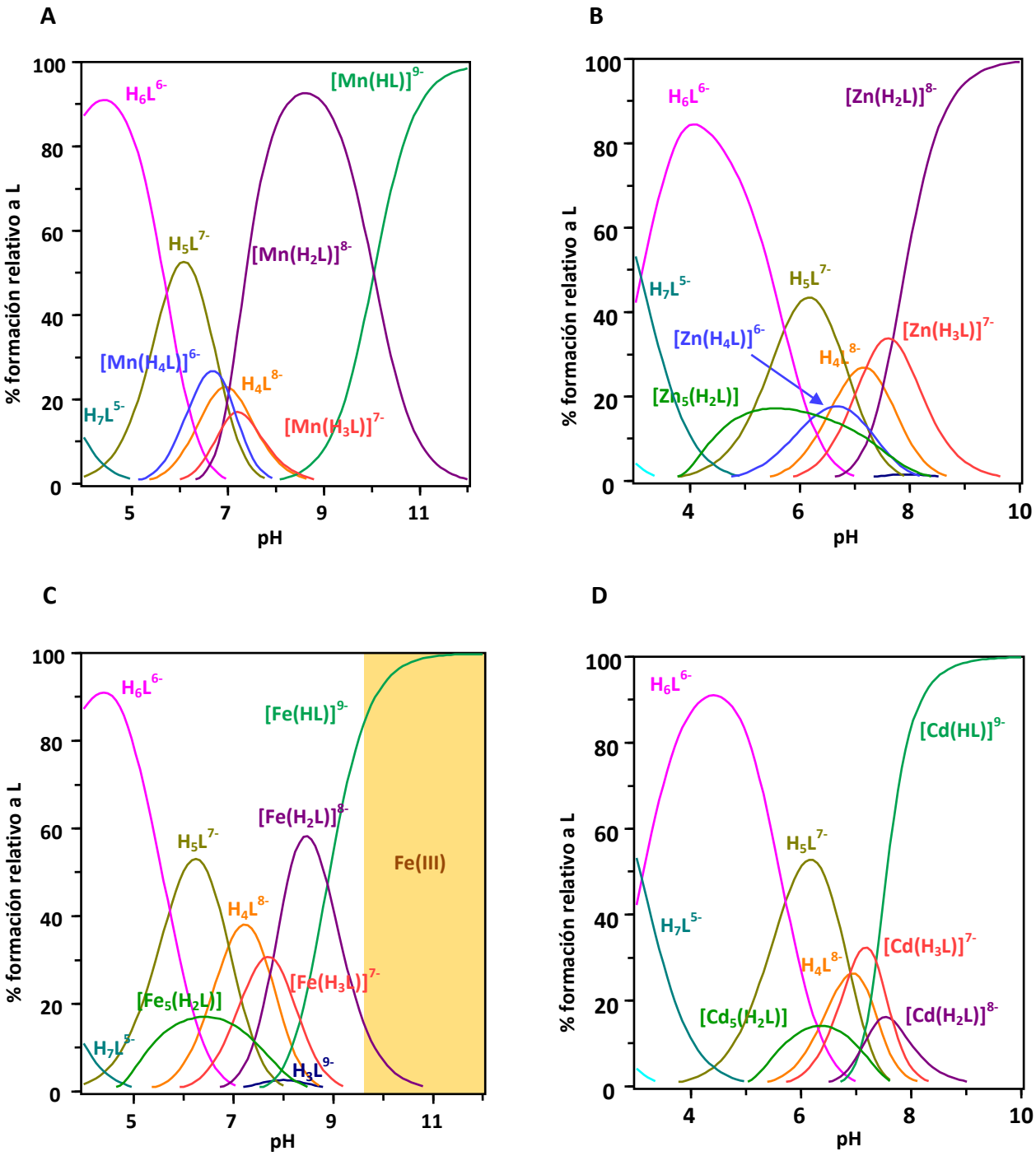


Figura 5.5. Diagramas de distribución de especies para alguno de los sistemas InsP_6-iones +2 de transición, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 1 mM). M = Mn^{2+} (A), Zn^{2+} (B), Fe^{2+} (C) y Cd^{2+} (D). En (C) se resalta la zona en donde ocurre la oxidación del ion Fe(II).

Por último, el tercer grupo está constituido por los iones Fe^{2+} y Cd^{2+}, los cuales comparten la formación de los complejos 1:1 $[M(HL)]^{9-}$, $[M(H_2L)]^{8-}$ y $[M(H_3L)]^{7-}$, así como también el complejo pentanuclear neutro $[M_5(H_2L)]$. Los diagramas de distribución de especies para ambos metales en las condiciones citadas anteriormente se muestran en las figuras 5.5C y D. En el caso del ion Fe(II), las corridas potenciométricas fueron conducidas hasta la oxidación del ion metálico, evidenciada por el desarrollo de una coloración amarilla intensa en la solución. En este sentido, se resalta en el diagrama correspondiente la zona de aparición del ion Fe(III), el cual será considerado en el análisis más adelante en este mismo capítulo.

Los procesos de complejación comienzan aquí a pH = 5, al igual que ocurría para los iones del primer grupo. Sin embargo, la presencia de la especie pentanuclear provoca un aumento significativo en la capacidad secuestrante del InsP_6, ya que se unen cinco cationes Cd^{2+} o Fe^{2+} por cada mol de ligando, frente a sólo uno en el caso del Mn^{2+}, Co^{2+} y Ni^{2+}. Por otra parte, en comparación con los dos grupos anteriores la especie $[M(H_2L)]^{8-}$ presenta una menor estabilidad relativa, uniendo parte del ion metálico total, el cual se encuentra involucrado también en los complejos $[M_5(H_2L)]$, $[Fe(H_3L)]^{7-}$ y $[M(HL)]^{9-}$. En el caso del Cd^{2+}, esta última es particularmente estable, constituyendo prácticamente el 100 % del ligando a partir de pH = 9.

3.4. Comportamiento general del InsP_6 en presencia de iones M^{2+}

3.4.1. Generalidades

Un análisis en conjunto de los modelos de especies ajustados para los iones +2 revela la complejidad de la interacción ligando-metal. No existen tendencias totalmente claras, y el fitato parece "distinguir" a los cationes de estos grupos por su potencial iónico y sus características electrónicas. En la figura 5.6 se detalla la variación de las constantes de estabilidad para los complejos $[M(H_2L)]^{8-}$ y $[M(H_3L)]^{7-}$ (que aparecen en todos los sistemas fitato-M(II) estudiados), y para la especie neutra polimetálica en función del ion +2 correspondiente. La estabilidad de los complejos derivados de la especie H_2L^{10-}, $[M(H_2L)]^{8-}$ y $[M_5(H_2L)]$, aumenta apreciablemente al pasar de los metales alcalinotérreos a los de transición *d*. En este caso, dado que el radio de ion Mg^{2+} es incluso menor que el de los iones Cu^{2+} y Zn^{2+} (tabla 5.3), este fenómeno

no es atribuible simplemente a la variación del potencial iónico del centro metálico. Se deduce, por tanto, que las características propias de la densidad electrónica de la subcapa *d* generan un aumento de la interacción fitato-ion metálico. Esto provoca que los iones de transición sean capaces de competir con los protones más efectivamente por los grupos ionizables, formando complejos con especies del ligando en menor estado de protonación respecto a los detectados para los iones alcalinotérreos. Así, la especie $[M(HL)]^{9-}$ es privativa de los iones 3*d* y el Cd(II), mientras que las especies $[M(H_5L)]^{5-}$ y $[M(H_6L)]^{4-}$ sólo se observan para el magnesio. Por otra parte, la tendencia general parece marcar que dentro de los iones del bloque d, aquellos con menor radio iónico favorecen la formación de especies del tipo $[M(HL)]^{9-}$, $[M(H_2L)]^{8-}$ y $[M(H_3L)]^{7-}$, mientras que los de mayor tamaño, como el Cu^{2+} y el Zn^{2+}, intercambian el primero por la especie $[M_5(H_2L)]$, provocando una ampliación hacia medio ácido del rango de pH donde el ligando es activo frente a la complejación del metal.

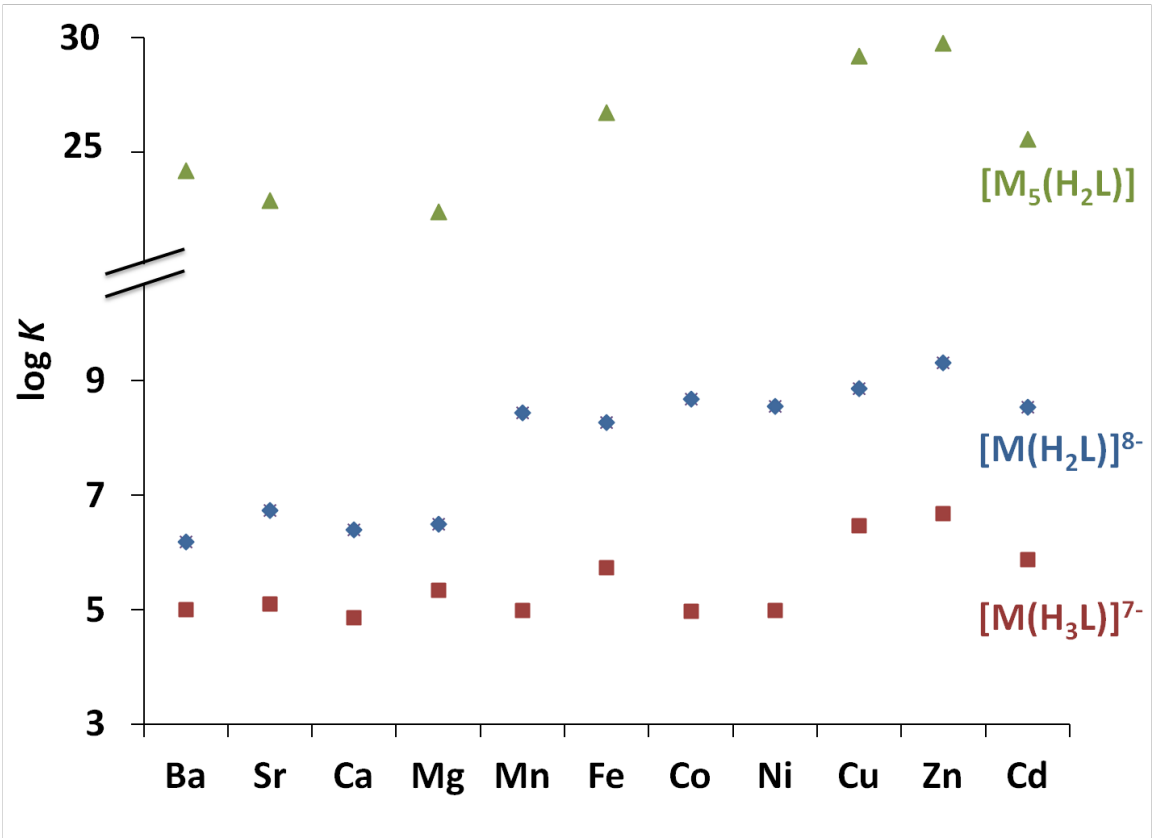


Figura 5.6. Valores de logaritmo de las constantes de formación para algunas de las especies complejas del fitato con iones M^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C. Los valores correspondientes fueron extraídos de las tablas 5.1 y 5.2.

Si se observan las curvas de la figura 5.6, la desaparición de la especie neutra $[M_5(H_2L)]$ afecta los sistemas conteniendo Co(II), Ni(II) y Mn(II), respecto del comportamiento observado para Cu(II) y Zn(II). En este caso, la especie $[M(H_3L)]^{7-}$ se ve desfavorecida, en parte debido a que H_2L^{10-} se encuentra ahora involucrada únicamente en la formación de la especie $[M(H_2L)]^{8-}$ (ver figura 5.5A). Cuando se considera la presencia de Fe(II), el complejo pentametálico vuelve a aparecer en solución, provocando una disminución en la predominancia del complejo $[M(H_2L)]^{8-}$ y un aumento consecuente en la predominancia de $[M(H_3L)]^{7-}$ (ver figura 5.5C).

Tabla 5.3. Radios iónicos cristalinos de algunos iones +2 para un índice de coordinación 6 [10].

	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}
Radio iónico (Å)	0,86	1,14	1,32	1,49	0,81	0,75	0,79	0,83	0,87	0,88	1,09

En la familia alcalinotérrea el análisis general no es sencillo, ya que de los cuatro miembros estudiados, sólo dos de ellos comparten el mismo modelo de especies: Sr^{2+} y Ba^{2+}. No obstante, si se comparan sus constantes de estabilidad, una disminución en el radio del ion parece desfavorecer la formación del complejo polimetálico en beneficio de los complejos 1:1.

3.4.2. Complejos 1:1 de iones alcalinotérreos y 3*d*

Si se revisa en detalle la información contenida en la tabla 5.3, surgen algunas relaciones que permiten racionalizar los factores que modulan las estabilidades relativas de los complejos de los iones incluidos en el estudio. Parecen existir dos determinantes. En primer lugar el potencial iónico, cuyo aumento favorece la capacidad del catión de competir efectivamente con los protones por los sitios de coordinación. Segundo, la presencia de electrones en la subcapa d, que motiva el establecimiento de fuertes enlaces metal-InsP_6, lo que a su vez se relaciona con la habilidad del catión de desplazar a los protones del ligando (aumento de la acidez de las especies complejas).

En atención a lo anterior, dentro de los iones alcalinotérreos, aquellos de gran tamaño como Sr^{2+} y Ba^{2+} no poseen el suficiente potencial iónico para dar lugar

a especies estables del tipo $[M(H_4L)]^{6-}$ o más protonadas. Con el calcio pasa algo similar, sólo que al tener menor radio iónico respecto a estos dos anteriores logra estabilizar el complejo tetraprotonado, aunque con una predominancia bastante menor (ver figura 5.3). Finalmente se encuentra el ion Mg^{2+}. Este catión conjuga dos características que amplían la avidez que el ligando exhibe en su presencia. En primer término, al no poseer electrones d la capacidad de desplazamiento de protones es bastante limitada, por lo que su unión es compatible con la formación de especies $[M(H_5L)]^{5-}$ y $[M(H_6L)]^{4-}$, altamente protonadas. Segundo, su potencial iónico es sensiblemente mayor dentro de los iones alcalinotérreos, por lo que retiene la capacidad de competir con los protones por los grupos ionizables incluso a bajos valores de pH, donde las formas H_5L^{5-} y H_6L^{6-} son predominantes. Estas características exclusivas del magnesio aumentan considerablemente el número de especies complejas que se detectan en solución, lo que trae consecuencias no sólo en la eficiencia de complejación del fitato (ver más adelante), sino que además contribuye, como se discutió en el capítulo 2, a que el InsP_6 se encuentre totalmente asociado al mismo en condiciones fisiológicas, donde la concentración de ion Mg^{2+} libre es apreciable[7,11].

La presencia de electrones 3*d* en el nivel de valencia de los iones provoca un cambio en la naturaleza de la interacción ligando-metal. Los miembros de esta serie son capaces de establecer fuertes enlaces con el fitato, que provocan la formación de especies con el ligando en un grado deprotonación significativo. De esta manera, la especie $[M(HL)]^{9-}$ es detectada, en las condiciones de medida, en los sistemas InsP_6-Mn(II)/Fe(II)/Co(II)/Ni(II). Estos iones son, de acuerdo con los datos presentados en la tabla 5.3, aquellos que presentan los menores radios iónicos, por lo que dentro de la serie 3*d* poseen los potenciales iónicos más altos. Por el contrario, especies como $[M(H_5L)]^{5-}$ y $[M(H_6L)]^{4-}$ no se detectan en este caso, debido a que la polarización de la carga negativa que los cationes M^{2+} producen sobre el ligando aumenta significativamente su acidez.

3.4.3. Complejos 5:1 con los iones alcalinotérreos y 3*d*

La misma estrategia de análisis aplicada a las especies 5:1 da como hipótesis la presencia de los mismos dos factores determinantes en la modulación de las estabilidades relativas. Sin embargo, éstos accionan en conjunto de manera

ligeramente diferente. La tendencia general marca que un aumento en el radio del catión (disminución del potencial iónico) favorece la formación de los complejos polinucleares. Por el contrario, a medida que se reduce el tamaño del centro metálico (aumento del potencial iónico) y con la presencia de electrones *d*, aumenta la fuerza del enlace metal-ligando, haciendo que se favorezca la formación de especies 1:1. Este patrón, ligeramente distinto del revisado para las especies 1:1, evidencia un aspecto que no aparecía en el análisis de estos últimos. Existen, probablemente, ciertos requerimientos espaciales necesarios para la formación de la especie 5:1. El ligando debe acomodar cinco iones metálicos en el espacio de forma de maximizar la atracción y minimizar la repulsión entre los grupos de la misma carga. En este contexto, el aumento del tamaño del catión podría jugar un papel importante en el establecimiento efectivo de múltiples enlaces metal-grupos donores.

De esta forma, dentro del grupo de los metales alcalinotérreos, la estabilidad del complejo $[M_5(H_2L)]$ disminuye con el radio iónico, de bario a estroncio. El calcio no posee, aparentemente, el potencial y radio iónicos lo suficientemente grandes como para justificar la compartición del ligando con otros cuatro iones Ca^{2+}. El magnesio, por su parte, es tan pequeño como algunos de los iones de transición revisados, por lo que da lugar a complejos 1:1 cuya predominancia es máxima para concentraciones equimolares de ligando y metal (figura 5.3). La especie pentanuclear, aunque es detectada en estas condiciones, es sensiblemente menos estable que aquellas descritas para Ba(II) y Sr(II) (ver figura 5.6 y tabla 5.3).

Considerando la serie 3*d*, la especie 5:1 se hace presente en niveles detectables para los iones de mayor radio, como Cu(II) y Zn(II). A medida que el mismo disminuye, el aumento consecuente en el potencial iónico genera la estabilización de estequiometrías del tipo 1:1. El ion Fe^{2+}, con su pequeño tamaño, se escapa de la tendencia observada. Este catión es capaz no sólo de retener el complejo monoprotonado, sino además de formar el complejo $[M_5(H_2L)]$. Este último es, sin embargo, bastante menos estable que los análogos de Cu y Zn (tabla 5.2).

3.4.4. Complejos del cadmio

Finalmente, ha quedado fuera del análisis precedente el ion cadmio. Para este metal, la densidad electrónica de su ion +2 incluye 10 electrones en el subnivel 4*d*. Estos orbitales son más difusos que los correspondientes 3*d*, por lo que los efectos derivados sobre la naturaleza de la interacción con el ligando son relativamente diferentes a los discutidos hasta aquí. Este ion, aunque de mayor tamaño que los cationes 3*d* considerados (tabla 5.3), da lugar a un complejo polinuclear de estabilidad moderada, cercana a la correspondiente al análogo de Fe(II). Su densidad electrónica *d* le brinda una importante capacidad para desplazar buena parte de los protones del ligando, por lo que forma la especie $[M(HL)]^{9-}$ más estable de todas las caracterizadas (tabla 5.3). La predominancia de ésta es tan alta que incluso afecta la correspondiente al resto de los complejos, incluido el pentanuclear (ver figura 5.3).

3.5. Interacción del fitato con iones +3

3.5.1. Procesos de hidrólisis metálica

Para realizar un estudio de comportamiento químico del fitato en presencia de iones metálicos M^{3+} se hace necesario un análisis previo de los procesos de hidrólisis en solución. En la tabla 5.4 se muestran los resultados del ajuste de las constantes de hidrólisis para los iones Fe^{3+} y Al^{3+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C. Para el primero de ellos se detectan dos especies catiónicas, $[Fe(OH)]^{2+}$ y $[Fe(OH)_2]^{+}$, y una neutra de estequiometría similar al hidróxido férrico $[Fe(OH)_3]$. Las tres han sido detectadas en variadas condiciones experimentales, junto con otras como $[Fe_2(OH)_2]^{4+}$ y $[Fe_2O]^{4+}$, aunque las que han sido mayormente caracterizadas en solución son las dos primeras [12,13].

Los procesos de hidrólisis del ion Fe^{3+} han sido caracterizados mayoritariamente en condiciones que simulan el ambiente marino, como lo revela la gran cantidad de bibliografía asociada[12-14,16-25]. Asimismo, algunos de estos trabajos analizan la variación de las constantes de hidrólisis y de producto de solubilidad del hidróxido férrico en función de la temperatura y la fuerza iónica del medio. Entre ellos el reporte de Liu e*t al*.[14] destaca por el planteo de ecuaciones que ajustan de forma ampliamente satisfactoria el comportamiento de las diversas especies con las condiciones experimentales. A modo de comparación, en la tabla 5.4 se aclara, además de los datos obtenidos en este trabajo, el logaritmo de las constantes de hidrólisis del ion Fe^{3+} en NaCl

calculados mediante las ecuaciones de Liu e*t al*. a I = 0,15 M y T = 37 °C, y los valores promedio de los log K obtenidos de las referencias[14,16-23], a 25 °C e I = 0,7 M.

Tabla 5.4. Logaritmo de las constantes de hidrólisis de los iones Al^{3+} y Fe^{3+} (I = 0,15 M a 37 °C)[a].

Metal	Equilibrio	log K (NMe_4Cl)[b]	σ	log K (NaCl)[c]	log K_{prom} (NaCl)[d]
Fe(III)	$Fe^{3+} + H_2O \leftrightarrow [Fe(OH)]^{2+} + H^+$	**-2,88(9)**	1,1	-2,05	-2,66
	$Fe^{3+} + 2\ H_2O \leftrightarrow [Fe(OH)_2]^{+} + 2\ H^+$	**-5,56(4)**		-6,12	-6,45
	$Fe^{3+} + 3\ H_2O \leftrightarrow [Fe(OH)_3] + 3\ H^+$	**-8,79(6)**		-13,8	-13,54
Al(III)	$Al^{3+} + H_2O \leftrightarrow [Al(OH)]^{2+} + H^+$	**-4,96(3)**	0,86	-4,67	---
	$Al^{3+} + 3\ H_2O \leftrightarrow [Al(OH)_3] + 3\ H^+$	**-14,22(4)**		-13,6	---
	$Al^{3+} + 4\ H_2O \leftrightarrow [Al(OH)_4]^{-} + 4\ H^+$	**-23,49(4)**		-24,0	---
	$2\ Al^{3+} + 7\ H_2O \leftrightarrow [Al_2(OH)_7]^{-} + 7\ H^+$	**-34,52(6)**		---	---
	$3\ Al^{3+} + 11\ H_2O \leftrightarrow [Al_3(OH)_{11}]^{2-} + 11\ H^+$	**---**		-54,7	---
	$6\ Al^{3+} + 15\ H_2O \leftrightarrow [Al_6(OH)_{15}]^{3+} + 15\ H^+$	**-50,14(2)**		-49,5	
	$8\ Al^{3+} + 22\ H_2O \leftrightarrow [Al_8(OH)_{22}]^{2+} + 22\ H^+$	**-76,8(2)**		-76,5	---

[a] Se destacan en negrita los valores ajustados en este trabajo de tesis. [b] Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa. [c] Para Fe(III), calculados de acuerdo con las ecuaciones de la referencia [14]; para Al(III), valores extraídos de [15] a I = 0,15 M y T = 37 °C. [d] Valor promedio de las constantes de hidrólisis del Fe(III) a 25 °C e I = 0,7 M, reportadas en las referencias [14,16-23].

Las constantes de estabilidad ajustadas para las especies $[Fe(OH)]^{2+}$ y $[Fe(OH)_2]^{+}$ concuerdan satisfactoriamente con los valores calculados y reportados. Como se muestra en la figura 5.7A, donde se detalla la distribución de especies en una solución 1 mM de hierro(III), estos complejos predominan en el rango de pH 2 - 3,5. A medida que disminuye la $[H^+]$, aumenta el número de iones OH^- presentes en el entorno de coordinación del centro metálico. El ion Fe^{3+}(ac) posee existencia apreciable sólo por debajo de pH = 2,5, en donde se encuentra como ion hexaacuo.

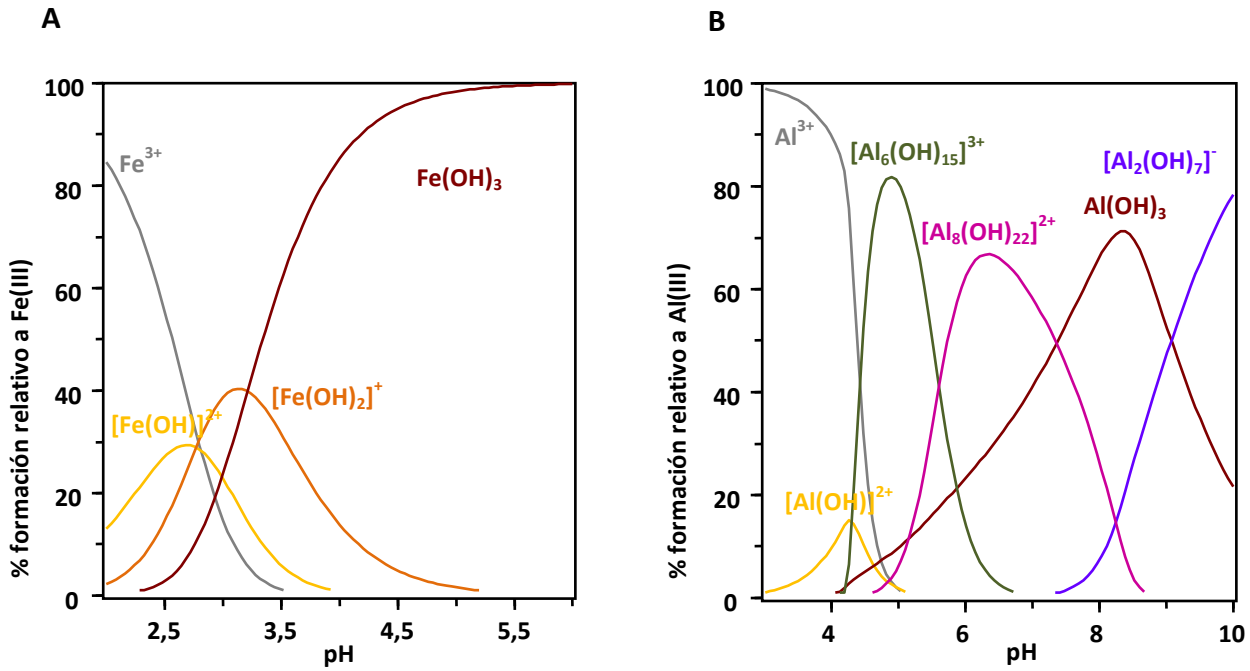


Figura 5.7. Diagramas de distribución de especies para soluciones 1 mM de los iones Fe^{3+} (A) y Al^{3+} (B), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

A partir de pH 3,5 se vuelve predominante el complejo neutro $Fe(OH)_3$, el cual constituye la única especie soluble del metal a pH > 5. No obstante, el logaritmo de su constante de formación ajustada difiere algunos órdenes de magnitud respecto del valor estimado y del promedio encontrado en la bibliografía en condiciones similares. Esto se debe, fundamentalmente, a las dificultades que encuentra el estudio en solución de esta especie. El complejo $Fe(OH)_3$ posee existencia apreciable en condiciones muy cercanas a la saturación del sistema. Por tanto, es posible que, durante las corridas potenciométricas, la formación inadvertida del sólido $Fe(OH)_3(s)$ sea parcialmente "titulada", aumentando el error en el valor ajustado de la constante de la especie soluble. R.H. Byrne *et al.*[26] han publicado un reporte en donde abordan esta problemática. Los intentos de caracterización de esta especie se han basado, mayoritariamente, en medidas de solubilidad del hidróxido férrico. Estas técnicas requieren una separación cuantitativa del sólido y su especie neutra soluble, aspecto que no siempre es fácil de satisfacer, debido al tamaño de partícula del hidróxido, que permite el filtrado parcial de la fase sólida. Asimismo, el ion Fe^{3+} y sus especies son bastante reactivas en contacto con superficies a alto pH, por lo que los fenómenos de

adsorción adicionan otro factor concomitante. Finalmente, la velocidad solubilización del $Fe(OH)_3(s)$ es dependiente del tamaño de partícula, el cual a su vez posee cierta dependencia con el pH. Al margen de estos obstáculos, la mayoría de los reportes en el tema indican un valor de log *K* para esta especie menor a -12, lo cual está en concordancia con el valor calculado por las ecuaciones de Liu e*t al*. (tabla 5.4)[14].

Los resultados para el aluminio muestran un mayor número de especies hidroxiladas. Se detectan las formas catiónicas $[Al(OH)]^{2+}$, $[Al_6(OH)_{15}]^{3+}$ y $[Al_8(OH)_{22}]^{2+}$, el complejo neutro $[Al(OH)_3]$, y los hidroxoaniones $[Al(OH)_4]^-$ y $[Al_2(OH)_7]^-$. Los valores ajustados de constantes de estabilidad están de acuerdo con los obtenidos en condiciones similares (37 °C, 0,15 M en NaCl) por Venturini *et al* [15] (ver valores en tabla 5.4). En ningún caso se detecta la especie intermedia $[Al(OH)_2]^+$, aunque el modelo de estos autores carece del complejo dinuclear $[Al_2(OH)_7]^-$, el cual se ve sustituido por la forma trinuclear $[Al_3(OH)_{11}]^{2-}$. En la figura 5.7B se muestra la distribución de las especies hidroxiladas del aluminio con el pH, para $[Al^{3+}]$ = 1 mM. En este caso, los procesos de hidrólisis son operativos a partir de pH = 4, donde luego de la formación del complejo $[Al(OH)]^{2+}$ poco predominante, el ion metálico se ve secuestrado en un 100 % dando lugar a complejos poliméricos catiónicos, los cuales se suceden con el aumento de pH en orden creciente de la relación OH/Al. Posteriormente aparece la especie neutra, la cual por encima de cierta concentración límite da lugar al sólido de la misma estequiometría $Al(OH)_3(s)$. Debido al carácter anfótero del mismo, un aumento ulterior de pH provoca la deprotonación de más moléculas de agua en el entorno de coordinación del centro metálico, generando los complejos aniónicos $[Al(OH)_4]^-$ y $[Al_2(OH)_7]^-$, cuya predominancia relativa es dependiente de la concentración de metal.

3.5.2. Comportamiento químico del InsP_6 en presencia de iones +3

Los resultados del estudio termodinámico de los sistemas InsP_6-Fe(III)/Al(III) en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C se detallan en la tabla 5.5. Se detectan en ambos casos complejos de estequiometría 1:1 metal:ligando del tipo $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $1 \le j \le 5$ para Fe^{3+} y $3 \le j \le 5$ para Al^{3+}. Como era de prever a partir del modelo de enlace predominantemente electrostático, la estabilidad de estas especies es mucho mayor que las análogas para los iones M(I) y M(II) analizados. Más

aún, el complejo $[Fe(HL)]^{8-}$ posee una constante de formación cercana a la reportada para el complejo 1:1 Fe(III)-EDTA (log K = 24,95 a 25°C, I = 0,10 M)[27]. A medida que el ligando se protona la estabilidad de las especies disminuye, en línea con la baja en la atracción electrostática M^{3+} - $H_iL^{(12-i)-}$. Se logra caracterizar en estas condiciones, asimismo, especies polinucleares neutras de estequiometría general $[M_4L]$, las cuales se detectaron mayoritariamente en las corridas potenciométricas con mayor relación metal/ligando.

Dado que, como se mencionó en la sección anterior, el valor de la constante de formación de la especie $Fe(OH)_3$ se determinó en condiciones que implican un error no menor y que su valor difiere del encontrado en bibliografía, el ajuste de las constantes de complejación del hierro(III) se realizó a partir del valor de log $K_{1\text{-}3}$ ($Fe(OH)_3$) = -8,79, ajustado en este trabajo, y log $K_{1\text{-}3}$ ($Fe(OH)_3$) = -13,8, estimado en las mismas condiciones a partir de las ecuaciones de Liu e*t al*.[14]. Los resultados son muy similares entre sí, con una variación menor a 0,2 unidades en el logaritmo de las constantes globales ajustadas. Las características químicas de este sistema presentan una sensibilidad bastante baja a la variación en la concentración de este complejo hidroxilado.

Sin embargo, cuando se desea modelar el comportamiento químico del par fitato-Fe(III) en el rango milimolar de concentraciones de ligando y metal, en especial a pH básico, esta variación en la estabilidad del complejo $Fe(OH)_3$ produce un cambio significativo en la especiación del sistema. Para resolver esta disyuntiva, se realizaron estudios de la variación con el pH del espectro UV-visible de un sistema conteniendo 1 mM de InsP_6 y 0,32 mM de Fe(III), en NMe_4Cl 0,15 M a 37 °C. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5.8A.

En términos generales, los espectros se mantienen prácticamente invariantes en el rango de pH 2,0 - 10,4. A partir de este punto las características espectrales del sistema cambian completamente. A la vez, la solución se torna amarilla y la intensidad de este color se incrementa con el agregado de base. Esto es coherente con la predominancia de productos de hidrólisis del metal, que generan un cambio sustancial en el entorno de coordinación del ion metálico[28,29]. Las especies hidroxiladas del hierro son, en su conjunto, de color amarillo intenso, debido a bandas de transferencia de carga ubicadas en la región ultravioleta, cuyos límites se extienden dentro del espectro visible. Estos compuestos absorben de forma significativa en el rango de longitudes de onda

estudiado, "cubriendo" a las especies complejas presentes. En concordancia, el perfil espectral obtenido es prácticamente igual al reportado por Stefanson[13] en condiciones de leve hidrólisis del metal.

Tabla 5.5. Logaritmo de las constantes de formación de complejos del InsP_6 con Fe^{3+} y Al^{3+} (I = 0,15 M a 37 °C)[a].

Metal	Equilibrio	log K (NMe_4Cl)[b]	σ	log K ($NaClO_4$)[b]	σ
Fe(III)	$Fe^{3+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{8-}$	**23,59(9)**	0,47	---	3,9
	$Fe^{3+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Fe(H_2L)]^{7-}$	**20,1(1)**		19,2(1)	
	$Fe^{3+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Fe(H_3L)]^{6-}$	**16,92(6)**		18,20(8)	
	$Fe^{3+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Fe(H_4L)]^{5-}$	**14,11(7)**		12,7(1)	
	$Fe^{3+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Fe(H_5L)]^{4-}$	**12,04(8)**		8,99(7)	
	$4\ Fe^{3+} + L^{12-} \leftrightarrow [Fe_4L]$	**69,9(3)**		---	
Al(III)	$Al^{3+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Al(H_2L)]^{7-}$	**---**	0,86	23,7(1)	0,9
	$Al^{3+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Al(H_3L)]^{6-}$	**11,69(4)**		20,1(1)	
	$Al^{3+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Al(H_4L)]^{5-}$	**8,8(1)**		16,4(1)	
	$Al^{3+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Al(H_5L)]^{4-}$	**7,30(3)**		12,2(1)	
	$Al^{3+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Al(H_6L)]^{3-}$	**---**		8,48(9)	
	$4\ Al^{3+} + L^{12-} \leftrightarrow [Al_4L]$	**50,1(3)**		---	

[a] Se destacan en negrita los valores ajustados en este trabajo de tesis. El resto fue tomado de la referencia[7]. [b] Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa.

En las figuras 5.8B y C se muestran los diagramas de distribución de especies calculados para las mismas condiciones empleadas en los experimentos, utilizando el valor determinado (-8,79) y estimado (-13,8) de la constante de estabilidad de la especie $Fe(OH)_3$. Para el primer caso, se predice que la especie hidroxilada comienza a predominar partir de pH = 6, y que el metal se encuentra completamente hidrolizado ya a pH = 10. Esto no concuerda con lo observado experimentalmente, en donde las soluciones no presentan características propias de la existencia de cantidades significativas de los productos de hidrólisis hasta valores de pH por lo menos tan altos como 10,4.

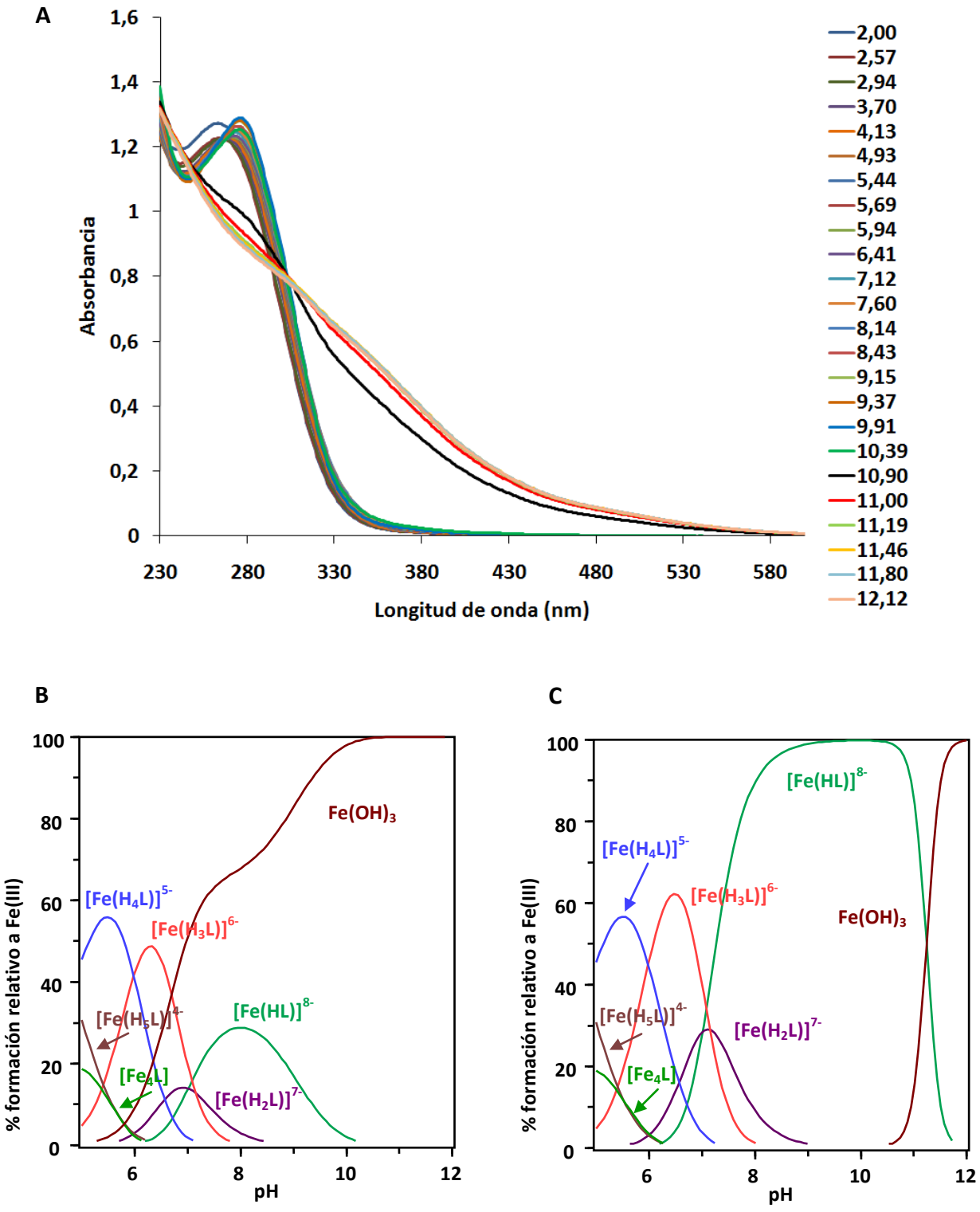


Figura 5.8. Comportamiento químico del InsP_6 en presencia de Fe^{3+} ([L] = 1,02 mM; [Fe^{3+}] = 0,32 mM), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C. En (A) se muestran los espectros UV-visible en función del pH, cuyos valores ajustados se especifican a la derecha de la figura. (B) y (C) corresponden a los diagramas de distribución de especies construidos utilizando como constante de formación de la especie $Fe(OH)_3$ los valores -8,79 y -13,8 respectivamente.

Por el contrario, haciendo uso del valor -13,8 se predice la aparición del complejo neutro hidroxilado a pH entre 10,5 y 11, en total acuerdo con los datos espectrales de la figura 5.8A. Se deduce, por tanto, que la aplicación de las constantes de complejación y formación de $[Fe(OH)]^{2+}$ y $[Fe(OH)_2]^{+}$ ajustadas en este trabajo, más la correspondiente a la especie $Fe(OH)_3$ estimada en base a las ecuaciones de Liu *et al.*[14] reproducen de manera satisfactoria el comportamiento químico del sistema Fe(III)-InsP_6 con el pH. En consecuencia y de aquí en más, en este trabajo de tesis se hará uso de este conjunto de datos termodinámicos de hidrólisis cuando se desee modelar la especiación química de los sistemas Ins$P$-Fe^{3+} en condiciones donde la hidrólisis del metal sea significativa. Sin perjuicio de lo anterior, en aquellos medios donde la concentración de hierro sea tan baja que los procesos de hidrólisis estén termodinámica y/o cinéticamente desfavorecidos, como por ejemplo en condiciones fisiológicas, se obviarán estos procesos hidrolíticos al momento del análisis del comportamiento químico del sistema.

En las figuras 5.9A y B se muestra la predominancia de las especies con el pH para soluciones equimolares de ligando y metal en presencia de Fe(III) y Al(III). El fitato logra secuestrar completamente a ambos metales desde medio muy ácido (pH ≈ 2- 3), lo cual revela la gran afinidad que posee por los iones +3.

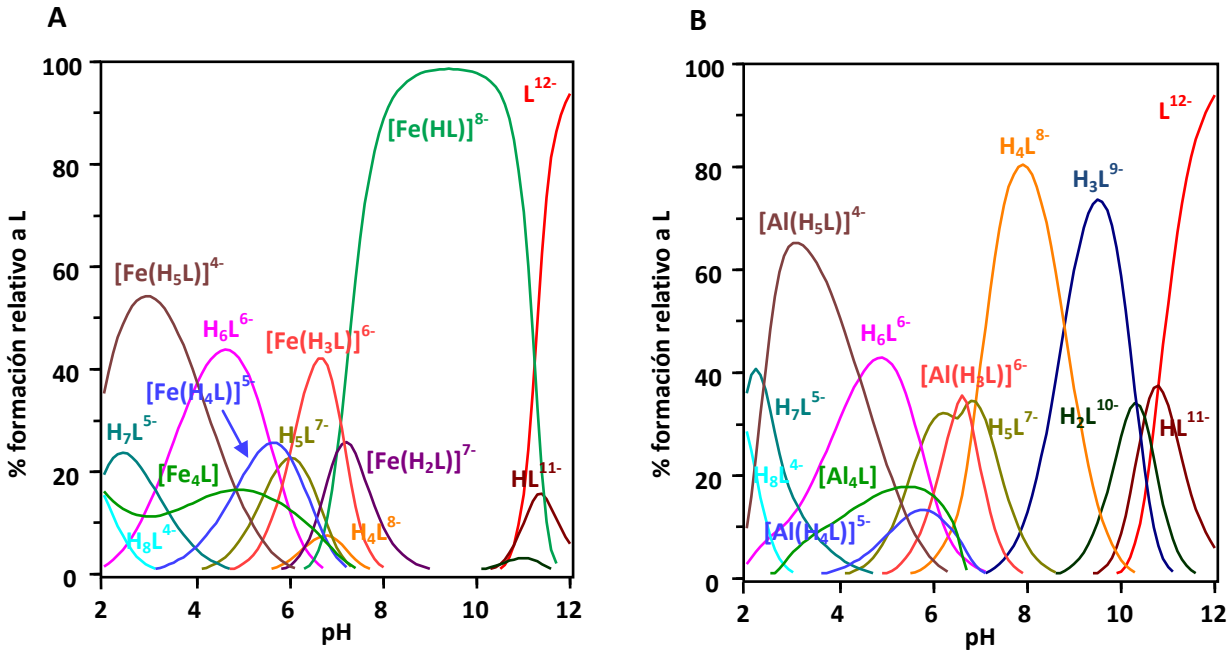


Figura 5.9. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(III), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 1 mM). M = Fe^{3+} (A) y Al^{3+} (B).

Dado que en presencia de cantidades equimolares de fitato, el hierro se hidroliza a partir de pH = 11 y el aluminio lo hace a pH ≈ 6 con la aparición de las especies $[Al_8(OH)_{22}]^{2+}$, $[Al(OH)_3]$ y $[Al_2(OH)_7]^-$, los complejos de hierro se extienden hasta medio básico, mientras que los de aluminio sólo lo hacen hasta medio neutro. Asimismo, el ion Fe^{3+} posee un gran potencial iónico y varios electrones d en su nivel de valencia, por lo que es capaz de formar complejos con el ligando en un amplio rango de protonación, incluso con la forma HL^{11-}, con la cual da lugar a una especie muy estable y predominante desde pH = 7 a 11 ($[Fe(HL)]^{8-}$).

El complejo neutro tetrametálico se forma a pH bajos, entre 2 y 7. Esto parece bastante extraño, ya que la especie del ligando involucrada es L^{12-}, la cual sólo existe en ausencia de ion metálico a valores de pH por encima de 11. Una explicación posible para el sistema conteniendo aluminio es la predominancia de productos de hidrólisis del metal, los cuales en medio básico asocian al ion metálico libre de la solución, provocando una baja en la relación metal:ligando que desfavorece la formación del complejo $[Al_4L]$. En cuanto al sistema InsP_6-Fe(III) esta no puede ser la causa, ya que la formación de los complejos hidroxilados no se activa hasta pH = 11. El origen de este comportamiento se encuentra subyacente a la gran estabilidad de los complejos 1:1 que el hierro genera en un amplio rango de pH. Estos mantienen acotada la predominancia del complejo polinuclear a medio ácido.

3.6. Influencia de iones alcalinos en la especiación fitato-$M^{2+/3+}$

En $NaClO_4$ 0,15 M, para los iones Sr^{2+} y Ba^{2+} se detectan complejos 1:1 del tipo $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con j = 5 y 6 para Sr^{2+} y j = 6 para Ba^{2+}, además de una especie neutra soluble de estequiometría 5:1 metal:ligando (tabla 5.1). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente para calcio y magnesio en las mismas condiciones[7,11]. A medida que la especie del ligando que reacciona posee menor carga negativa, la estabilidad de los complejos 1:1 disminuye gradualmente, en concordancia con un modelo de enlace esencialmente electrostático.

En presencia de un exceso de ion M(I), el ligando se asocia al metal completamente por encima de pH = 6 (ver figura 5.1), por lo que las formas

más afectadas corresponden a aquellas presentes en medio básico, L^{12-}, HL^{11-}, H_2L^{10-}, H_3L^{9-} y H_4L^{8-}. Esta es la causa de que, en $NaClO_4$ 0,15 M, los metales alcalinotérreos formen especies complejas mayoritariamente con las especies libres del ligando H_4L^{8-}, H_5L^{7-} y H_6L^{6-} (tabla 5.1). Por el contrario, en ausencia de ion alcalino (NMe_4Cl 0,15 M), estos metales se unen al ligando fundamentalmente por reacción con las formas di, tri y tetraprotonadas del fitato (ver tabla 5.1 y figura 5.3). El magnesio, por su pequeño tamaño, vuelve a constituir una excepción, y en presencia de exceso de ion Na^+ continúa formando las mismas especies que en su ausencia. Esta ventaja en la competencia con los metales M(I) por los sitios de coordinación, es uno de los factores más importantes por el cual el fitato se predice, en condiciones intracelulares, asociado completamente a este ion alcalinotérreo [7,11].

Al margen del cambio en el modelo de especies entre un medio y otro, la estabilidad de los complejos con la misma estequiometría se ve afectada por la presencia de un ion M(I) interactuante. En general, las constantes medidas en $NaClO_4$ 0,15 M son sistemáticamente mayores que las ajustadas en NMe_4Cl 0,15 M. Esta tendencia es la opuesta a la que se revisó para el Ins(1,2,6)P_3 en el capítulo 2. Como hipótesis, las posibles causas son básicamente dos, y están relacionadas con la diferencia estructural entre el Ins(1,2,6)P_3 y el InsP_6. En primer lugar, el Ins(1,2,6)P_3 contiene sólo tres grupos fosfato, adyacentes en el espacio, los que unen a los iones metálicos +2 en un esquema seguramente cooperativo y con una intensidad moderada. Esto permite que los cationes alcalinos, en gran exceso frente a los iones M^{2+}, compitan favorablemente por el único sitio de coordinación existente, provocando el desplazamiento del catión divalente y la consecuente pérdida en la estabilidad del complejo derivado. Por el contrario, el fitato posee seis grupos fosfato alrededor del anillo de inositol, lo que hace que exhiba un número importante de potenciales sitios de coordinación. En este sentido, el fitato será capaz de unir a más de un ion metálico sin sufrir cambios estructurales importantes, permitiendo la formación de especies mixtas estables de estequiometría $[Na_nM(H_{i-n}L)]^{(10-i)-}$. Esto provocaría el aumento observado en las constantes aparentes determinadas en un medio no interactuante (ver tablas 5.1, 5.2 y 5.5). Una segunda causa probable tiene relación con la alta carga del fitato y sus especies en solución. Respecto de los resultados en un medio no interactuante, la misma disminuye de forma apreciable por formación de los complejos M(I)-

M(II)-InsP_6 y M(I)-InsP_6. Dado que el ligando y sus complejos se encuentran a concentración relativamente baja en la solución, una disminución en algunas unidades de carga provoca una leve caída de la fuerza iónica. No obstante, como se expuso en el capítulo 2, las constantes de equilibrio varían apreciablemente en la zona de I = 0 - 0,2 M, por lo que este efecto se amplifica en las presentes condiciones. Dado que la carga del Ins(1,2,6)P_3 y sus complejos es bastante menor, es esperable que este fenómeno se dé en mucha menor proporción, haciendo que la competencia de los iones M^+ por el ligando componga el determinante predominante que explica la disminución de la estabilidad de los complejos en KCl.

En la tabla 5.2 se muestran para los iones de transición +2, además de los resultados del estudio termodinámico en NMe_4Cl 0,15 M, los valores de constantes de formación de complejos ajustados en $NaClO_4$ 0,15 M previo a esta tesis [7]. De la misma manera, la presencia de Na^+ provoca la generación de especies complejas más estables, aunque el efecto es menos pronunciado que para los iones alcalinotérreos. Los iones del bloque d poseen en general mayor potencial iónico y electrones en el subnivel *d*, por lo que su capacidad para competir por los grupos fosfato frente a los iones Na(I) y los protones es bastante mayor. De todas formas, el exceso de ion alcalino genera igualmente cambios en el modelo de especies, provocando la desaparición para algunos sistemas del complejo $[M(HL)]^{9-}$, y la unión del ion M^{2+} a formas del ligando más protonadas como H_5L^{7-}, H_6L^{6-} e incluso, para el caso del ion Co^{2+}, H_7L^{5-}.

Es interesante notar que para los iones de transición +2, la especie neutra pentametálica no es detectada en presencia de Na^+ [7]. En parte esto es debido a las diferencias en las relaciones molares utilizadas en el estudio en $NaClO_4$ 0,15 M, en donde no se ejecutaron experimentos con exceso de metal. En cambio, en este trabajo, se incluyeron corridas experimentales con relación molar M(II):ligando de 2:1, lo que permitió aumentar el peso estadístico de este tipo de especie polinuclear en el ajuste matemático. Al margen de esto, dado que los complejos $[M_5(H_2L)]$ son neutros, es posible que su interacción con el catión monovalente no sea demasiado importante, con lo que su predominancia se verá desfavorecida por el aumento en la estabilidad de los complejos 1:1 y la formación de especies ligando-M(I) muy estables.

El análisis de la influencia de una cantidad en exceso de ion alcalino sobre la distribución de las especies fitato-M(III) arroja resultados diversos. De acuerdo con la tabla 5.5, el aluminio(III) se comporta de la misma manera que los iones +2 revisados. Sus especies complejas ven aumentada su estabilidad en presencia de 0,15 M del ion Na^+, y el modelo de especies se expande por formación adicional de los complejos $[Al(H_2L)]^{7-}$ y $[Al(H_6L)]^{3-}$. Sin embargo, el ion Fe^{3+} forma especies con estabilidades similares en ambos medios, NMe_4Cl y $NaClO_4$. En este caso, la evaluación de la estabilidad relativa de los complejos se complica, debido a la afección adicional de los procesos de hidrólisis por la inclusión del ion Na^+ y la desaparición del ion Cl^-. De todas formas, en términos generales, los complejos fitato-Fe(III) parecen ser bastante insensibles a la concentración del ion interactuante, y esta sensibilidad aumenta al aumentar el estado de protonación de la especie.

3.7. InsP_6 como agente secuestrante

3.7.1. Selectividad y eficiencia relativa

A partir de la información termodinámica adquirida en este trabajo es posible evaluar de forma comparativa el desempeño del fitato como agente quelante de iones metálicos, tanto en su selectividad como en la eficiencia relativa que muestra frente a otros ligandos.

En la figura 5.10A se muestra la concentración de metal que el fitato deja libre en el sistema, en una solución 1,5 mM de ligando y 1 mM de metal, donde se verificó experimentalmente la ausencia de procesos de precipitación. Dado que el ion metálico se encuentra en defecto respecto al ligando, y que la interacción ligando-M(I) es moderada y sólo importante a altas relaciones M(I)/L, la concentración de Li^+, Na^+ y K^+ complejada es prácticamente nula. En el gráfico incrustado en esta figura, se muestra el mismo parámetro calculado en base a una concentración de ligando y metal de 10 mM. Incluso a este nivel sólo se observan pequeñas diferencias en la concentración de metal libre a pH > 9, en donde el InsP_6 interacciona siguiendo el orden del potencial iónico del catión: $Li^+ > Na^+ > K^+$. Esto es consecuencia de la baja capacidad que estos iones monovalentes tienen para competir con el protón por los grupos ionizables.

En contraposición, los iones alcalinotérreos muestran una mayor habilidad en la competencia con los H^+ por los sitios de coordinación. Para el ion Ca^{2+}, la concentración del metal en solución se ve incambiada hasta pH ≈ 6. En medio ácido, las formas protonadas del ligando son incapaces de complejar al catión, por lo que la capacidad secuestrante del fitato es despreciable (ver figura 5.3B). A partir de este punto, la pérdida del séptimo y octavo protón del ligando gatilla la formación casi paralela de tres complejos 1:1, los cuales consumen, en sólo dos unidades de pH, la gran mayoría del metal en solución (figura 5.10A). Para Sr^{2+} y Ba^{2+} la situación es bastante similar, aunque los procesos de complejación operan de forma menos gradual, como se advierte de la pendiente de las curvas en la zona de pH entre 6 y 7,5. Este efecto encuentra explicación en la formación de la especie neutra $[M_5(H_2L)]$, la cual se hace presente en medio neutro y, dada su alta relación estequiométrica M/L, genera un aumento sustancial en la capacidad quelante del ligando (ver figura 5.3C y D). Finalmente, el ion magnesio vuelve a escaparse de la tendencia general. Dadas las características químicas de los sistemas Mg(II)-fitato, en donde el catión es capaz de formar especies 1:1 con el ligando en un amplio grado de protonación, la complejación metálica comienza a valores de pH tan bajos como 2, donde el resto de los iones alcalinotérreos permanecen libres en solución.

A partir de aquí, la existencia de complejos solubles de estabilidad progresivamente más alta produce un decrecimiento ulterior en el porcentaje de ion no complejado, hasta decaer a cero a valores de pH mayores a 9. A pH fisiológico (7,4), todos los iones alcalinotérreos muestran una interacción considerable con el fitato, con más de un 70 % de eficiencia secuestrante. En este punto, la intensidad de la unión metal-ligando sigue el orden Mg ≈ Ba >Sr > Ca; la presencia de los complejos pentametálicos en los primeros tres casos contribuye al establecimiento de esta tendencia. A pH por encima de 8 solo una fracción mínima de M^{2+} continúa libre en todos los casos.

El mismo análisis puede realizarse para los iones +2 del bloque d. En la figura 5.10B se muestra la dependencia con el pH de la concentración de metal libre en una solución 2 mM en ligando y 1 mM en metal, donde se verificó experimentalmente la ausencia de procesos de precipitación.

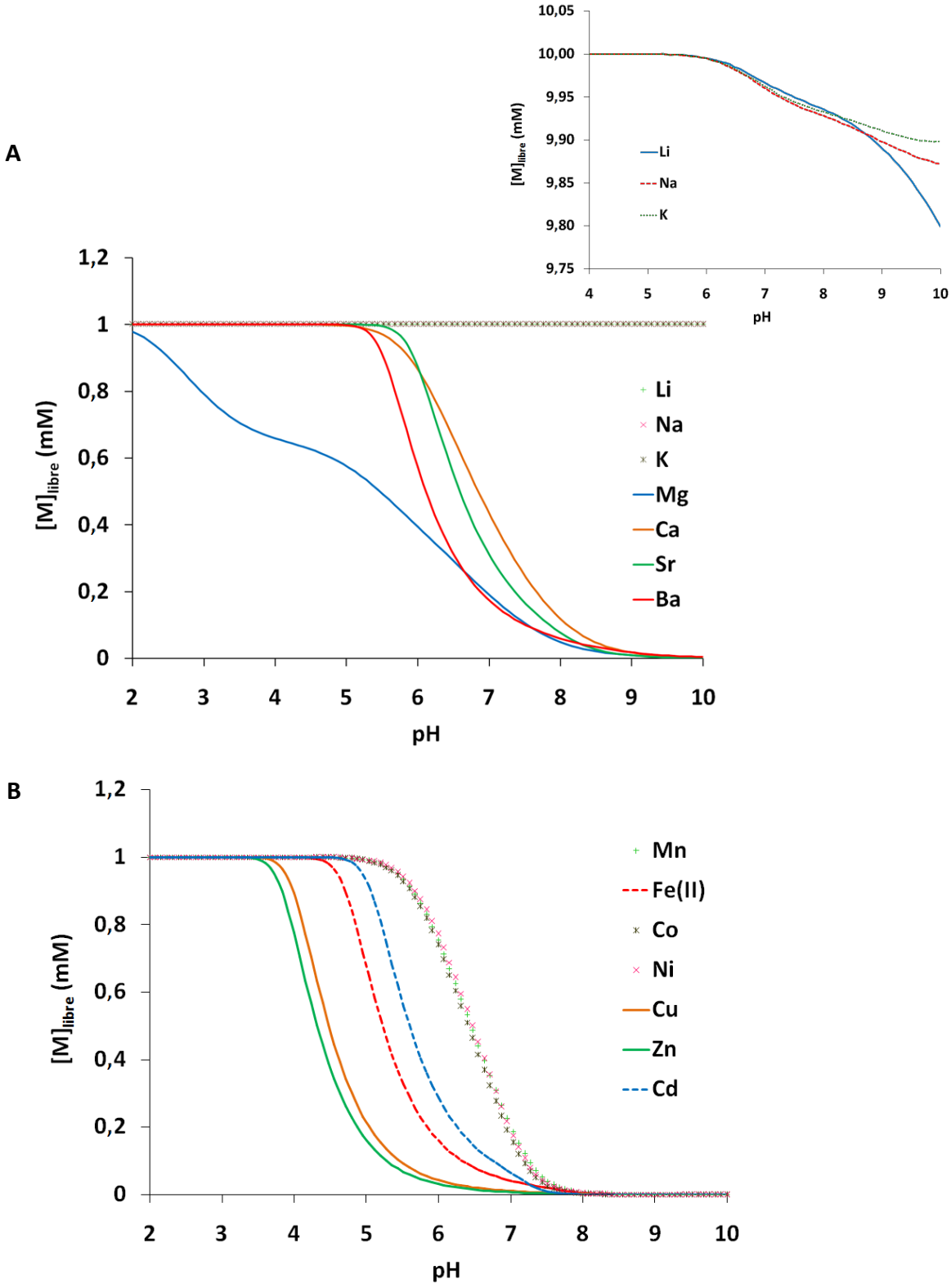


Figura 5.10. Concentración de metal libre en mM para los sistemas InsP_6-iones +1 y +2, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C. (A) Iones alcalinos y alcalinotérreos ([L] = 1,5 mM, $[M^{+/2+}]$ = 1 mM). (B) Iones +2 de transición ([L] = 2 mM, $[M^{2+}]$ = 1 mM). La ausencia de procesos de precipitación fue confirmada experimentalmente en estas condiciones. En (A), la figura incrustada corresponde a los resultados obtenidos empleando [L] = $[M^{+}]$ = 10 mM.

Hasta pH = 4 el fitato es incapaz de unirse a los iones considerados, debido, principalmente, a que se encuentra altamente protonado. A partir de este punto, el comportamiento del sistema es diferente para cada uno de los tres grupos de cationes 3*d* considerados anteriormente: (Cu^{2+} y Zn^{2+}), (Fe^{2+}, Cd^{2+}) y (Mn^{2+}, Co^{2+} y Ni^{2+}). Los iones del primer grupo dan lugar a especies polimetálicas $[M_5(H_2L)]$ bastante estables, cuya aparición, a pH ≈ 4, provoca una disminución en la concentración de ion libre. Este fenómeno se hace máximo a pH ≈ 5, por lo que la eficiencia de la captación metálica asciende a niveles cercanos al 85 %. A valores mayores de pH, el metal está asociado progresivamente a complejos de tipo 1:1. En cuanto al segundo grupo, Fe^{2+} y Cd^{2+}, la distribución de especies es similar, pero el complejo pentametálico comienza a formarse una unidad de pH por encima que en el caso del grupo anterior (figura 5.5 C y D). De acuerdo con esto, la caída de las curvas correspondientes se observa a pH ≈ 5. Un aumento subsiguiente de pH provoca la formación consecuente de los complejos 1:1, los que terminan de unir el metal restante en solución. El tercer grupo, compuesto por los iones Mn^{2+}, Co^{2+} y Ni^{2+}, experimenta procesos de complejación en presencia del fitato a valores de pH mayores que los mencionados. La caída en la curva de metal libre a pH cercano a 6 se debe a la formación de especies $[M(H_iL)]^{(12-2-i)-}$.

En la figura 5.11 se muestra, para una concentración de fitato de 2 mM y de metal de 0,5 mM, la variación en la $[M]_{libre}$ en función del pH para alguno de los iones +1, +2 y +3 analizados. Al igual que para los casos anteriores, se verificó experimentalmente la ausencia de complejos sólidos en todo el rango de pH. En conjunto, las curvas dejan en evidencia la gran diferencia de estabilidad que existe entre las especies complejas de los cationes con distinta carga, de acuerdo con el modelo de enlace predominantemente electrostático manejado hasta el momento. Mientras que en estas condiciones ninguna de la especies protonadas del ligando es capaz de asociarse con el ion K^+, el ion Fe^{3+} se encuentra completamente complejado entre pH 2 y 10 (ver figura 5.9A). Entre los iones +2 considerados, existe poca diferencia en cuanto al grado de asociación al InsP_6; casi todos comparten la curva que se detalla para el Co(II), variando el pH al cual ocurre la caída entre 5 y 6,5. Las excepciones son dos. Por un lado el par Cu/Zn, cuyos procesos de complejación se activan a pH ≈ 4 y por otro el magnesio, cuyas inusuales características lo convierten en el ion +2 con mayor afinidad por el ligando, incluso a valores de pH tan bajos como 2.

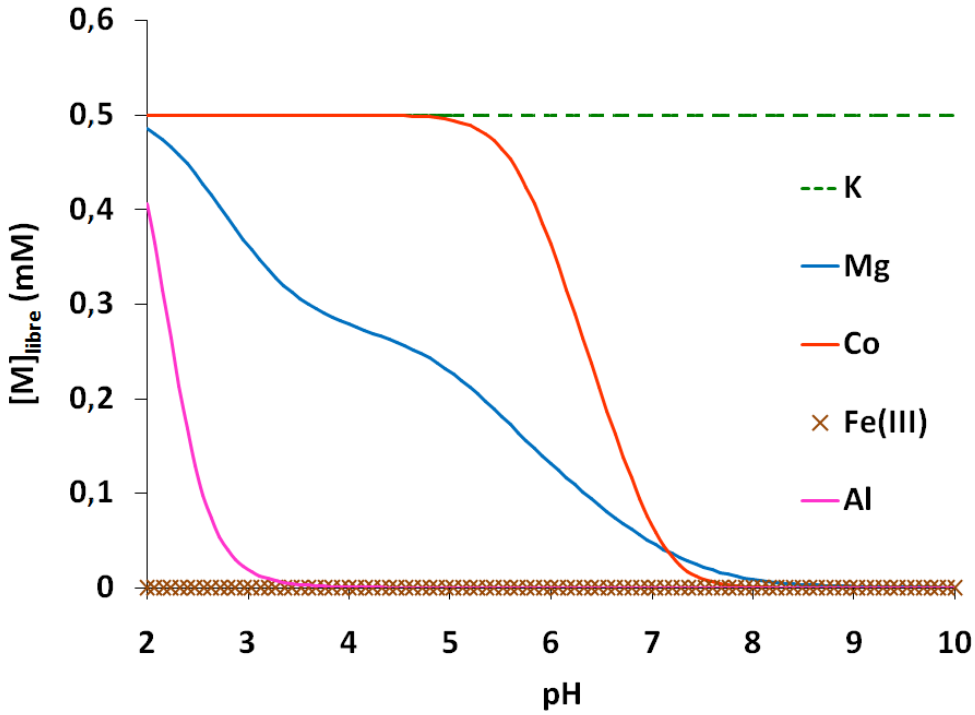


Figura 5.11. Concentración de metal libre en mM para los sistemas InsP_6-iones +1, +2 y +3, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 2 mM, $[M^{+/2+/3+}]$ = 0,5 mM). La ausencia de procesos de precipitación fue confirmada experimentalmente en estas condiciones.

El aluminio, al igual que el hierro, es secuestrado por el ligando en medio fuertemente ácido, y a partir de pH = 3 el nivel de Al^{3+} libre es prácticamente nulo. Sin embargo, este metal constituye un caso aparte en estas condiciones. Debido a los importantes procesos de hidrólisis que sufre, a partir de pH ≈ 7 - 8 es "arrancado" del fitato para dar lugar a complejos hidroxilados solubles (ver figuras 5.7B y 5.9B). De esta manera, en concentraciones del orden milimolar, los valores de pH para los cuales este metal es complejado efectivamente por el fitato se acotan al rango 2 - 7.

3.7.2. Desempeño relativo frente a otros ligandos

Utilizando los datos termodinámicos determinados en el marco de este trabajo, más algunos adicionales adquiridos de bases externas[30], es posible modelar el comportamiento químico del fitato y otros ligandos en presencia de algunos de los iones metálicos analizados. De esta forma se hace factible una evaluación comparativa de la eficiencia de los mismos como agentes complejantes y cómo su desempeño varía con el pH del medio. Se incluyen en el análisis los iones

Mg^{2+} y Fe^{3+}, por ser los cationes metálicos +2 y +3 de mayor afinidad por el fitato en un amplio rango de pH. Como ligandos adicionales, se seleccionaron aquellos que, resultando interesantes por sus características químicas y/o importancia biológica, poseen datos termodinámicos en un medio no interactuante y en condiciones de fuerza iónica y temperatura similares a las aplicadas en esta tesis (I = 0,1 - 0,15 M, T = 25 - 37 °C). Sus estructuras se detallan en la figura 5.12.

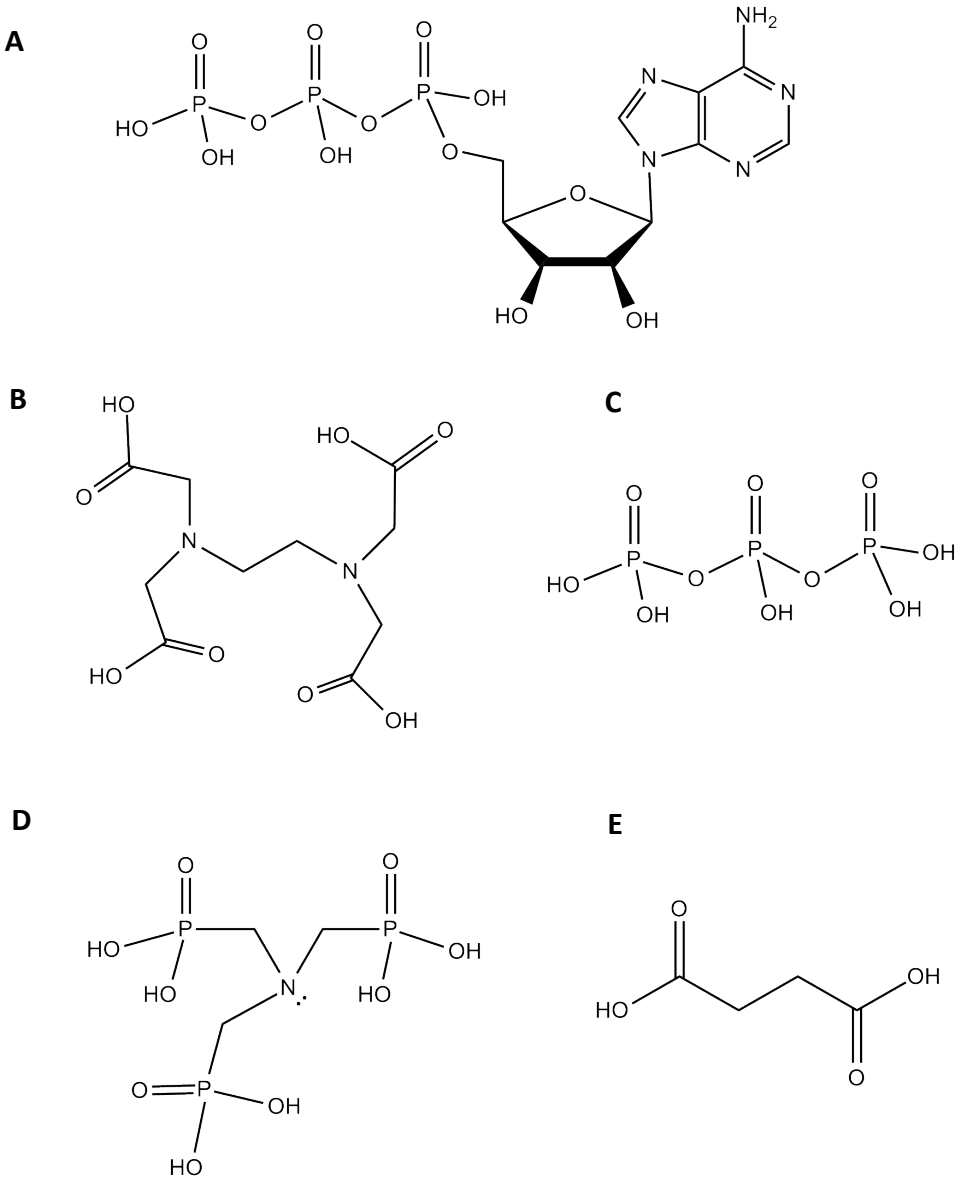


Figura 5.12. Estructuras del ATP (A), EDTA (B), ácido tripolifosfórico (C), ácido nitrilotrismetilfosfónico (NTPA) (D) y ácido succínico (E).

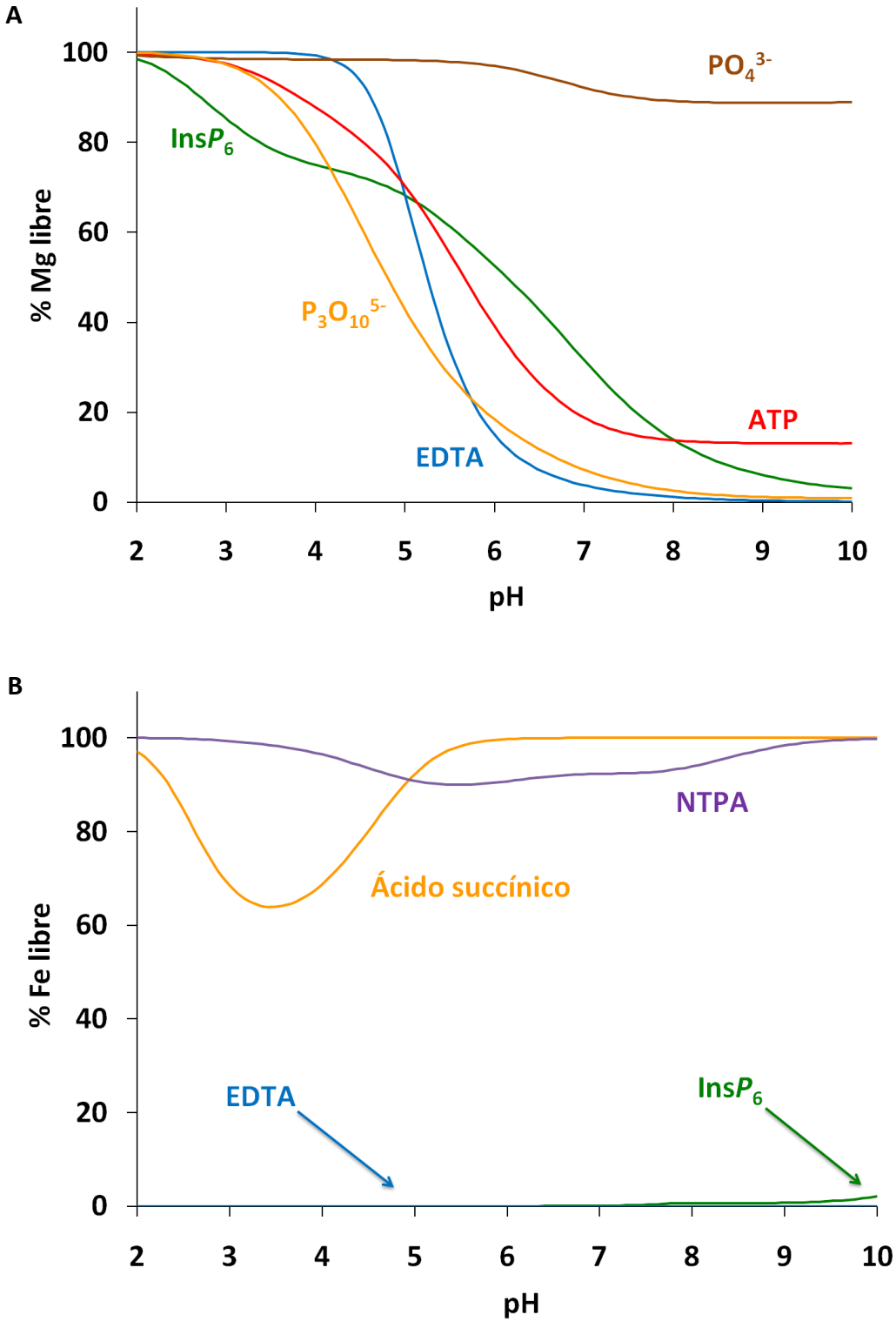


Figura 5.13. Porcentaje de metal libre en función del pH para los sistemas conteniendo Mg^{2+} (A) ó Fe^{3+} (B) en presencia de fitato, EDTA, ATP, NTPA, ácido succínico, $P_3O_{10}^{5-}$ o PO_4^{3-} ([L] = [M] = 1 mM). Para el modelado, las constantes de equilibrio de los ligandos EDTA, ATP, NTPA, ácido succínico, $P_3O_{10}^{5-}$ y PO_4^{3-}, en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo (I = 0,1 - 0,15 M, T = 25 - 37 °C, medio no interactuante), fueron extraídas de la base IUPAC de datos termodinámicos[30].

En la figura 5.13A se muestra la variación del porcentaje de metal libre con el pH para soluciones equimolares de Mg(II) y fitato, EDTA, ATP, $P_3O_{10}^{5-}$ o PO_4^{3-}. A valores de pH menores a 4, el metal presenta preferencia por el InsP_6, debido fundamentalmente, a la formación del complejo $[Mg(H_6L)]^{4-}$, estable en medio ácido. En estas condiciones, el porcentaje de magnesio complejado por el fitato es ≈ 20 %. El resto de los ligandos se encuentran presentes en un alto grado de protonación, por lo que su capacidad complejante se ve largamente disminuida. En este sentido, la habilidad del ion magnesio de interaccionar con formas del fitato presentes incluso a altas concentraciones de H^+ constituye una ventaja trascendente para éste frente al resto de los ligandos considerados. A valores de pH comprendidos en el rango 4 - 6, el ácido tripolifosfórico (figura 5.12C) logra deprotonarse y comienza a asociarse al metal en grado apreciable. En detalle, a pH = 5, casi un 60 % del magnesio total se encuentra unido a este ligando en forma del complejo $[Mg(HL)]^{2-}$. Un aumento ulterior de pH provoca la deprotonación del EDTA (figura 5.12B), el que forma un complejo de estequiometría 1:1 muy estable. A partir de aquí, este ligando es el que posee el mayor poder secuestrante, complejando prácticamente un 100 % del total de metal en el sistema.

El ion fosfato, utilizado aquí como referencia de un ligando pequeño altamente cargado, forma con el magnesio pares iónicos del tipo $[Mg(H_2L)]^+$ y [Mg(HL)], de estabilidad moderada. En medio básico, menos de un 10 % del metal se ve involucrado en estas especies. El ATP por su parte (figura 5.12A), logra deprotonarse por encima de pH = 3, formando los complejos $[Mg(HL)]^-$ y $[MgL]^{2-}$, los cuales captan, en medio básico, hasta un 85 % del total de metal.

Por comparación con el comportamiento del anión fosfato, es claro que los complejos del fitato son mucho más estables que los pares iónicos formados por la dupla grupo fosfato-Mg^{2+}. Esto denota la importancia que tiene la carga total del ligando en la fuerza del enlace con el metal, además de dar cuenta de la posible formación de un quelato. Sin embargo, el análisis es más complejo, ya que el ácido tripolifosfórico es capaz de dar valores de % Mg libre menores al fitato, portando sólo 5 unidades de carga negativa (frente a 12 del InsP_6). Este aspecto revela un nuevo determinante a considerar: la competencia del metal con los iones H^+ por los grupos ionizables. Efectivamente, el anión tripolifosfato consigue generar al menos un grupo fosfato completamente

deprotonado a pH < 3, mientras que el fitato no lo logra hasta pH ≈ 6 - 7. Un modesto aumento de pH provoca entonces la formación de complejos estables entre el magnesio y el $P_3O_{10}^{5-}$. Por el contrario, dado que los complejos 1:1 InsP_6-Mg(II) formados se estabilizan gradualmente a medida que disminuye el grado de protonación de la especie correspondiente del ligando, se necesita un aumento de pH considerable para observar un disminución significativa del porcentaje de metal libre (ver figura 5.13A). Desde pH = 2 y hasta pH = 10 su capacidad secuestrante aumenta progresivamente, captando desde un 20 % hasta 95 % del ion metálico total. En este sentido, el InsP_6 se encuentra en una situación bastante similar a la del ATP en la mayor parte del rango de pH de estudio, en especial en condiciones fisiológicas. Dada la afinidad conocida de este nucleótido por el ion Mg^{2+} y su relación con la homeostasis del mismo, el fitato posee, entonces, las características químicas adecuadas para ser considerado un posible ligando intracelular de magnesio. De acuerdo con esto, en condiciones citosólicas simuladas el mismo se predice asociado completamente a este metal [7,11].

En la figura 5.13B se muestra la variación del porcentaje de metal libre con el pH para los sistemas conteniendo 1 mM de ligando y 1 mM de Fe(III). Dentro del valor de este parámetro se incluyeron, también, las especies hidroxiladas del metal, en el entendido de que contribuyen a las formas "libres" del hierro, es decir, no asociadas al fitato. En todo el rango de pH, el EDTA y el fitato son los agentes secuestrantes más eficientes, dando cuenta de prácticamente el 100 % de metal complejado. Por encima de pH = 9, el fitato libera una mínima parte del ion metálico por competencia con los procesos de hidrólisis, los cuales, como fue discutido, operan en estas condiciones por encima de pH = 10,5.

A modo de comparación se consideraron en el análisis dos moléculas adicionales: ácido succínico y NTPA (figuras 5.12D y E). El primero, encontrado en sistemas biológicos asociado al ciclo de Krebs, se ha incluido como modelo de molécula pequeña que presenta una afinidad moderada por el hierro(III)[31]. El ácido nitrilotrismetilfosfónico, NTPA, es el derivado fosfónico del NTA (ácido nitrilotriacético), emparentado estructuralmente con el EDTA. Como ligando secuestrante de alta eficiencia, esta molécula está involucrada en las interacciones que modulan la distribución de los iones metálicos a nivel de

sistemas biológicos y ambientales[32], por lo que varios reportes se han dedicado al estudio de su especiación química [33-35].

En contraposición a lo discutido para el EDTA y el fitato, tanto el ácido succínico como el NTPA se comportan como agentes secuestrantes de eficiencia media a baja. A pH = 3, el ácido succínico se deprotona dando lugar al complejo $[FeL]^+$, el cual captura menos del 40 % de metal entre pH 3 y 4. Un aumento subsiguiente de pH provoca su disociación debido a los procesos de hidrólisis del metal, contra los cuales el ligando no compite. Por su parte, el NTPA, aunque posee una estructura similar al EDTA y grupos donores del mismo tipo que el fitato, no es capaz de asociarse con más del 10 % del hierro total en solución. En este caso, al igual que ocurría con el fitato, los grupos fosfatos son altamente básicos, por que permanecen protonados hasta valores considerables de pH. Por ejemplo, a pH = 5 la especie mayoritaria del NTPA es H_3L^{3-}, y a pH = 7 corresponde a H_2L^{4-}, pero los complejos se generan por reacción con las formas HL^{5-} y L^{6-}. De esta manera, los procesos de complejación comienzan a operar a pH ≈ 4 - 5, donde las reacciones de hidrólisis del hierro son lo suficientemente importantes como para competir por el metal con los complejos del NTPA.

En suma, el fitato se presenta como un agente complejante de hierro(III) extremadamente efectivo en un rango de pH 2 - 10, comparable en su desempeño al EDTA. Su eficiencia supera ampliamente la correspondiente a ligandos de bajo peso molecular como el ácido succínico, e incluso a moléculas quelantes reconocidas por su habilidad complejante de iones multivalentes como el NTPA.

4. Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados del estudio termodinámico del comportamiento en solución del fitato en presencia de variados iones metálicos, en condiciones de temperatura y fuerza iónica similares a las fisiológicas y en un medio no interactuante. Las constantes de estabilidad ajustadas revelan que el InsP_6 interactúa débilmente con cationes alcalinos, aunque la estabilidad de los complejos obtenidos es apreciable en comparación con otros de estos mismos metales. En presencia de 0,15 M de ion M^+, el fitato

se predice completamente asociado al metal en medio neutro a básico, por formación de complejos polinucleares del tipo $[M_i(H_jL)]^{(12-i-j)-}$ con *i:j* = (3:4), (4:3), (5:2) y (6:0). En presencia de iones alcalinotérreos en el rango milimolar, el InsP_6 forma complejos estables de estequiometría 1:1 del tipo $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $2 \leq j \leq 6$ para Mg(II), $2 \leq j \leq 4$ para Ca(II) y $j = 2, 3$ para Sr(II) y Ba(II), además de una especie neutra pentametálica de estequiometría general $[M_5(H_2L)]$ para todos los sistemas excepto Ca(II). Por su parte, los iones +2 de transición estudiados poseen modelos de especies que presentan también complejos de tipo 1:1 metal:ligando $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ para todos los sistemas y una especie pentanuclear $[M_5(H_2L)]$ para aquellos conteniendo Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} y Cd^{2+}. El estudio de los sistemas InsP_6-Fe(III)/Al(III) arrojó en ambos casos la presencia de complejos del tipo $[M(H_jL)]^{(12-2-j)-}$ con $1 \leq j \leq 5$ para Fe^{3+} y $3 \leq j \leq 5$ para Al^{3+}, además de complejos tetranucleares del tipo $[M_4L]$ en ambos casos.

La determinación de las constantes de estabilidad de complejos con Sr(II) y Ba(II) en $NaClO_4$ 0,15 M permitió completar el estudio de estos sistemas en condiciones fisiológicas simuladas, comenzado previo a esta tesis. En general, las constantes medidas en $NaClO_4$ 0,15 M son sistemáticamente mayores que las ajustadas en NMe_4Cl 0,15 M, lo cual podría explicarse, presumiblemente, por la formación de especies mixtas de estequiometría $[Na_nM(H_{i-n}L)]^{(10-i)-}$, además de la contribución de efectos debidos a la variación en la carga de las especies en solución, los que afectan el valor de la fuerza iónica ajustada.

La selectividad del fitato frente a los iones metálicos estudiados es dependiente, en primer término, de la carga del catión. En consecuencia, para concentraciones de ligando y metal en el rango milimolar, el fitato interacciona de manera leve con los iones alcalinos, exhibiendo una baja selectividad, la cual es dependiente del radio iónico a altos valores de pH. Por el contrario, lo hace de manera sustancial con la mayoría de los iones alcalinotérreos en medio neutro-básico, aunque también con una baja selectividad; el magnesio constituye una excepción a esta regla, dado que el ligando exhibe una alta afinidad en medio ácido. El fitato se asocia a los iones metálicos 3*d* estudiados a partir de pH = 4, diferenciándose tres grupos de cationes con patrones de reactividad química similar: (Cu/Zn), (Fe/Cd) y (Mn/Co/Ni). En cuanto a los iones +3 incluidos en el análisis, el fitato interacciona fuertemente con el hierro

y el aluminio, aunque este último es más sensible a los procesos de hidrólisis que operan a pH neutro.

5. Referencias bibliográficas

1. Oatway, L.; Vasanthan, T.; Helm, J. H. *Food Reviews International* **2001,** *17*, 419-431.
2. Konietzny, U.; Jany, K. D.; Greiner, R. *Journal fur Ernahrungsmedizin* **2006,** *8*, 18-28.
3. Shears, S. B. *Cellular Signalling* **2001,** *13*, 151-158.
4. Urbano, G.; López-Jurado, M.; Aranda, P.; Vidal-Valverde, C.; Tenorio, E.; Porres, J. *Journal of Physiology and Biochemistry* **2000,** *56*, 283-294.
5. Crea, F.; De Stefano, C.; Milea, D.; Sammartano, S. *Coordination Chemistry Reviews* **2008,** *252*, 1108-1120.
6. Anderegg, G. *Critical survey of stability constants of EDTA complexes;* Pergamon Press: Oxford, 1977.
7. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
8. Arena, G.; Musumeci, S.; Purrello, R. *Thermochimica Acta* **1983,** *61*, 129-138.
9. Fridman, A.; Dyatlova, N.; Fridman, Y. *Zhurnal Neorganicheskoi Khimii* **1969,** *14*, 3304-3305.
10. Shannon, R. D. *Acta Crystallographica* **1976,** *A32*, 751-767.
11. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.
12. Flynn, C. M. Jr. *Chemical Reviews* **1984,** *84*, 31-41.
13. Stefansonn, A. *Environmental Science and Technology* **2007,** *41*, 6117-6123.
14. Liu, X.; Millero, F. J. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1999,** *63*, 3487-3497.
15. Venturini, M.; Berthon, G. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1987,** 1145-1148.
16. Baes, C. F.; Mesmer, R. E. *The Hydrolysis of Cations;* John Wiley and Sons: 1976.
17. Millero, F. J.; Yao, W.; Aicher, J. A. *Journal of Marine Chemistry* **1995,** *50*, 21-39.
18. Byrne, R. H.; Kester, D. R. *Marine Chemistry* **1976,** *4*, 255-274.
19. Byrne, R. H.; Kester, D. R. *Marine Chemistry* **1976,** *4*, 275-287.
20. Soli, A. L.; Byrne, R. H. *Journal of Solution Chemistry* **1996,** *25*, 773-785.
21. Daniele, P. G.; Rigano, C.; Sammartano, S. *Talanta* **1983,** *30*, 81-87.
22. Kuma, K.; Nishioka, J.; Matsunaga, K. *Limnology and Oceanography* **1996,** *41*, 396-407.
23. Millero, F. J. *Earth Planet Science Letters* **1998,** *154*, 323-330.
24. Rose, A. L.; Waite, T. D. *Environmental Science and Technology* **2003,** *37*, 3897-3903.
25. Byrne, R. H.; Yao, W.; Luo, Y.; Wang, B. *Marine Chemistry* **2005,** *97*, 34-48.
26. Byrne, R. H.; Luo, Y.; Young, R. W. *Marine Chemistry* **2000,** *70*, 23-35.
27. Delgado, R.; Quintino, S.; Teixeira, M. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997,** 55-64.
28. Lever, A. B. P. *Inorganic electronic spectroscopy;* second ed.; Elsevier Science Publishers: 1984.
29. Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Química Inorgánica Avanzada;* Cuarta ed.; Editorial Limusa: México, 1990.
30. *The IUPAC Stability Constants Database, SC-Database,* version 5.83; Academic Software: Sourby Old Farm, Timble, Otley, Yorks, LS21 2PW, UK, 2005
31. Deneux, M.; Meilleur, R.; Benoit, R. *Canadian Journal of Chemistry* **1968,** *46*, 1383-1388.
32. Lejczak, B.; Kafarski, P.; Zygmunt, J. *Biochemistry* **1989,** *28*, 3549-3555.
33. Kiss, T.; Balla, J.; Nagy, G.; Kozlowski, H.; Howalik, J. *Inorganica Chimica Acta* **1987,** *138*, 25-30.
34. Dhansay, M. A.; Linder, P. W. *Journal of Coordination Chemistry* **1993,** *28*, 133-145.
35. Mohamed, M. M. A.; El-Sherif, A. A. *Journal of Solution Chemistry* **2010,** *39*, 639-653.

Capítulo 6

Estudio estructural en solución de los sistemas InsP_6-H^+/M^+

En este capítulo se extiende el estudio fisicoquímico de los sistemas fitato-ion metálico, a través del aporte de información estructural de las diversas especies del ligando libre y complejas con Na^+ y K^+. Mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas (RMN y UV-vis) y de modelado molecular, se analiza química, estructural y energéticamente la secuencia inframolecular de protonación del ligando en ausencia de ion metálico agregado. Por estrategias similares, se evalúa en detalle la influencia que los metales monovalentes tienen sobre la estabilidad, conformación y estado de protonación de las especies del ligando, a través de la caracterización fisicoquímica completa de los complejos detectados.

1. Introducción

La estequiometria de las especies formadas y las propiedades de protonación y complejación del fitato, tanto a nivel macro como micromolecular, son extremadamente importantes en sistemas biológicos. Las herramientas que los datos estructurales del sistema aportan tanto a bioquímicos como a biólogos son esenciales para la dilucidación del rol biológico de estas moléculas. Más aún, esta información es la base de una de las aplicaciones más importantes en esta área: el diseño de estrategias de síntesis de agonistas y antagonistas que podrán en un futuro tener uso directo en la terapia de algunas patologías.

En este marco, la gran mayoría de las constantes de protonación y complejación determinadas para los inositol fosfatos corresponden a macroconstantes, que describen a las especies como un todo. Considerando su importancia, abundancia y número de miembros, existen pocos reportes al momento que se centren en el análisis del estado de protonación a nivel inframolecular y/o las propiedades intrínsecas de complejación de los inositol

fosfatos [1-15]. Una gran parte de los mismos sólo lo hace mediante métodos cualitativos y en condiciones experimentales diversas, lo que lleva a resultados poco comparables entre sí.

Adicionalmente, los Ins*P* exhiben otra característica que enriquece su comportamiento en solución y al estado sólido: dos posibles conformaciones. Como se muestra en la figura 6.1, ejemplificado para el ácido fítico, cada sustituyente del anillo de inositol puede tomar dos posiciones, axial o ecuatorial, la que dependerá del confórmero que predomine. Al estado en donde cinco de los grupos fosfatos se ubican de forma axial, mientras que el esterificado sobre C2 lo hace en posición ecuatorial, se le denominará aquí 5a1e, mientras que la conformación opuesta será referida como 1a5e.

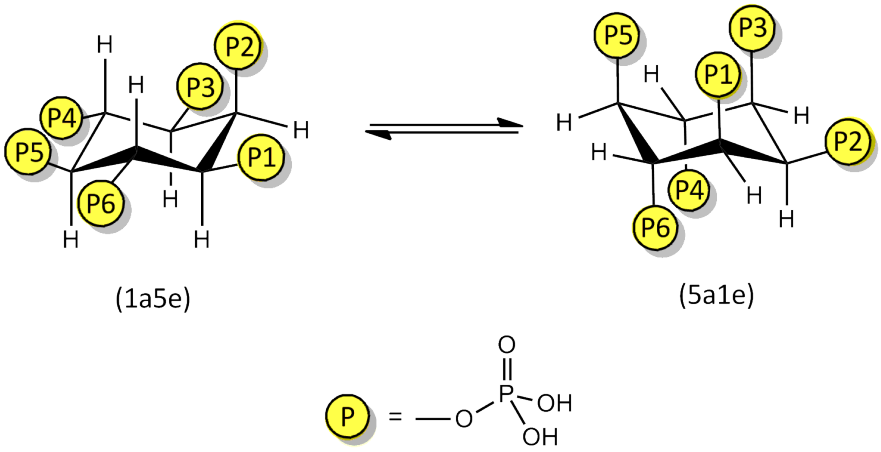


Figura 6.1. Estados conformacionales del ácido fítico.

Dado que las moléculas que pueden cambiar su geometría rápidamente son muy útiles como "interruptores moleculares", esta propiedad de los inositol fosfatos ha impulsado aún más la necesidad del establecimiento de los determinantes fisicoquímicos que modulan su comportamiento conformacional. Hoy en día gran parte de la información al respecto fue brindada por uno de los trabajos más referenciados en esta área. Barrientos y Murthy[16] analizaron el proceso de cambio conformacional para algunos inositol fosfatos de distinto grado de fosforilación, desde InsP_1 hasta InsP_6, por RMN de ^{1}H. Concluyeron que aquellos miembros mayores de la familia de los Ins*P*, InsP_5 e InsP_6, experimentan una transición conformacional en medio básico, mientras que el resto es estable exclusivamente en el estado 1a5e. Como hipótesis, los autores consideran que la estabilización de la conformación 5a1e

a alto pH es determinada por un número suficientemente grande de grupos fosfato, los cuales se mantienen fijos en posición axial incluso considerando a la repulsión existente, por la formación de enlaces de hidrógeno o la asistencia de contraiones del medio. Una revisión más actual realizada por Volkman y sus colaboradores[17], utilizando técnicas de modelado molecular y RMN, encontró que aquellos inositol fosfatos con grupos *syn*-1,3,5 triaxial son sustancialmente proclives a adoptar la conformación 5a1e. Esta característica estaría relacionada con la posibilidad de formar "cajas" negativas adecuadas para interaccionar con algunos cationes del medio, los cuales estabilizarían uno de los confórmeros sobre el otro. No obstante, los detalles a nivel molecular y el grado en el que cada determinante influye en estos procesos son parte todavía del vacío estructural existente en este campo.

En particular para el fitato, los primeros estudios potenciométricos y espectroscópicos evidenciaron algunos aspectos interesantes respecto del estado conformacional de la molécula en función del pH[4,18-21]. Basado en estudios de RMN, Costello *et al*. concluyeron que en soluciones concentradas de NaOH el ligando se encuentra en la conformación 1a5e [19]. Sin embargo, en presencia de cantidades apreciables de Na^+, Isbrandt y Oertel [4] propusieron la existencia de un cambio conformacional de 1a5e a 5a1e a pH = 9,4, a través de métodos espectroscópicos de RMN de ^{13}C, ^{31}P y Raman. Posteriormente, Emsley y Niazi sugirieron a través del análisis de los desplazamientos químicos de las señales de ^{31}P que el InsP_6 presenta varios cambios conformacionales según el estado de protonación: 5a1e por debajo de pH = 2, 1a5e para valores de pH en el rango 2 - 5, 5a1e nuevamente por encima de 5 y hasta pH = 11, y finalmente 1a5e por encima de pH = 12 [20]. Más adelante, y basados en conceptos de interacciones estéricas, Bieth y Spiess concluyeron que la mayoría de los fosfatos se encuentran en posición ecuatorial para la especie totalmente deprotonada y axial para especies protonadas [21]. Pero en 1995, Brigando *et al*. publicaron un reporte basado en estudios potenciométricos y de RMN de ^{13}C, ^{31}P y ^{1}H, en donde asignan inequívocamente las distintas señales y dan cuenta de las preferencias conformacionales del ligando en solución [5]. En ese trabajo se acepta que, en presencia de muy pequeñas cantidades de K^+, el InsP_6 sufre un cambio conformacional único, desde 1a5e a 5a1e entre pH = 10 y pH = 12. Estos resultados fueron confirmados muy recientemente también en presencia de exceso de potasio[11]. En contraposición, Bebot-Brigaud *et al*. trabajando en

ausencia de iones alcalinos reportaron un patrón de señales que difiere significativamente de los trabajos anteriores en medio básico, además de la ausencia de cambio conformacional[9]. Este resultado, aunque extraño a la luz de los trabajos anteriores, se repite incluso en otro trabajo [22]. Sin embargo, en el mismo año en que estos dos reportes eran publicados, G. Patón y sus colaboradores encontraban un marcado cambio conformacional en el rango de pH 10,2 - 11,3, en base a experimentos de RMN realizados a -17 °C y en ausencia de ion alcalino [6]. En consecuencia, aún hoy sigue planteada la cuestión de los pormenores que intervienen en la obtención de resultados tan diversos.

A nivel estructural, el sistema se caracteriza por un grado de incertidumbre similar. No se tiene una idea clara de los factores que modulan el cambio conformacional observado para el fitato. Se ha propuesto que cuando el ligando está protonado, los enlaces de hidrógeno estabilizan la forma ecuatorial, mientras que para L^{12-} la conformación 5a1e disminuye la repulsión interfosfato[5]. No obstante, otros estudios proponen que algunas de las especies protonadas también podrían compartir la conformación 5a1e, por lo que la transición entre ambos confórmeros podría ser originada en alguna de las reacciones de protonación intermedias [4,6]. De forma adicional, existe evidencia experimental que en apariencia apoya otros determinantes en el proceso de transición conformacional, como las interacciones intramoleculares de tipo C-H···O-P y el efecto de solvatación del anión. Nuevamente aquí no se aportan datos concretos a nivel molecular[6].

En línea con lo discutido anteriormente, los autores coinciden en que un factor que posee una influencia importante sobre el comportamiento del ligando en este sentido es la presencia de iones alcalinos en el medio, aunque no existe acuerdo sobre las características de sus acciones. Según Isbrandt y Oertel[4], los resultados espectroscópicos Raman indican que estos iones metálicos se unen preferencialmente a las especies altamente deprotonadas del ligando, cuya interacción disminuye en el orden dado por el radio iónico $Li^+ \approx Na^+ > Cs^+$. Por el contrario, mediante el análisis de los desplazamientos químicos del protón a pH = 11, Bauman *et al.*[22] reportaron un tipo de interacción dependiente del radio hidratado del ion, por lo cual su influencia en el cambio conformacional del fitato disminuye en el orden $Cs^+ \approx Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$. Estos últimos autores aplican, asimismo, herramientas de modelado molecular a las especies $H_{12}L$ y

L^{12-}, verificando que los confórmeros más estables corresponden a 1a5e y 5a1e respectivamente. Desafortunadamente, dado que estas especies existen hacia los extremos de la escala de pH, no se aporta información directa sobre las características moleculares del proceso de transición conformacional.

Al margen de toda esta información, en la mayoría de los casos este tipo de estudios se basa en metodologías de trabajo cualitativas o semicuantitativas, mediante la inspección de las curvas de RMN o la determinación de los tiempos de relajación. Los sistemas son muy complejos, por lo que las conclusiones son en general especulativas y en ocasiones contradictorias. Otra característica de la producción científica en el tema es que los experimentos se encuentran en todos los casos alejados de las condiciones fisiológicas, y muchas veces no existe coherencia entre los valores de temperatura fijados para los distintos experimentos dentro de un mismo trabajo.

En este contexto, se presentan aquí los resultados del estudio del comportamiento del InsP_6 en ausencia y presencia de iones alcalinos, en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura.

2. Parte experimental

El comportamiento químico del InsP_6 en ausencia de iones metálicos fue analizado a 37,0 °C en NMe_4Cl 0,15 M por RMN de ^{31}P. En el caso de los sistemas conteniendo Na^+ o K^+, no se adicionó electrolito soporte ya que la fuerza iónica fue establecida por la sal del ion metálico utilizada. Los espectros fueron registrados, y los datos derivados tratados, según se detalló en el capítulo 4. A diferencia de lo ya realizado por otros grupos, los experimentos se han realizado en agua, para evitar los errores debidos a la corrección del pH a partir de los pD medidos. Se utilizaron concentraciones y relaciones ligando-metal que permitieron obtener buenas relaciones señal/ruido: InsP_6-H^+ ([L] = 10,43 mM y 5,02 mM), InsP_6-Na^+ ([L] = 5,02 mM, [Na^+] = 152,5 mM) e InsP_6-K^+ ([L] = 5,15 mM, [K^+] = 150,8 mM). La asignación de las señales para el ligando se realizó en base a trabajos ya publicados en el tema [5,9,11]. La asignación de los espectros en presencia de metal se realizó, en general, por comparación con los espectros del fitato libre.

Aunque los valores de p*K*a individuales para cada grupo fosfato han sido reportados anteriormente[4,5,19,20,23], éstos constituyen sólo datos estimativos, ya que su determinación se basó en la inspección cualitativa de los saltos de las curvas de titulación por RMN. Este método ha sido duramente criticado por Bebot-Brigaud[9], ya que sólo es aplicable si se alcanzan las mesetas asociadas a las especies en distinto grado de protonación, algo que definitivamente no ocurre para el InsP_6. En este trabajo se resuelve esta problemática a través de la aplicación del método de "expansión de clúster" [24], el cual permite la determinaron de las microconstantes que caracterizan los diversos equilibrios de microprotonación.

Todas las optimizaciones de las geometrías moleculares se realizaron de acuerdo con las condiciones expuestas en el capítulo 4. Para el estudio teórico del proceso de protonación del fitato, se realizaron cálculos de optimización de geometrías con el método RHF/3-21+G*, sobre ambos estados conformacionales de las especies L^{12-}, HL^{11-}, H_2L^{10-}, H_3L^{9-}, H_4L^{8-}, H_5L^{7-}, H_6L^{6-} y $H_{12}L$. En base a las estructuras más estables en cada caso, se realizaron cálculos puntuales de energía con los métodos RB3LYP/3-21+G*, IPCM y CPCM. Las cargas atómicas NPA (*natural population analysis*) se determinaron mediante el método RHF/3-21+G*. El análisis de las transiciones electrónicas que dan lugar a las bandas en los espectros electrónicos del ligando se realizó sobre las geometrías optimizadas al nivel RHF/3-21+G*, mediante el uso del método RCIS/3-21+G*. El estudio teórico de los sistemas InsP_6-Na^+/K^+ se efectuó a través de la optimización de las diversas geometrías iniciales con el método RB3LYP/LANL2DZ. Este modelado se repitió, para el ion sodio, en fase gaseosa y considerando dos moléculas de agua de coordinación por cada ion metálico, para ambos estados conformacionales de los cuatro complejos detectados.

El estudio espectroscópico UV-visible del ligando en ausencia de iones metálicos fue realizado siguiendo las condiciones mencionadas en el capítulo 4. Se registraron los espectros de una solución 10,1 mM del ligando en cloruro de tetrametilamonio 0,15 M a 37,0 °C, usando como referencia agua Milli-Q ó NMe_4Cl 0,15 M, en celdas de camino óptico de 0,1 ó 1 cm, con un ancho de rendija de 2 nm. En ausencia de metal, sólo existen bandas suficientemente intensas por debajo de 230 nm, correspondientes a las formas menos protonadas del ligando, por lo que el análisis del comportamiento

espectroscópico del mismo se ejecutó a partir de pH = 7,0. Asimismo, se utilizaron los espectros registrados a pH < 11,7, dado que por encima las absorbancias toman valores fuera del rango de trabajo del detector. El resto de las constantes de protonación necesarias para el ajuste de los datos experimentales fueron fijadas en los valores determinados potenciométricamente. Dado que el cloruro de tetrametilamonio utilizado como electrolito soporte y el hidróxido de tetrametilamonio usado para ajustar el pH absorben por debajo de 205 nm, se corrigió el aumento consecuente en la línea de base durante las corridas experimentales.

3. Resultados y discusión

3.1. Sistema InsP_6-H^+

3.1.1. Análisis de los equilibrios de protonación por RMN de ^{31}P

A modo de ejemplo, en la figura 6.2A se muestran los espectros de una de las dos corridas realizadas. A medida que disminuye el pH y los grupos fosfato se protonan sucesivamente, las señales se desplazan hacia campos más altos. Este fenómeno es complejo y no puede explicarse por la variación de la densidad de carga debida a efectos puramente inductivos. Un comportamiento similar ya ha sido descrito por Horsley y Sternlicht para espectros de RMN de ^{13}C en aminoácidos, aminas y ácidos carboxílicos [25]. Varios autores han intentado dar cuenta de las bases teóricas de este fenómeno. La explicación que al momento se considera más general y consistente es la aportada por Moedritzer [26], en base a conceptos mecanocuánticos. El desplazamiento químico del fósforo es afectado por la concentración hidrogeniónica en términos de la suma de tres contribuciones: variación de la electronegatividad de los oxígenos asociados al átomo de P, variación del ángulo de enlace O-P-O, y ocupación de los orbitales dπ del fósforo.

Se obtienen cuatro señales, correspondientes a los cuatro grupos de fosfatos simétricamente equivalentes de la molécula: los ubicados sobre C1 y C3, sobre C4 y C6, el correspondiente a C2 y aquel esterificado en C5. En este trabajo se hará referencia a ellos como P1/3, P4/6, P2 y P5 respectivamente. Sin perjuicio de lo anterior, se utilizará la misma nomenclatura al referirse a los átomos de fósforo de los grupos fosfatos correspondientes.

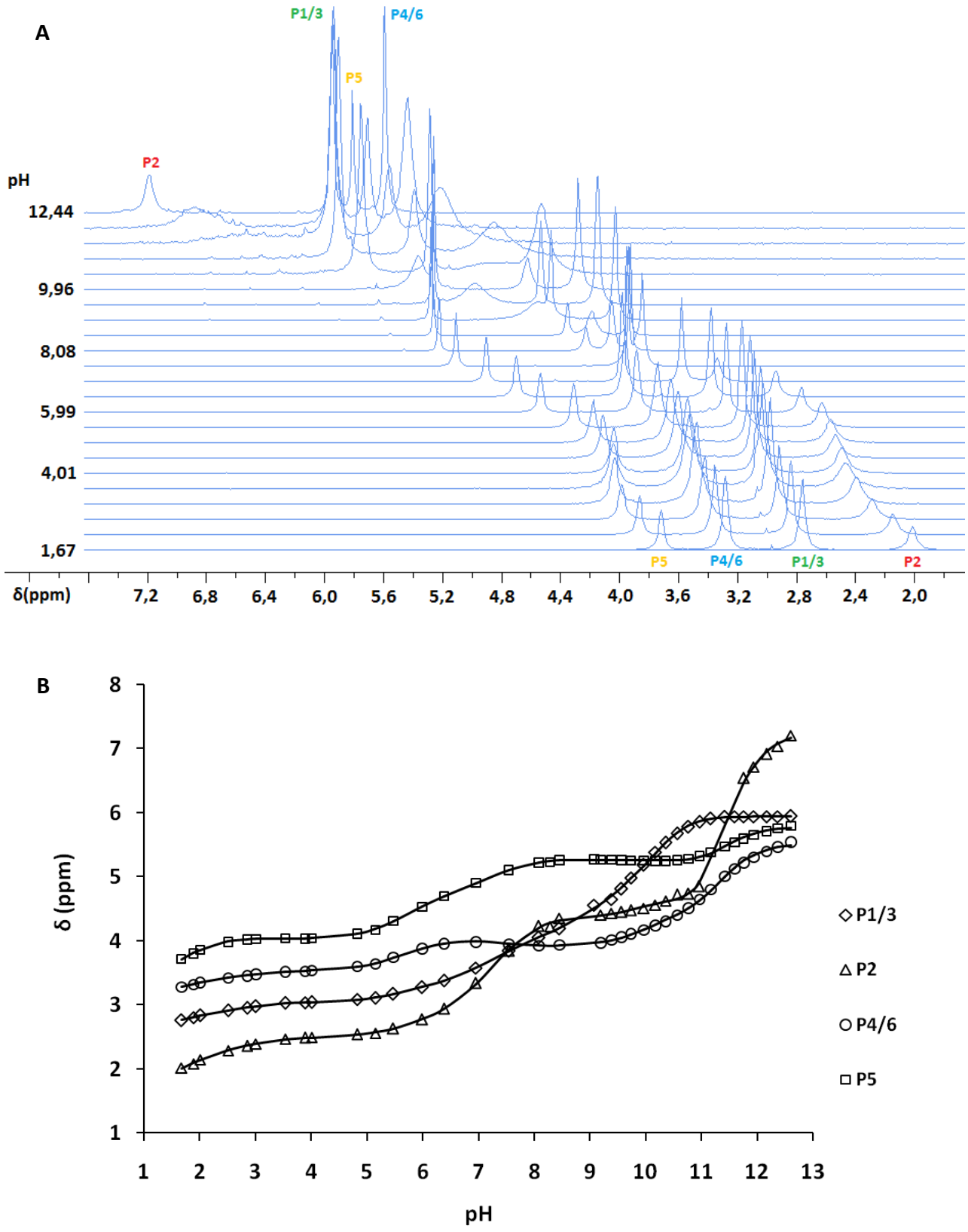


Figura 6.2. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-H^+ en función del pH, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 10,43 mM). (B) Ajuste de los valores de δ *vs.* pH. La curva continua corresponde al modelo teórico.

La asignación de las señales para el sistema InsP_6-H^+ en medio ácido se realizó en base a los trabajos ya publicados en el tema, los cuales coinciden en una distribución P5, P4/6, P1/3 y P2 de campos bajos a altos [5,9,11]. A diferencia de lo reportado en algunos casos [5,9], las señales se resolvieron bien en las condiciones de medida, lo que hizo posible una asignación de las mismas por seguimiento de la variación del desplazamiento químico en función de pH.

En medio básico, la asignación de las señales desde campos bajos a altos resultó: P2, P1/3, P4/6 y P5, similar a lo encontrado por otros investigadores [5,11]. Aunque estas bandas se mueven relativamente entre sí, el perfil integra siempre en un patrón 1:2:2:1, el que se mantiene en el rango de pH 1,5 - 12,5. Asimismo, no se observan mesetas claras en las curvas obtenidas al graficar el desplazamiento químico δ en función del pH. Esto permite establecer que las protonaciones se dan en equilibrios en donde varias especies del ligando en distinto grado de protonación coexisten en el sistema. Además, la protonación del ligando afecta a la vez a los grupos fosfato a ambos lados del plano especular, lo que permite que los grupos simétricamente equivalentes no pierdan la degeneración espectral. El ajuste matemático de las curvas de desplazamiento químico *vs.* pH para este sistema da como resultado el conjunto de constantes de protonación que se muestra en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Logaritmo de las constantes globales ajustadas para el sistema InsP_6-H^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Equilibrio	log K_{RMN} [a]	log $K_{UV\text{-}vis}$ [b]
$L^{12-} + H^+ \leftrightarrow HL^{11-}$	11,158(4)	12,1(3)
$L^{12-} + 2\ H^+ \leftrightarrow H_2L^{10-}$	22,30(8)	23,9(2)
$L^{12-} + 3\ H^+ \leftrightarrow H_3L^{9-}$	32,48(7)	34,51(4)
$L^{12-} + 4\ H^+ \leftrightarrow H_4L^{8-}$	41,44(8)	---
$L^{12-} + 5\ H^+ \leftrightarrow H_5L^{7-}$	48,70(7)	---
$L^{12-} + 6\ H^+ \leftrightarrow H_6L^{6-}$	54,40(7)	---
$L^{12-} + 7\ H^+ \leftrightarrow H_7L^{5-}$	57,32(8)	---
$L^{12-} + 8\ H^+ \leftrightarrow H_8L^{4-}$	58,98(6)	---

[a] Resultados espectroscópicos por RMN (σ = 0,022). [b] Resultados espectroscópicos UV-visible (σ = 1,32).

No se detectan con esta metodología experimental las especies H_9L^{3-}, $H_{10}L^{2-}$, $H_{11}L^{-}$ y $H_{12}L$, cuya acidez es significativa. Como era de preverse, el ligando se deprotona con el aumento del pH, siendo H_4L^{8-} y H_5L^{7-} las especies predominantes a pH fisiológico (figura 6.3). El conjunto de constantes propuestas explica satisfactoriamente el comportamiento de las señales en el RMN, como se aprecia en la figura 6.2B, lo que da cuenta de la bondad del modelo propuesto.

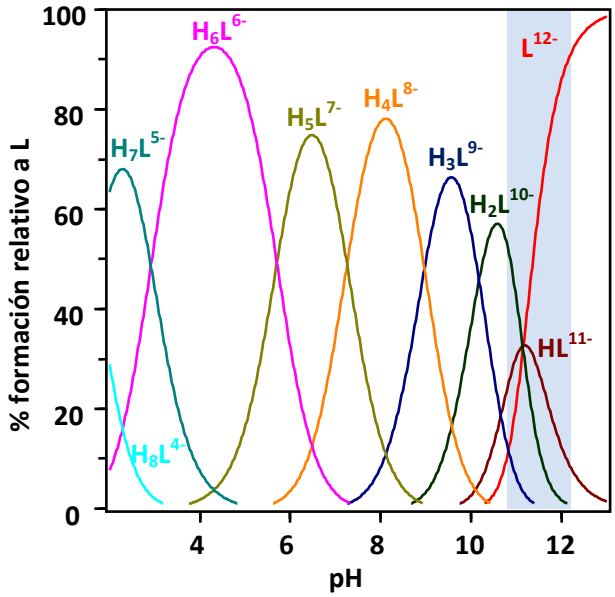


Figura 6.3. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-H^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C, a partir de experimentos de RMN. Se resalta la zona de cambio conformacional del ligando.

A través de este tratamiento de los datos de δ en función del pH es posible deconvolucionar los espectros de RMN, y obtener la contribución de cada especie protonada. En la tabla 6.2 se resumen los desplazamientos químicos individuales para las distintas formas del ligando, así como la variación de estos valores debido a los procesos sucesivos de protonación ($\Delta\delta_{prot}$). Los valores de $\Delta\delta_{prot}$ son el resultado de la protonación de los diversos grupos fosfatos en cada especie del ligando. Sin embargo, para cada una de estas especies, existen varias microespecies con distinto esquema de microprotonación. Considerando que aquellas microespecies más abundantes comparten esquemas de protonación relativamente similares, estos valores proveen de una herramienta

útil para analizar la secuencia de protonación de los diversos grupos mediante la ubicación más probable de los protones en cada especie del ligando.

Tabla 6.2. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ para el sistema InsP_6-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

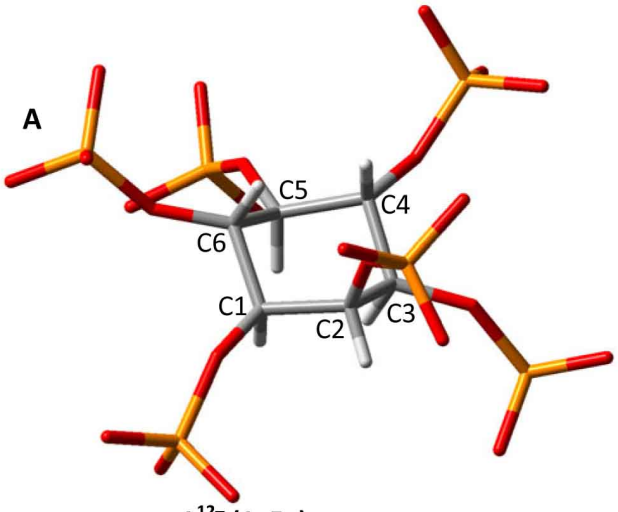
	Desplazamientos químicos individuales (ppm)				$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5	P1/3	P2	P4/6	P5
L^{12-}	5,952	7,304	5,536	5,794	---	---	---	---
HL^{11-}	5,866	3,610	4,339	5,027	-0,086	-3,694	-1,197	-0,768
H_2L^{10-}	6,027	4,885	4,551	5,298	0,161	1,275	0,212	0,271
H_3L^{9-}	4,743	4,363	3,968	5,248	-1,284	-0,522	-0,583	-0,049
H_4L^{8-}	4,074	4,395	3,908	5,293	-0,669	0,031	-0,060	0,045
H_5L^{7-}	3,357	2,834	4,055	4,762	-0,717	-1,561	0,148	-0,531
H_6L^{6-}	3,050	2,499	3,542	4,025	-0,307	-0,335	-0,513	-0,738
H_7L^{5-}	2,910	2,292	3,417	4,069	-0,140	-0,207	-0,125	0,044
H_8L^{4-}	2,597	1,698	3,133	3,336	-0,313	-0,594	-0,285	-0,733

Un análisis general de los valores de la tabla 6.2 muestra que la mayoría de los valores de $\Delta\delta_{prot}$ son negativos, dando cuenta del mencionado efecto de aumento del campo con la protonación de los grupos fosfato. De forma de asistir al análisis subsiguiente, en la figura 6.4 se muestran las geometrías optimizadas en fase gaseosa para ambos estados conformacionales de algunas de las especies del ligando. $\Delta\delta_{prot}$ para HL^{11-} es menor para los fosfatos sobre C2 y C4/6, por lo que es factible que el primer protón se ubique preferentemente en P2 y se comparta, mayoritariamente, con P4/6 (figuras 6.4B y J). El segundo protón genera, sorprendentemente, un aumento significativo en los valores de $\Delta\delta_{prot}$, en especial para P2. Este fenómeno, ya registrado para el fosfato en C4 del miembro Ins(1,4,5,6)P_4[15], ocurre porque los desplazamientos químicos individuales son el resultado de dos efectos contrapuestos: el pasaje de la conformación 5a1e a 1a5e y la protonación paralela de los grupos fosfatos. El primer proceso provoca un desblindaje de los fosfatos, tal vez porque la conformación 1a5e permite un mayor contacto entre estos grupos,

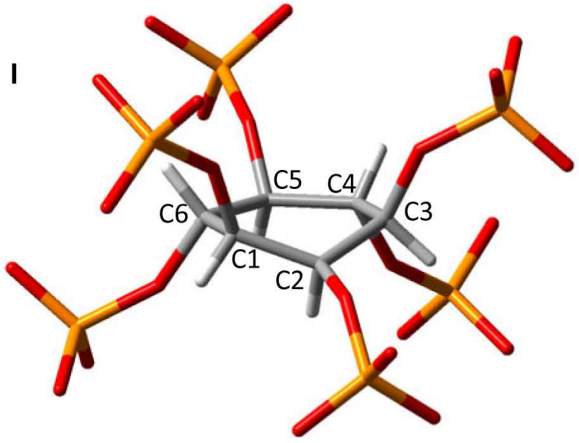
deslocalizando la carga negativa a través de todo el ligando. Por otro lado, como ya se ha mencionado, la unión y compartición de protones por parte de los grupos fosfato provoca el desplazamiento de las señales hacia campos altos. El efecto neto de estos procesos simultáneos resulta ser que, al pasar de la especie H_2L^{10-} a la HL^{11-}, todas las señales se mueven hacia mayores desplazamientos químicos. Dado que el $\Delta\delta_{prot}$ es una magnitud pequeña y similar para P1/3, P4/6 y P5, pero P2 se ve afectado sobremanera, es factible que este segundo protón se ubique entre P4/6 y P5, mientras que el primer protón, que pertenecía mayoritariamente a P2, ahora se comparta fuertemente entre P2 y P1/3 (ver figuras 6.4C y K).

Como se deduce de la disminución en los desplazamientos químicos, el tercer protón se une con preferencia a P1/3, el cual se comparte en gran medida con P2 o P4/6. Según se advierte de las figuras 6.4D y L, es posible que, en un equilibrio dinámico donde los hidrogeniones compartidos se intercambian entre los grupos ionizables, cada protón neutralice la carga de un par de fosfatos adyacentes. La cuarta protonación provoca un corrimiento de las señales que es más pronunciado para P1/3, y en menor medida P4/6. Este protón se asociaría a P1/3 de forma que este fosfato compartiría ahora dos protones con P4/6 y P2 simultáneamente y en distinto grado, como lo demuestran las figuras 6.4E y M. El $\Delta\delta_{prot}$ para P2 es apenas positivo, lo que estaría indicando que el protón sobre P1/3 que antes se compartía parcialmente con este fosfato en H_3L^{9-} ahora se aleja un poco de él, debido al acercamiento P1/3-P4/6 que provoca el protón entrante.

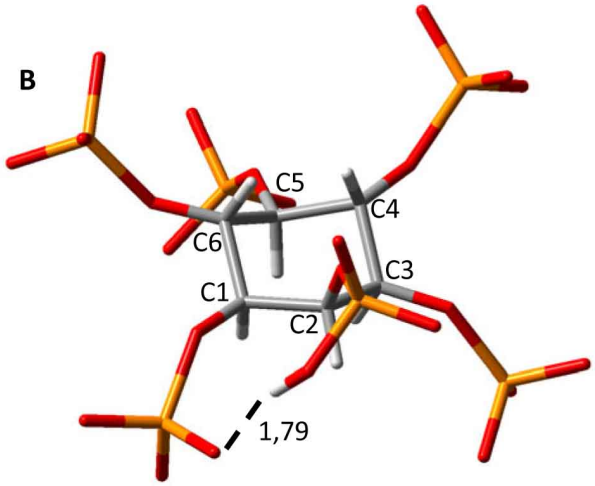
La especie H_5L^{7-} se genera con un $\Delta\delta_{prot}$ grande para P2, P1/3 y P5. En este caso, es factible entonces que el H^+ que ingresa lo haga directamente al fosfato en C1 o C3 que se encuentra deprotonado, el que se compartiría en cierta medida con P4/6, haciendo que el primero se aleje de P2 y el segundo de P5. Este último desplazamiento de los fosfatos haría posible un rearreglo de la estructura del ligando, causando que P2 retenga su protón original e incluso comparta otro con el fosfato en C1/3 diprotonado, disminuyendo apreciablemente el desplazamiento químico de la señal correspondiente. Por otra parte, P4/6 se asociaría con el fosfato en C1/3 que se acaba de protonar, alejándose un poco de P5, y por tanto explicando el valor negativo de $\Delta\delta_{prot}$ para este último.



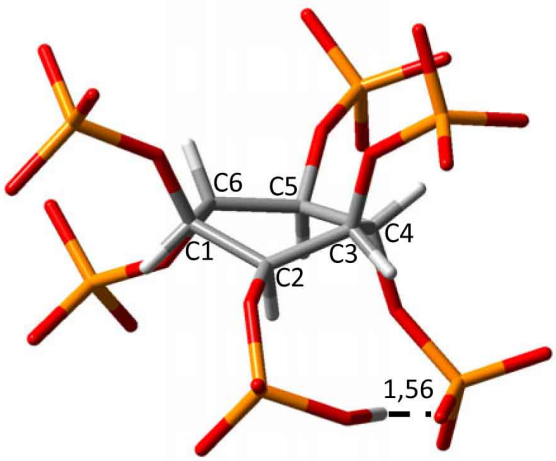
L^{12-} (1a5e)



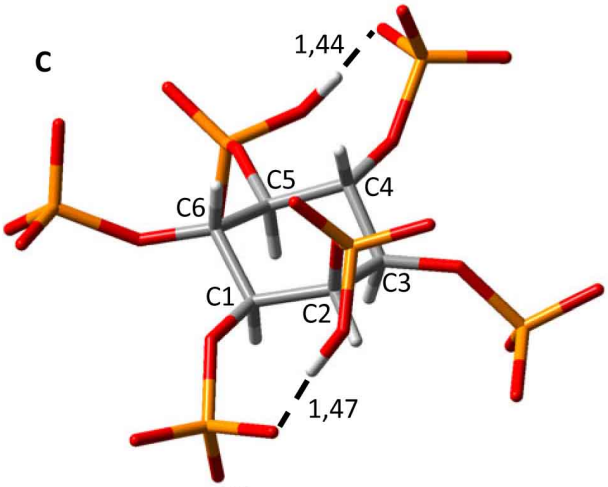
L^{12-} (5a1e)



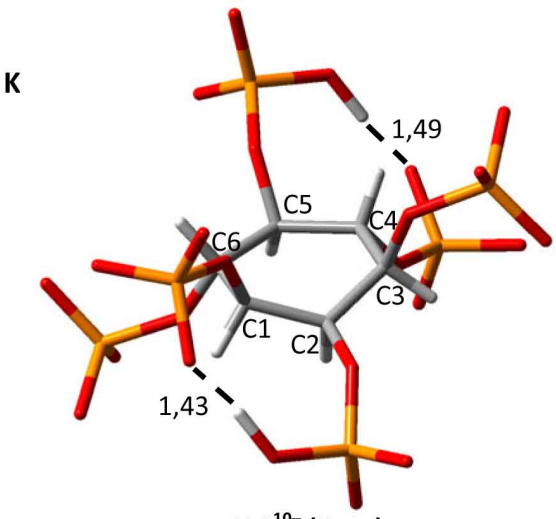
HL^{11-} (1a5e)



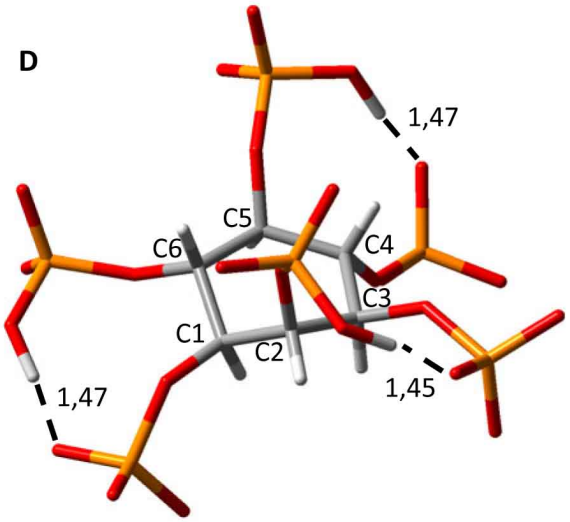
HL^{11-} (5a1e)



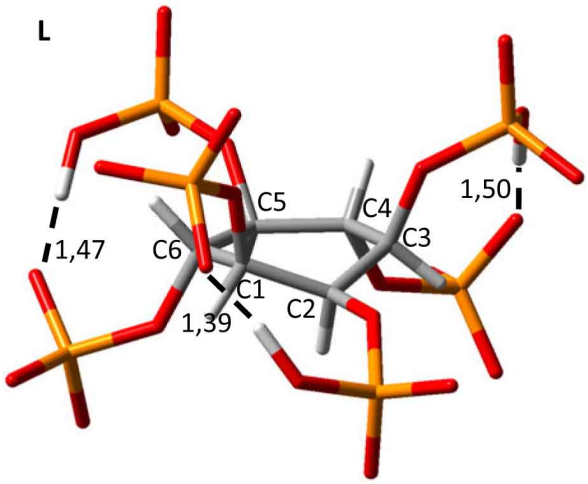
H_2L^{10-} (1a5e)



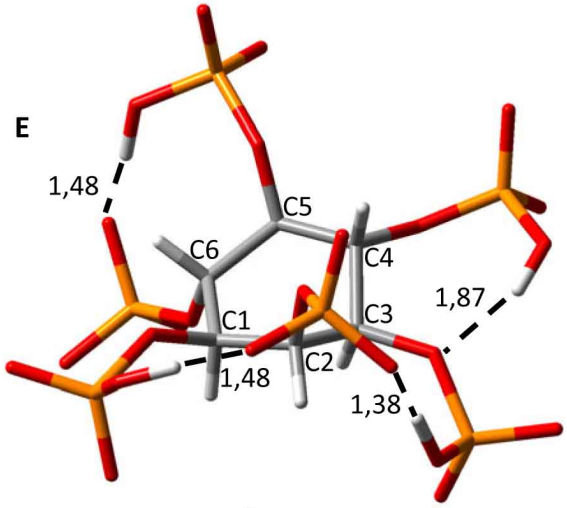
H_2L^{10-} (5a1e)



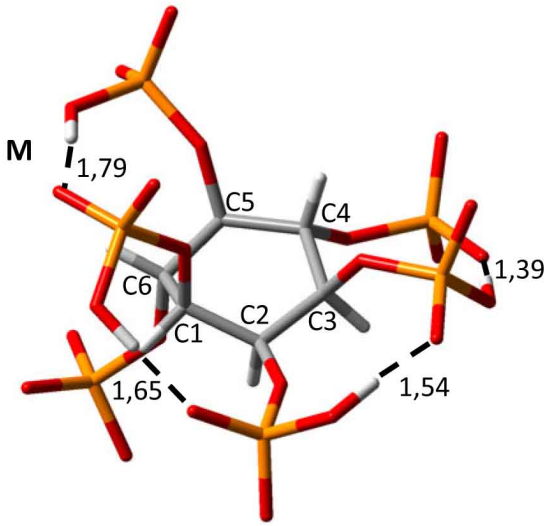
H_3L^{9-} (1a5e)



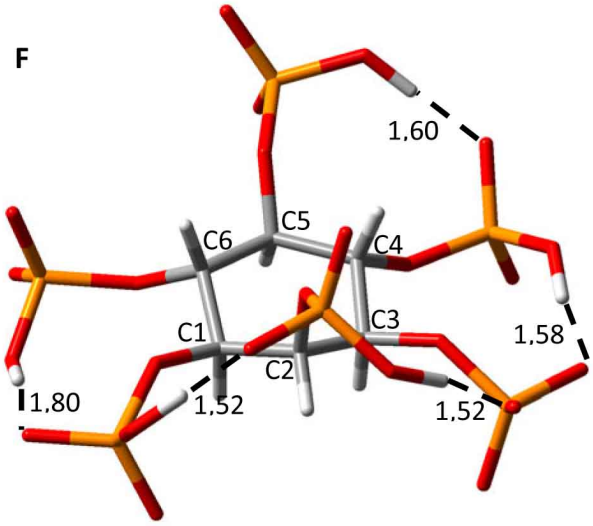
H_3L^{9-} (5a1e)



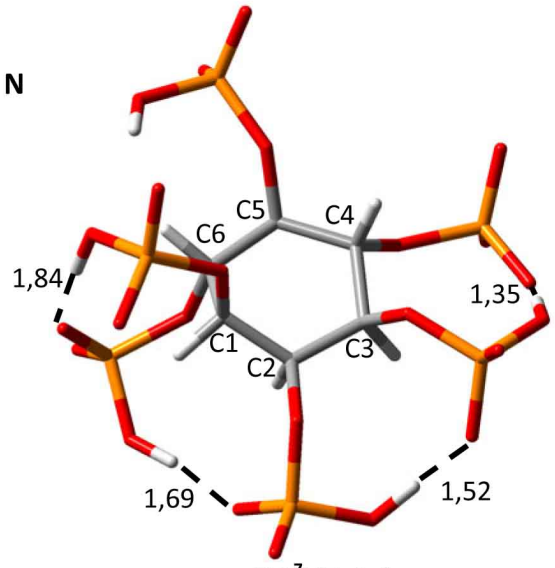
H_4L^{8-} (1a5e)



H_4L^{8-} (5a1e)



H_5L^{7-} (1a5e)



H_5L^{7-} (5a1e)

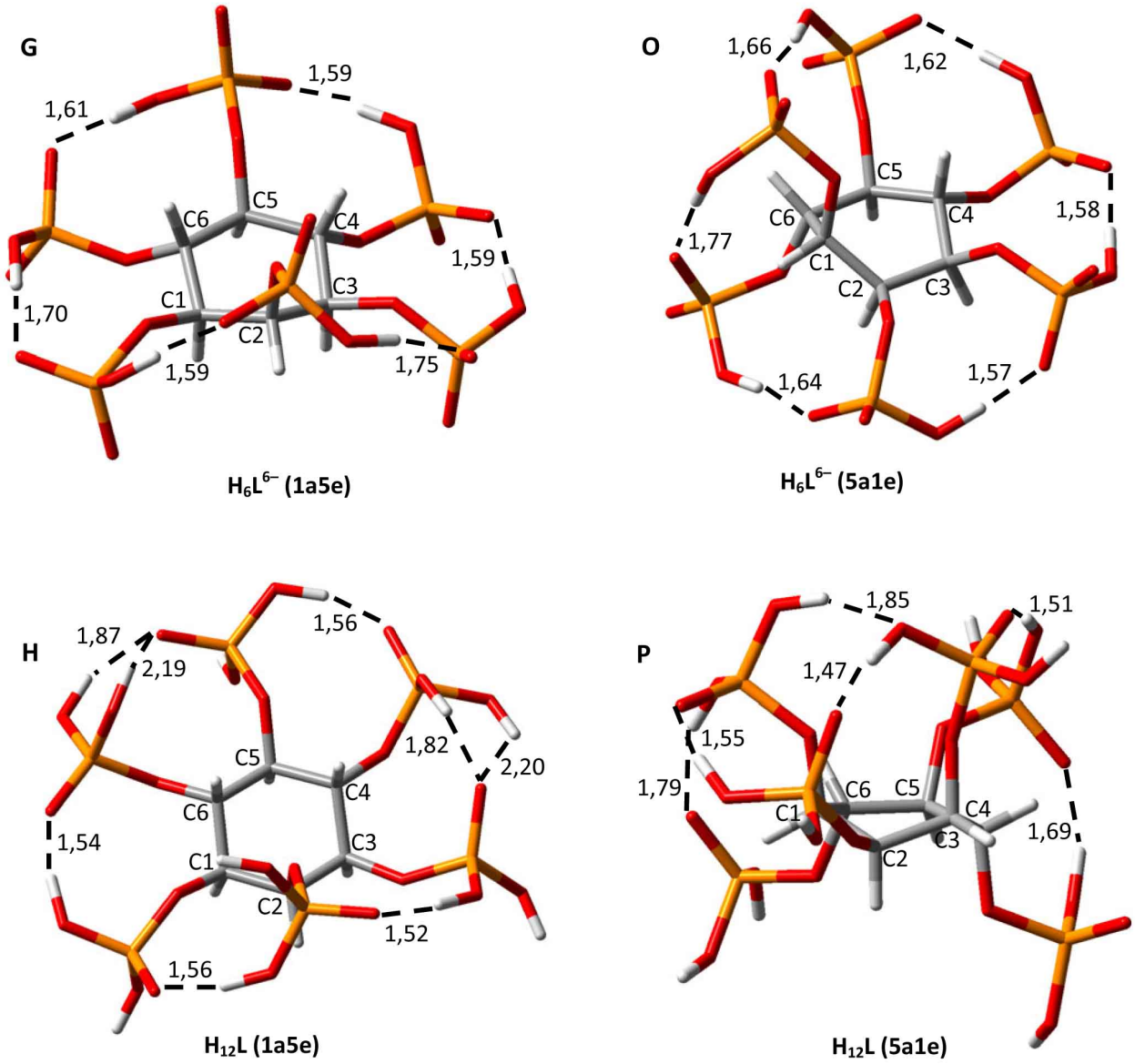


Figura 6.4. Geometrías RHF/3-21+G* optimizadas en fase gaseosa para ambos estados conformacionales de algunas de las especies protonadas del InsP_6. L^{12-}(A,I), HL^{11-}(B,J), H_2L^{10-}(C,K), H_3L^{9-}(D,L), H_4L^{8-}(E,M), H_5L^{7-}(F,N), H_6L^{6-}(G,O), $H_{12}L$(H,P). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas con la distancia correspondiente en Å.

Como era de esperarse, el sexto protón llenará el espacio del ligando que queda libre entre los fosfatos P5 y P4/6, haciendo que los valores de variación de los desplazamientos químicos sean más importantes para estos dos grupos. En concordancia, como se observa en las figuras 6.4G y O, los hidrogeniones en H_6L^{6-} se ubican entre cada par de grupos fosfato adyacentes.

El análisis de la ubicación de los dos protones siguientes a éstos es bastante complejo. Al no haber ningún espacio libre entre fosfatos, es posible que generen un rearreglo continuo y dinámico de los hidrogeniones sobre el ligando, afectando a todos los grupos ionizables. Por los valores de $\Delta\delta_{prot}$ es posible que, en términos generales, el primero de ellos se sitúe principalmente sobre P2, mientras que el siguiente lo haría, mayoritariamente, sobre P5.

3.1.2. Equilibrios de microprotonación

El análisis anterior es de tipo semicuantitativo, realizado a través del análisis de los valores de variación en el desplazamiento químico de las señales debidos a los equilibrios de protonación. Sin embargo, cada macroestado está caracterizado por un conjunto de microestados que coexisten en el sistema. Cada uno de ellos posee un esquema de protonación particular, en el cual se afectan de forma específica las señales correspondientes a ciertos grupos fosfato. Es este efecto, ponderado en las correspondientes abundancias de las microespecies de una macroespecie dada, el que explica cuantitativamente el comportamiento de las señales en función del pH. En esto se basa el método de "expansión de clúster" [24], cuya aplicación al sistema en estudio se detalla en el Anexo A. El único requerimiento de este método es que cada sitio se protone sólo una vez, por lo que se analizaron los datos experimentales por encima de pH = 4, donde predominan las especies entre H_6L^{6-} y L^{12-}. Este estudio arroja los resultados que se detallan en la figura 6.5. Entre paréntesis se aclara para cada microespecie $H_nL^{(12-n)-}$ la posición de los grupos fosfato protonados, donde el uso de una barra inclinada separa los enantiómeros correspondientes.

En el caso particular del InsP_6, la primera protonación está restringida casi exclusivamente al fosfato en posición 2. Los resultados revelan un mayor valor del opuesto del logaritmo de la constante de microdeprotonación ($\boldsymbol{p\widehat{K}}$) para este grupo y el microestado correspondiente posee una probabilidad de ocurrencia muy cercana al 100 % (ver Anexo A). El segundo protón que ingresa se ubica mayoritariamente en posición 5 (H_2L^{10-}(25), 47 %), como era de esperar dado los valores de logaritmo de las constantes de deprotonación individuales en la especie HL^{11-}(2). Sin embargo, de forma interesante, aparece en el diagrama de especiación otro microestado también predominante, H_2L^{10-} (46), el cual no es previsible a partir de la información obtenida para los

microestados monoprotonados (n = 1). Esta variación en la tendencia esperada puede ser racionalizada en base al corrimiento "anómalo" que sufren las señales en los espectros de RMN como consecuencia del cambio conformacional experimentado por el ligando. De hecho, como será discutido más adelante en esta tesis, la disposición 4/6 que aparece como microestado mayoritario en el caso del Ins(1,3,4,5,6)P_5 estabiliza la conformación 1a5e. Estos resultados serían concordantes, por tanto, con un cambio conformacional 5a1e - 1a5e entre las especies HL^{11-} y H_2L^{10-}.

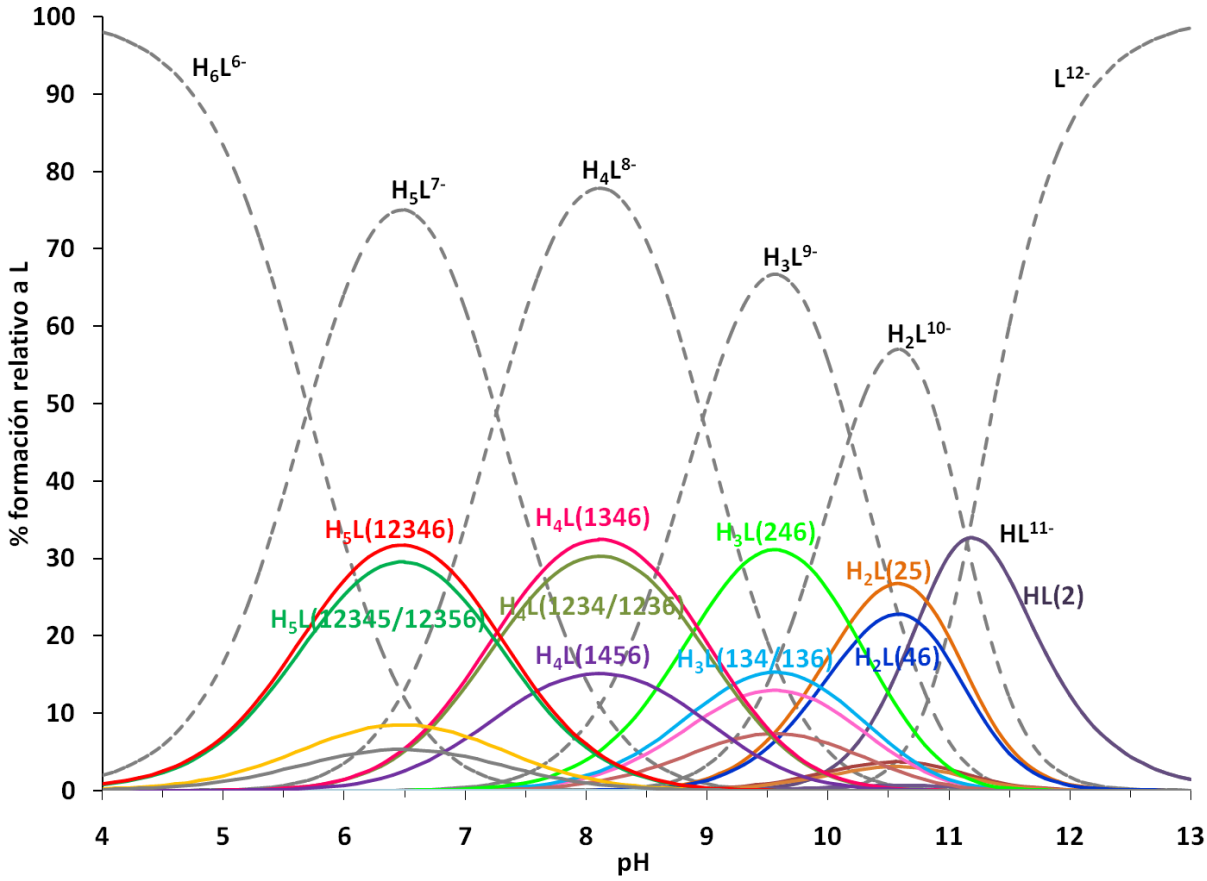


Figura 6.5. Diagrama de distribución de macro y microespecies del sistema InsP_6-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Se omiten las cargas de las microespecies por claridad.

En base a este panorama relativamente complejo de los microestados con n = 2, no es sorprendente que el siguiente protón provoque un rearreglo del esquema de protonación. Los microestados mayoritarios (H_3L^{9-}(246) y H_3L^{9-}(134/136)) marcan una distribución extendida de los protones a lo largo del anillo, aliviando la repulsión existente entre los grupos fosfatos. La protonación

subsiguiente de estas especies da lugar, en total, al establecimiento de dos microestados mayoritarios con n = 4, H_4L^{8-}(1234/1236) y H_4L^{8-}(1346), y dos con n = 5, H_5L^{7-}(12345/12356) y H_5L^{7-}(12346). En base a esto, parece claro que el último sitio en protonarse para formar la especie H_6L^{6-} es el delimitado por los fosfatos en C5 y C4/C6, en línea con lo discutido en base a los valores de $\Delta\delta_{prot}$ y los resultados del modelado molecular de la especie correspondiente (figura 6.4G y O).

De acuerdo con lo analizado hasta el momento, el cambio conformacional que se espera opere sobre el ligando se dispara con su segunda protonación. Como se advierte en la figura 6.2A, este proceso se manifiesta a través del ensanchamiento y el movimiento rápido de algunas de las bandas, sobre todo la correspondiente a P2. En estas condiciones, el proceso comienza un poco antes de pH = 11 y hasta 12, donde efectivamente, según el diagrama de distribución de especies, se produce la transformación H_2L^{10-} - HL^{11-} (ver figura 6.3B). Este análisis amplía y apoya con información cuantitativa alguno de los resultados reportados en bibliografía [5].

3.1.3. Determinantes estructurales del cambio conformacional

En la figura 6.6A se muestra la diferencia energética entre ambos estados conformacionales (ΔE = E(5a1e) – E(1a5e)) para las estructuras de la figura 6.4. Los valores obtenidos en ausencia de solvente (barra fucsia) marcan una clara predilección del estado 5a1e para las especies menos protonadas del ligando: L^{12-}, HL^{11-} y H_2L^{10-}. En contraposición, para aquellas especies con un grado de protonación intermedio y alto, desde H_3L^{9-} a $H_{12}L$, se estabiliza la forma en la cual cinco de los seis fosfatos son ecuatoriales.

El origen de esta tendencia, la cual se observa de forma continua y progresiva entre L^{12-} y $H_{12}L$, puede racionalizarse en base a un análisis detallado de las geometrías de la figura 6.4. Éstas pueden considerarse como estructuras representativas de las formas del ligando en fase gaseosa y, dado que concuerdan satisfactoriamente con los datos experimentales de RMN, de las encontradas en la dinámica de la solución. Existen, en apariencia, tres factores determinantes, cuyo peso relativo modula las estabilidades de los distintos confórmeros en fase gaseosa.

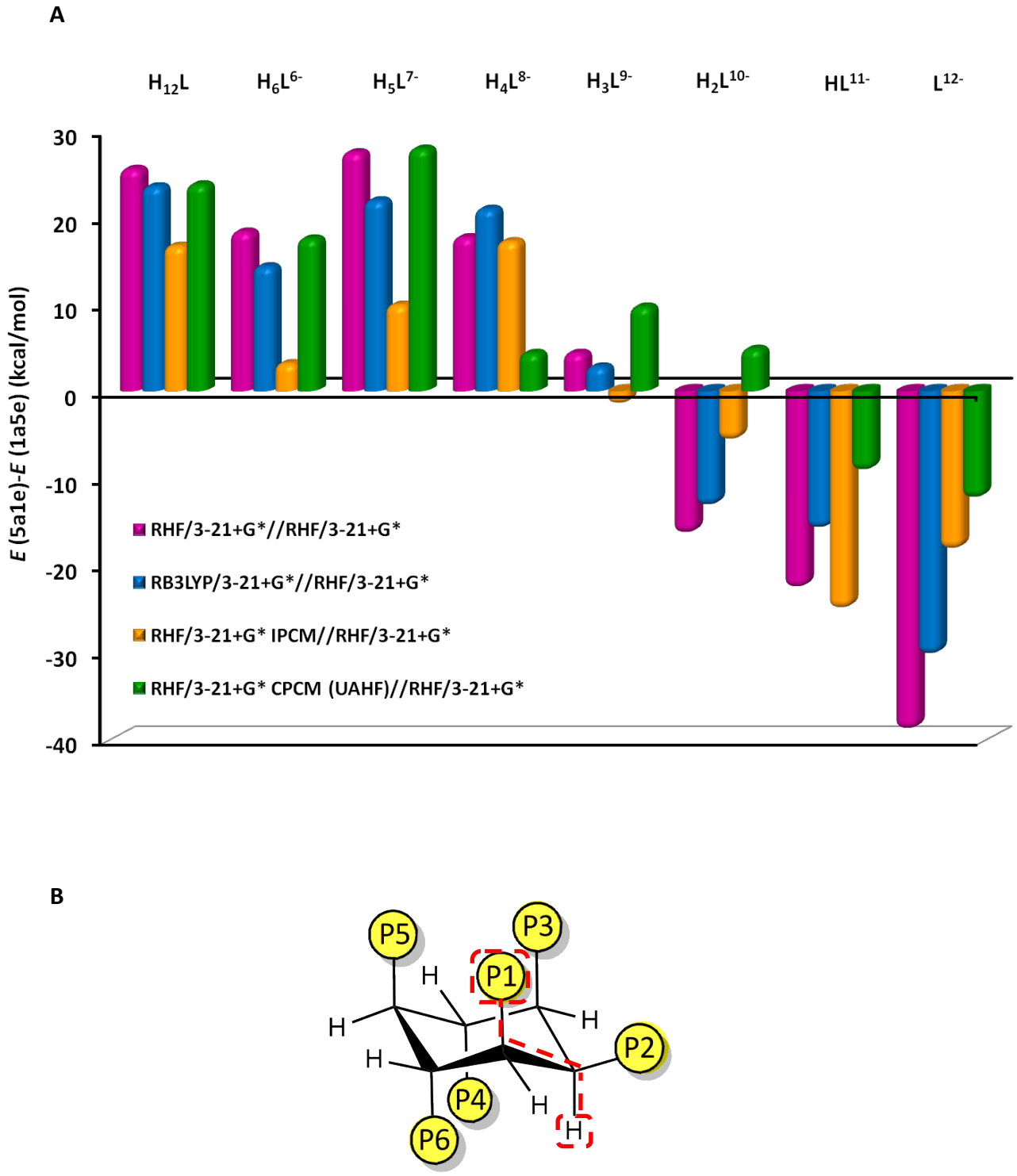


Figura 6.6. (A) Diferencia de energía entre las geometrías optimizadas en fase gaseosa de ambos estados conformacionales para algunas de las especies protonadas del InsP_6. Se muestran además los valores obtenidos para el mismo indicador utilizando otros métodos, mediante cálculos puntuales de energía sobre estas geometrías. (B) Uno de los seis ángulos diedros entre grupos axiales de carbonos adyacentes de la molécula de fitato.

En primer lugar, el establecimiento de fuertes enlaces de hidrógeno, cuya influencia se incrementa con el número y disminuye con la distancia de los mismos. Segundo, la gran repulsión electrostática que sufren los grupos ionizables a través del espacio. Este fenómeno es menos marcado a medida que los mismos se protonan y por tanto disminuye su carga. Por último, es necesario sopesar la influencia de un factor que hasta el momento no ha aparecido en los análisis realizados por otros autores: la tensión generada sobre la distancia y los ángulos de enlace del anillo de inositol, producto de la acción de los dos factores anteriores.

Con el objetivo de facilitar la discusión, se definen algunos indicadores de forma de cuantificar estos determinantes. $X_{O\text{-}H}$ representa la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en Å. Por su parte, $X_{P\text{-}P}$, corresponde a la distancia media, en Å, entre los átomos de fósforo de los grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes sobre el esqueleto de inositol. Finalmente, la tensión y deformación del anillo carbonado se estima por el parámetro $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$, el cual es calculado como la desviación promedio en grados, desde el valor esperado de 180°, de los seis ángulos diedros formados por los grupos axiales de carbonos adyacentes (figura 6.6B). Se resumen en la tabla 6.3 los valores de estos tres indicadores estructurales para las especies consideradas en el estudio, además del número de enlaces de hidrógeno establecidos en cada caso.

Como era previsible, para ambos confórmeros los enlaces de hidrógeno se hacen progresivamente más numerosos a medida que se van agregando protones al fitato, aunque, en apariencia, el estado 1a5e parece ser levemente más efectivo para establecer un número mayor de enlaces, en especial para especies más protonadas. Sin embargo, la distancia de estos enlaces es muy similar en ambas conformaciones, por lo que este determinante no explica la tendencia observada en las energías moleculares de la figura 6.6A.

La separación entre los grupos fosfato adyacentes es sistemáticamente mayor para el confórmero 5a1e. Esto le proporciona una ventaja frente a la análoga ecuatorial, debido, fundamentalmente, al alivio de la repulsión electrostática y estérica por alejamiento de los grupos ionizables. Este fenómeno es más acentuado para las especies con menor grado de protonación, L^{12-}, HL^{11-} y H_2L^{10-}, y el ligando adopta el estado 5a1e a pH por encima de 11. Paralelamente, a

medida que el fitato se protona, la carga de los grupos aniónicos disminuye, aplacando considerablemente la influencia del fenómeno anterior. Es aquí donde entra en juego el tercer factor considerado, la tensión sufrida por el anillo, la cual es, en la mayoría de los casos, bastante mayor para el estado 5a1e (ver $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ en tabla 6.3). Según la figura 6.4, para poder sustentar el establecimiento de enlaces de hidrógeno tan fuertes como los formados por el estado 1a5e, este confórmero debe abatir varios de sus grupos fosfato desde una posición esencialmente axial a una intermedia axial-ecuatorial, con un costo energético bastante importante debido a la tensión estructural ejercida sobre los enlaces covalentes. En este sentido, es energéticamente más favorable para el ligando optar, en fase gaseosa, por el estado ecuatorial desde H_3L^{10-} hasta $H_{12}L$, en donde se minimiza la alteración estructural necesaria para una efectiva generación de fuertes enlaces de H intramoleculares.

Tabla 6.3. Parámetros estructurales de algunas de las especies del sistema InsP_6-H^+ (geometrías RHF/3-21+G*).

	$X_{O\text{-}H}$ (Å)[a]		N° enlaces de H		$X_{P\text{-}P}$ (Å)[b]		$\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ (°)[c]	
Especies	1a5e	5a1e	1a5e	5a1e	1a5e	5a1e	1a5e	5a1e
L^{12-}	---	---	0	0	5,47	5,73	22	41
HL^{11-}	1,79	1,56	1	1	5,55	5,74	25	38
H_2L^{10-}	1,46	1,46	2	2	5,07	5,36	12	40
H_3L^{9-}	1,46	1,45	3	3	5,06	5,27	27	51
H_4L^{8-}	1,55	1,60	4	4	4,98	5,28	34	32
H_5L^{7-}	1,60	1,60	5	4	4,64	5,18	18	38
H_6L^{6-}	1,64	1,64	6	6	4,56	4,92	21	49
$H_{12}L$	1,78	1,64	8	6	4,17	4,92	7	20

[a] $X_{O\text{-}H}$ representa la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en Å. [b] $X_{P\text{-}P}$ corresponde a la distancia promedio, en Å, entre los átomos de fósforo de los grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes. [c] $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ es la desviación promedio, desde el valor esperado de 180°, de todos los ángulos diedros formados por los grupos axiales de carbonos adyacentes en °.

La especie H_4L^{8-} merece un comentario aparte. A diferencia de lo que ocurre con la especie H_3L^{9-}, donde los protones neutralizan la carga negativa de a

pares de grupos fosfatos de forma alternada, la inclusión de un cuarto protón implica que al menos dos de estos grupos deben ahora compartir dos H^+ con sus análogos adyacentes. Este requerimiento estructural parece no ser sencillo de satisfacer, ya que los grupos fosfatos, todavía muy cargados, se repelen significativamente entre sí. En este sentido, ambas conformaciones sufren una tensión estructural similar, aunque la variante 1a5e proporciona una disposición espacial de los grupos ionizables que da lugar a enlaces de hidrógeno intramoleculares más cortos.

Dado que en su mayoría las especies consideradas son altamente cargadas, se estimaron los valores de Δ*E* teniendo en cuenta la energía de correlación electrónica, a través del cómputo de la energía molecular DFT de las geometrías de la figura 6.4. Los resultados, mostrados en la figura 6.6A (barra azul), evidencian que la contribución de este factor es, en general, más importante para aquellas especies que poseen alta carga, es decir, gran cantidad de electrones. En cualquier caso, los valores de Δ*E* obtenidos son similares y muestran la misma tendencia que los calculados por el método de Hartree-Fock, posiblemente porque la diferencia asociada a este parámetro (*E*(5a1e) – *E*(1a5e)) cancela los efectos correspondientes.

Para finalizar el análisis de esta sección, es necesario evaluar la contribución del solvente a las estabilidades de las diversas especies. Los valores de Δ*E* en agua, determinados por los métodos CPCM e IPCM, se resumen en la figura 6.6A (barras en verde y naranja respectivamente). En ambos, se simula el proceso de hidratación de las moléculas colocándolas en presencia de un dieléctrico de constante dieléctrica similar a la del agua, como se muestra para ambos confórmeros de la especie L^{12-} en la figura 6.7. Para todos los sistemas, existen dos aspectos que influyen de forma contrapuesta en el valor obtenido de Δ*E* en solución respecto del correspondiente en fase gaseosa. Primero, desde un punto de vista estrictamente termodinámico, es menos costoso energéticamente acercar los grupos fosfatos entre sí en presencia de un dieléctrico, lo que favorece el cambio 5a1e → 1a5e en solución. Segundo, de acuerdo con la figura 6.7, el dieléctrico es levemente excluido del espacio interfosfato en el estado 1a5e, debido a que los fosfatos se encuentran más cerca entre sí. Este factor provocaría una disminución en el Δ*G* del proceso

5a1e → 1a5e, contrarrestando, en cierta medida, el efecto del primer determinante.

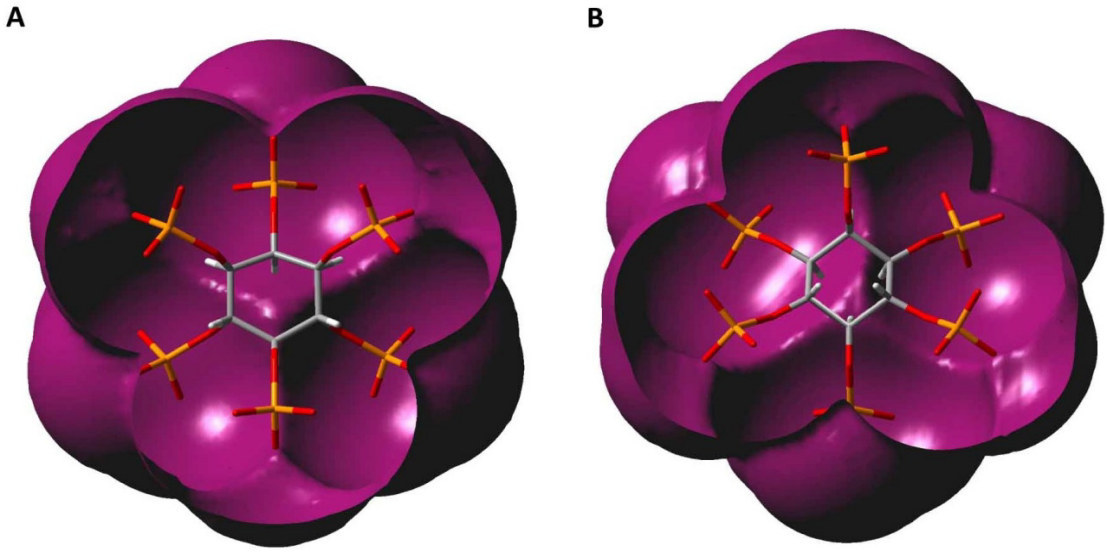


Figura 6.7. Especie L^{12-} dentro de la cavidad del solvente IPCM para la conformación 5a1e (A) y 1a5e (B) (valor de isodensidad = 1 x 10^{-5} electrones/$bohr^3$).

De esta forma, los valores de Δ*E* en solución difieren de los análogos en fase gaseosa. En todo caso, las conclusiones derivadas de los resultados de ambos métodos son muy similares a las discutidas en fase gaseosa; existe un cambio conformacional operativo entre las especies con mayor y menor grado de protonación. Sin embargo, la hidratación de las especies parece ser un determinante crítico en el establecimiento del rango de pH de transición conformacional. A diferencia de lo que ocurría en fase gaseosa, donde la transición era dada por el cambio H_3L^{9-} - H_2L^{10-}, la interacción de las especies con el solvente estabiliza la forma 1a5e del H_2L^{10-}, restringiendo este proceso a la segunda protonación del fitato. Este resultado está en franco acuerdo con lo derivado en las secciones anteriores a partir del análisis de los datos espectroscópicos por RMN de ^{31}P.

3.1.4. Estudio espectroscópico UV-visible del proceso de protonación

Hasta el momento, no existe en la bibliografía especializada caracterización alguna sobre las propiedades espectroscópicas del fitato en el rango UV-visible

y su variación con los procesos de protonación. En general, este tipo de estudios encuentra obstáculo en la prácticamente nula absorción de esta molécula en la mayoría del rango espectral mencionado. En este trabajo, haciendo uso de las facilidades de variación del camino óptico y ancho de rendija, se optimizaron las condiciones para un análisis espectroscópico satisfactorio del comportamiento ácido-base del ligando.

En la figura 6.8 se detallan los espectros UV-visible registrados para una solución 10,1 mM de InsP_6 en función del pH, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. El ligando presenta, fundamentalmente, dos tipos de bandas en el rango de estudio. Una muy intensa, por debajo de 230 nm, cuya variación con el pH es bastante importante (figura 6.8A). En segundo lugar, existe una banda de muy baja absortividad, por encima de 230 nm, la cual se extiende hasta el inicio del rango visible del espectro. La absorción del fitato en este caso es tan baja, que incluso utilizando un camino óptico de 1 cm los espectros registrados poseen un nivel de ruido espectral importante, como se advierte de la figura 6.8B. Para ambas bandas, un aumento del pH provoca un incremento en la absorbancia registrada; dada la mayor variación para la primera de ellas, esta fue seleccionada para cálculo de las constantes de protonación del ligando. El ajuste de las curvas de la figura 6.8A sólo se puede realizar sobre las formas del ligando que presentan una absorción sustancial en el rango de longitud de onda de estudio, es decir, aquellas que son responsables del aumento observado en la absorbancia con el pH. En este caso, de todos los modelos analizados, se obtiene convergencia si se considera que L^{12-}, HL^{11-}, H_2L^{10-} y H_3L^{9-} absorben en estas condiciones. Los resultados se muestran en la tabla 6.1.

Un resultado adicional del ajuste anterior son los espectros individuales para las especies L^{12-}, HL^{11-}, H_2L^{10-} y H_3L^{9-} (figura 6.9). Al protonarse, el ligando deja de absorber progresivamente en el rango de longitudes de onda estudiado y las bandas se desplazan hacia longitudes de onda menores. En efecto, a partir de H_4L^{8-}, ya no se registran bandas significativamente absortivas por encima de 200 nm. El ruido en el espectro de la especie totalmente deprotonada se debe a que el ajuste se realizó hasta pH = 11,68, condiciones en las cuales la misma se está apenas formando, según las figuras 6.3A y B. Esto provoca que el espectro individual calculado presente cierto error y la banda que se extiende más allá de 230 nm se encuentre, probablemente, sobreestimada.

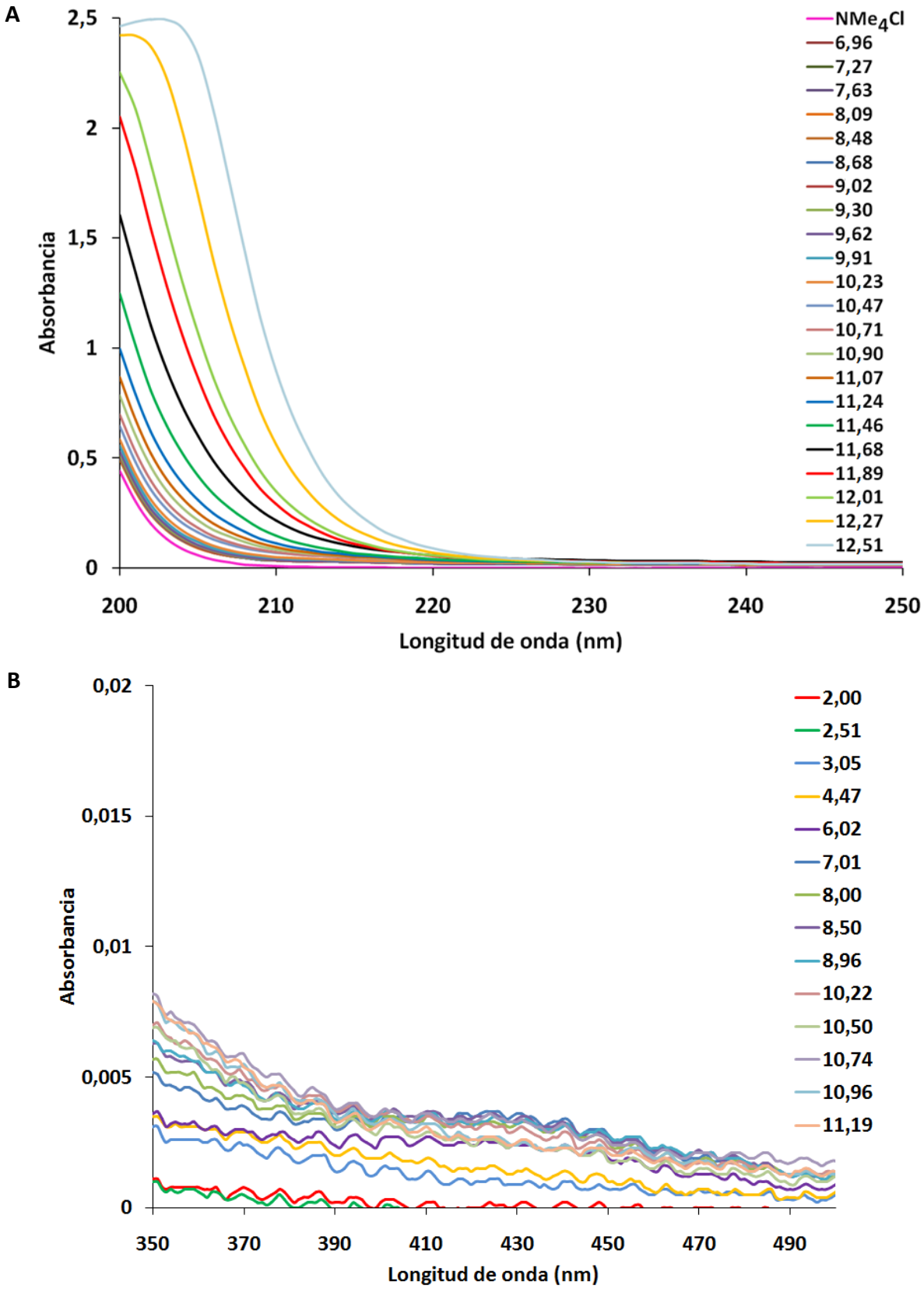


Figura 6.8. Espectros UV-visible de una solución 10,1 mM de InsP_6 en función del pH para camino óptico 0,1 cm (A) y 1 cm (B), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Se detallan a la derecha el espectro correspondiente al NMe_4Cl y los valores de pH ajustados en cada caso. En (A) la referencia utilizada fue agua, mientras que en (B) fue NMe_4Cl 0,15 M.

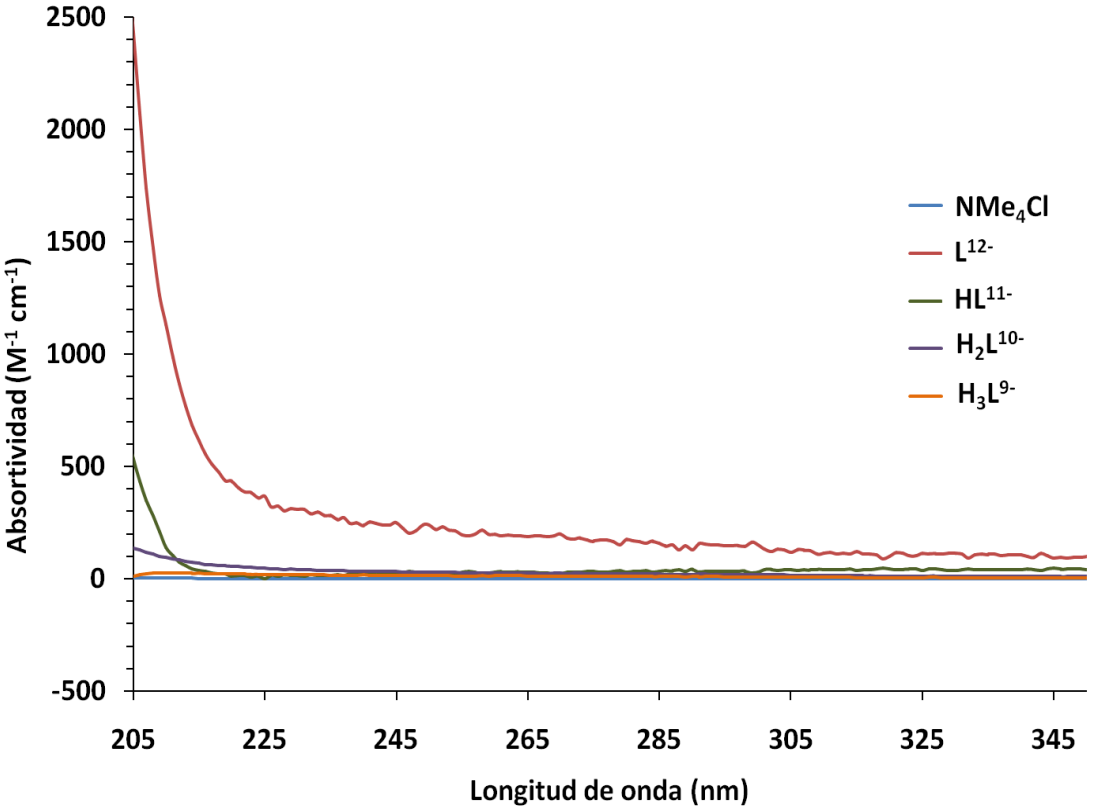


Figura 6.9. Espectros UV-visible individuales ajustados para el NMe_4Cl y las especies del ligando.

De manera de complementar el análisis anterior y asistir a la racionalización de los orígenes de cada banda, y por tanto de su variación con el estado de protonación del fitato, en la figura 6.10 se muestran los resultados del cálculo del espectro electrónico teórico del ligando, en fase gaseosa, con el método RCIS/3-21+G*//RHF/3-21+G* sobre algunas de las geometrías de la figura 6.4.

Dada las aproximaciones del método de cálculo utilizado y la interacción con el solvente, nada despreciable, que exhiben las diversas formas del fitato, los espectros se encuentran desplazados, aproximadamente, 100 nm de aquellos experimentales de la figura 6.9. Esta diferencia entre valores calculados y experimentales se encuentra dentro del margen previsible. En particular, para el etileno, un sistema bastante más sencillo y con menor interacción con el solvente, el error encontrado con una base de funciones incluso mayor a la que se aplica aquí asciende hasta los 50 nm[27]. Asimismo, el trabajo con este método y bases del tipo LANL2DZ sobre sistemas altamente cargados de homopolicationes de bismuto, estudiados en mezclas de sales fundidas, arrojó resultados que se apartan incluso más de 150 nm del valor observado[28].

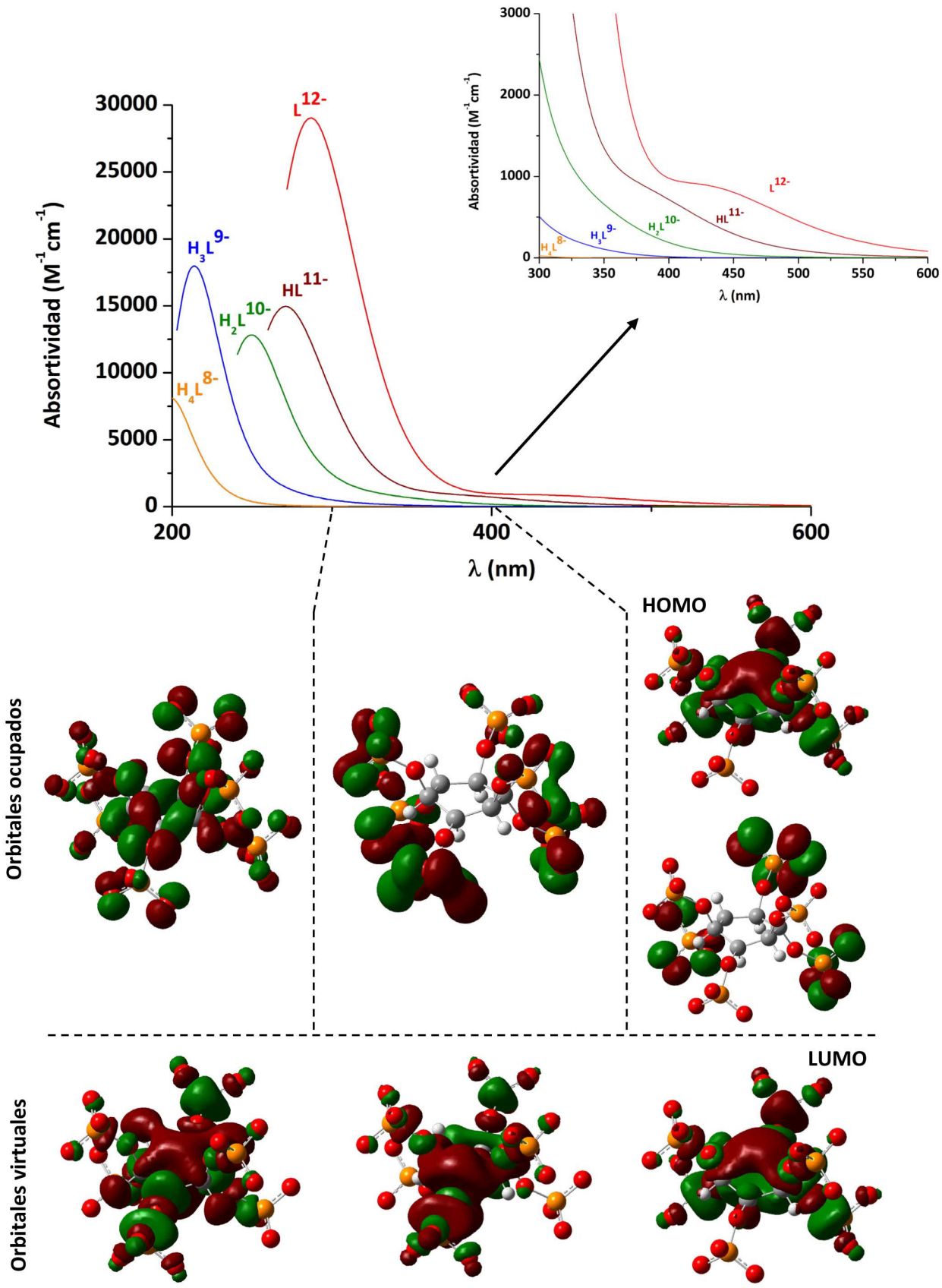


Figura 6.10. Espectros electrónicos calculados para algunas de las especies del fitato (RCIS/3-21+G*//RHF/3-21+G*, ancho de banda a la mitad de la altura de pico = 0,4 eV). Los orbitales moleculares ocupados y virtuales del L^{12-} asociados a cada banda se muestran debajo.

La forma general de los espectros se encuentra de acuerdo con los ajustados a nivel experimental (figura 6.9). Consta de dos bandas claramente diferenciadas; una de muy baja intensidad que se extiende por encima de los ≈ 300 nm (400 nm en el espectro calculado) y una segunda, extremadamente absortiva, que se encuentra por debajo de este rango. De la misma forma que se discutió para las figuras 6.8A y B, los espectros teóricos están de acuerdo con que la protonación de ligando provoca la disminución sistemática de la absorbancia medida en ambas bandas y un desplazamiento de las mismas hacia menores longitudes de onda.

En la figura 6.10 se detallan, asimismo, algunos de los orbitales de L^{12-} representativos asociados a ambas bandas. En todos los casos, los niveles de mayor energía hacia donde se transfieren los electrones corresponden a orbitales centrados, esencialmente, en el anillo de inositol. Dado que el primer protón influye mayoritariamente sobre la posición de los grupos fosfatos, mientras que el anillo se ve apenas afectado (ver valores de $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ en tabla 6.3), estos orbitales serán trastocados esencialmente a partir de la especie H_2L^{10-}.

Las transiciones que dan lugar a la "cola" muy poco absortiva del espectro se relacionan, independientemente, con orbitales de partida asociados esencialmente al anillo de inositol y a los orbitales atómicos *p* de los oxígenos de los grupos fosfatos. Cuando el primer protón se une al anión L^{12-}, las transiciones más afectadas serán las relacionadas con los grupos fosfato, mientras que las correspondientes al anillo experimentarán una alteración menor, por lo que la banda se desplaza hacia longitudes de onda menores sin pérdida total de la absortividad calculada. Por el contrario, a partir del segundo protón, el que gatilla incluso el cambio conformacional del ligando, el espectro pierde casi totalmente esta banda, la cual se funde probablemente con la más intensa. Por su parte, la banda por debajo de 400 nm, posiblemente relacionada con la encontrada por debajo de 300 nm en los espectros experimentales, está originada, exclusivamente, en transiciones electrónicas desde orbitales asociados a los grupos fosfato. En este sentido, ya desde el primer protón que ingresa al ligando esta banda se ve afectada sobremanera, y este efecto se prolonga de forma sistemática con cada hidrogenión adicional. Ésta parece ser entonces la causa de la enorme variación existente en los

perfiles espectroscópicos a medida que el pH aumenta desde medio neutro a básico (figura 6.8A), fenómeno que permitió el ajuste de las constantes de protonación para aquellas especies que retienen propiedades de absorción incluso a 200 nm (≈ 300 nm en la figura 6.10). Por debajo de este punto, las transiciones electrónicas calculadas están, en su mayoría, relacionadas a orbitales de partida internos y deslocalizados en toda la molécula. Su alteración es importante desde el primer proceso de protonación, aunque dado que son altamente energéticas, quedan seguramente por debajo del rango de longitudes de onda analizado en este trabajo.

3.2. Sistema InsP_6-Na^+

3.2.1. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

Los espectros de RMN de ^{31}P para este sistema se detallan en la figura 6.11A. Dada la alta resolución de los mismos, la asignación de las señales se realizó por simple inspección partiendo de medio ácido, donde se verifican desplazamientos químicos muy similares al ligando, y siguiendo los valores de δ de las mismas en su desplazamiento con el pH.

Nuevamente, la protonación de las diversas especies provoca un corrimiento de las señales hacia campos altos. Se registran cuatro picos claramente diferenciados, por lo que la presencia del metal no destruye la simetría del fitato. Esto es posible si tanto la protonación como la complejación ocurren de forma indistinta sobre ambas mitades simétricamente equivalentes del ligando. Si se examinan detalladamente las curvas de δ en función del pH, tanto en presencia como en ausencia del ion sodio (figura 6.11B), se observa un leve desplazamiento de todas las señales hacia campos bajos a pH menor a 5. Dado que el ion metálico se encuentra en franco exceso respecto del inositol fosfato ([L] = 5,02 mM, [Na^+] = 152,5 mM), este fenómeno apenas perceptible es coherente con una interacción no específica entre ambos. La carga positiva del catión polariza hacia él la densidad electrónica de los grupos fosfatos, haciendo disminuir apenas el blindaje experimentado por el átomo de fósforo. Por el contrario, por encima de pH = 5, existe un desplazamiento significativo de las curvas, diferente para cada señal, el que evidencia procesos específicos de complejación.

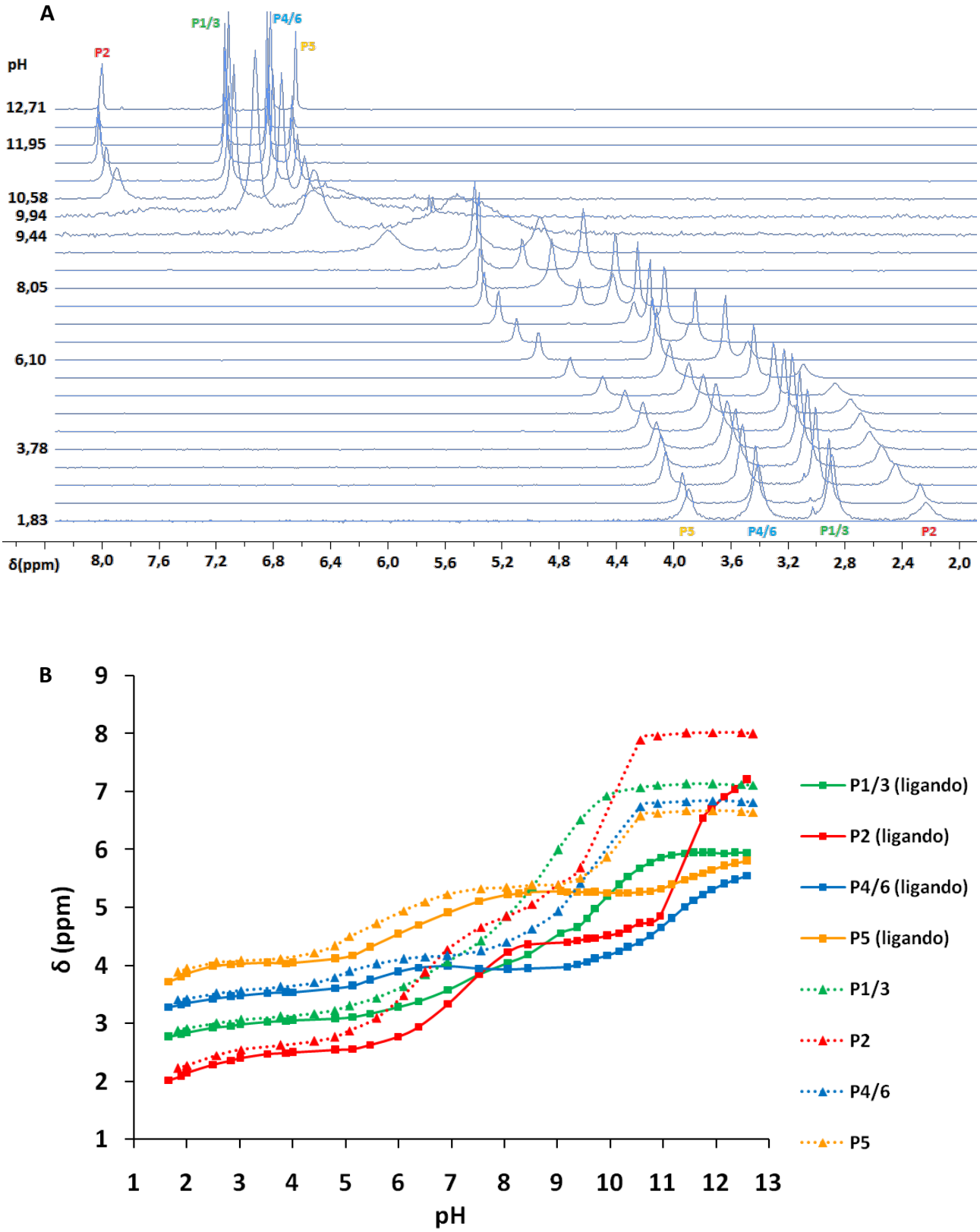


Figura 6.11. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Na^+ en función del pH a 37,0 ˚C e *I* = 0,15 M ([L] = 5,02 mM, [Na^+] = 152,5 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Na^+ (líneas discontinuas).

En suma, a medida que el pH del sistema varía se establecen dos tipos de equilibrios químicos compitiendo por el ligando, los cuales presentan efectos contrapuestos sobre las señales del RMN: de protonación y complejación. Para poder desentrañar la contribución particular de ambos, es necesario ajustar los datos experimentales con un modelo que logre reproducir el comportamiento químico de los espectros registrados en función del pH. Dicho ajuste se realiza con los puntos por encima de pH = 6, para evitar la contribución del desplazamiento de las señales debido a la interacción no específica metal-ligando ya mencionada, la cual probablemente se extiende un poco por encima de pH = 5. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Logaritmo de las constantes globales de formación ajustadas para los sistemas conteniendo InsP_6 y Na^+ o K^+, a 37,0 ˚C e I = 0,15 M.

Metal	Equilibrio	log K	σ
Na(I)	$3\,Na^+ + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Na_3(H_4L)]^{5-}$	4,80(3)	0,023
	$4\,Na^+ + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Na_4(H_3L)]^{5-}$	6,98(3)	
	$5\,Na^+ + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Na_5(H_2L)]^{5-}$	9,25(3)	
	$6\,Na^+ + L^{12-} \leftrightarrow [Na_6L]^{6-}$	11,44(3)	
K(I)	$3\,K^+ + H_4L^{8-} \leftrightarrow [K_3(H_4L)]^{5-}$	4,71(3)	0,056
	$4\,K^+ + H_3L^{9-} \leftrightarrow [K_4(H_3L)]^{5-}$	6,08(9)	
	$5\,K^+ + H_2L^{10-} \leftrightarrow [K_5(H_2L)]^{5-}$	7,86(5)	
	$6\,K^+ + L^{12-} \leftrightarrow [K_6L]^{6-}$	10,12(7)	

La distribución de las especies con el pH se muestra en la figura 6.12. De acuerdo con lo mencionado al comparar las señales de este sistema con las del ligando (figura 6.11B), a partir de pH = 5 comienzan a detectarse los procesos de complejación, dando especies que poseen varios cationes Na^+ por ligando involucrado. Estos se encuentran seguramente unidos en varios sitios del mismo, haciendo que todas las señales se vean afectadas en cierta medida.

Como se advierte de la figura 6.13, el modelo teórico de especies propuesto ajusta satisfactoriamente el comportamiento de las señales en el RMN, dando valores de residuales bastante bajos.

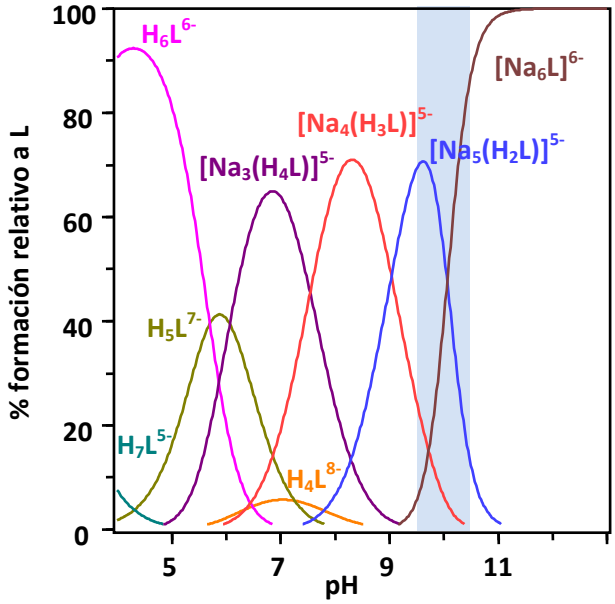


Figura 6.12. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Na^+ a 37,0 ˚C (I = 0,15 M), [L] = 5,02 mM, [Na^+] = 152,5 mM. Se resalta la zona de transición conformacional.

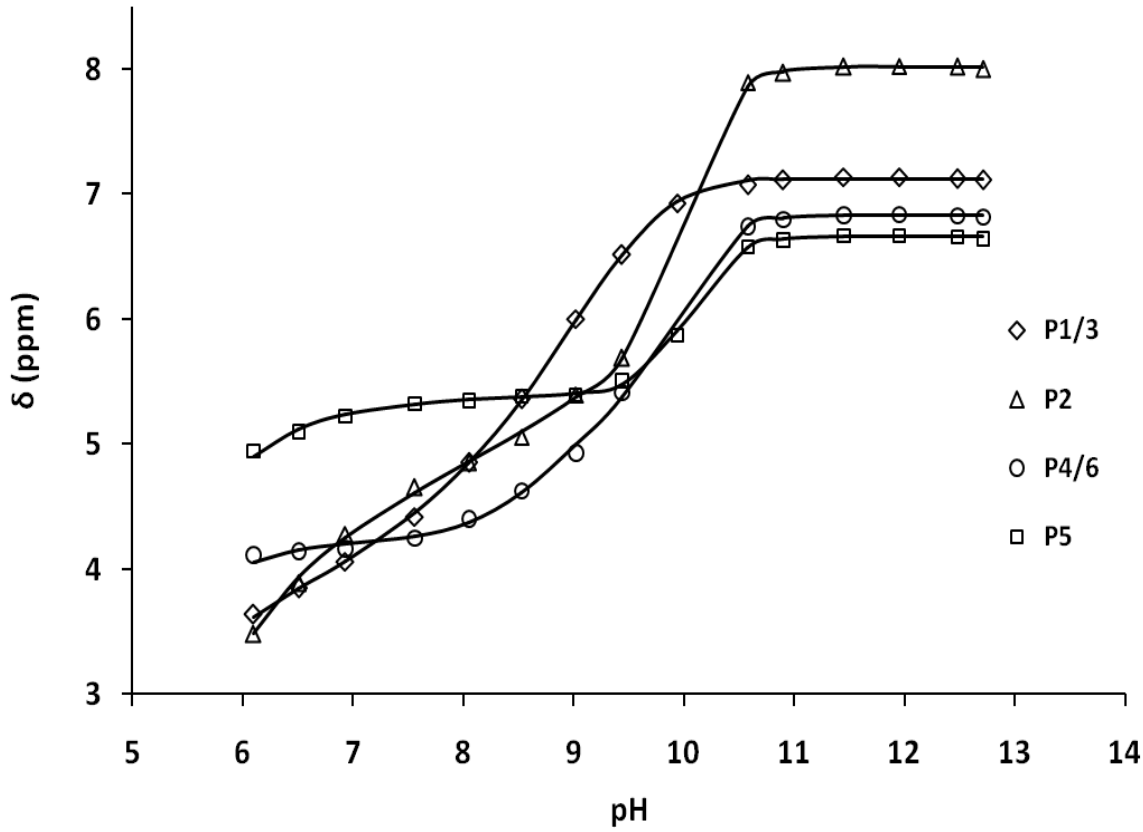


Figura 6.13. Ajuste de los datos experimentales de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Na^+ a 37,0 ˚C (I = 0,15 M). La curva continua corresponde al modelo teórico.

El ajuste de los datos experimentales de δ con el pH permite, asimismo, computar los valores de desplazamiento químico individual para cada complejo y su variación debido a los procesos sucesivos de protonación (y pérdida de metal) y complejación (a partir de la especie del ligando en el mismo estado de protonación). Los mismos se resumen en la tabla 6.5. En términos generales para este sistema, los desplazamientos químicos para cada fosfato disminuyen conforme las especies complejas se protonan, y aumentan a medida que más cationes metálicos se asocian al ligando. De esta forma, $\Delta\delta_{prot}$ es siempre negativo, debido no sólo a la ganancia de protones, sino además a la pérdida progresiva de iones Na^+, mientras que $\Delta\delta_{compl}$ es en la mayoría de los casos una magnitud positiva.

Tabla 6.5. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ para los sistemas InsP_6-Na^+/K^+, a 37,0 ˚C e I = 0,15 M.

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)							
	Na^+				K^+			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5	P1/3	P2	P4/6	P5
$[M_6L]^{6-}$	7,118	8,021	6,830	6,661	6,412	7,705	6,392	6,433
$[M_5(H_2L)]^{5-}$	7,046	5,785	5,653	5,428	6,323	4,732	5,519	5,438
$[M_4(H_3L)]^{5-}$	4,853	4,926	4,270	5,375	5,784	5,144	4,416	5,344
$[M_3(H_4L)]^{5-}$	3,943	4,276	4,227	5,275	4,072	4,484	4,159	5,345
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)				$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5	P1/3	P2	P4/6	P5
$[M_6L]^{6-}$	---	---	---	---	---	---	---	---
$[M_5(H_2L)]^{5-}$	-0,072	-2,236	-1,177	-1,233	-0,090	-2,973	-0,873	-0,996
$[M_4(H_3L)]^{5-}$	-2,192	-0,859	-1,384	-0,053	-0,539	0,413	-1,103	-0,094
$[M_3(H_4L)]^{5-}$	-0,910	-0,651	-0,042	-0,099	-1,712	-0,661	-0,257	0,002
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)				$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5	P1/3	P2	P4/6	P5
$[M_6L]^{6-}$	1,166	0,717	1,294	0,867	0,461	0,401	0,856	0,639
$[M_5(H_2L)]^{5-}$	1,019	0,900	1,103	0,130	0,296	-0,153	0,968	0,140
$[M_4(H_3L)]^{5-}$	0,110	0,563	0,302	0,126	1,041	0,781	0,448	0,095
$[M_3(H_4L)]^{5-}$	-0,131	-0,119	0,320	-0,018	-0,002	0,089	0,251	0,052

La especie $[Na_6L]^{6-}$ posee valores de $\Delta\delta_{compl}$ que son distintos para los diversos grupos fosfato. Por lo tanto, el entorno de cada fosfato modula en cierta medida la "sensibilidad" del átomo de fósforo respecto del acercamiento de los iones sodio al formarse el complejo. Esto está evidenciando una característica estructural importante de la especie: el patrón de complejación es diferencial, y seguramente involucra varios centros metálicos siendo unidos por más de un grupo fosfato. En detalle, los fosfatos P1/3 y P4/6 son los que se encuentran más involucrados en el enlace, mientras que P2 y P5 participan en menor proporción.

La remoción de un ion Na^+ permite que se unan al ligando dos protones, dando lugar a la especie $[Na_5(H_2L)]^{5-}$. Los valores de $\Delta\delta_{prot}$ indican la unión de ambos protones a P2 y P5. Sin embargo, la señal correspondiente a P4/6 se ve realmente afectada, por lo que es factible que el protón asociado a P5 sea compartido con P4/6. De forma interesante, el que estos dos grupos fosfato estén interconectados es menos costoso energéticamente en el estado 1a5e, lo que provee de evidencia experimental sobre un posible cambio conformacional del ligando en presencia de sodio, mediado por las especies complejas $[Na_5(H_2L)]^{5-}$ a $[Na_6L]^{6-}$. En total acuerdo con esto, el cambio conformacional se observa experimentalmente a través del ensanchamiento de las señales y el aumento del ruido espectral, a un pH en el rango 9,4 – 10,5 (inferior al correspondiente al ligando en ausencia de ion metálico), donde se produce el intercambio entre ambas especies complejas (ver figuras 6.11A y 6.12B). Estructuralmente, los cinco cationes sodio se ubicarían en $[Na_5(H_2L)]^{5-}$ llenando los espacios entre pares de fosfatos adyacentes, excepto uno de los dos entre P5 y P4/6, ocupado por uno de los protones de la especie. Dado que $\Delta\delta_{prot}$ para P2 es muy negativo, pero para P1/3 es apenas negativo, el protón sobre P2 debe pertenecer casi exclusivamente a él, a la vez que los iones sodio previenen a P1/3 interaccionar con este último. De acuerdo con la variación de las señales debidas a la complejación, los fosfatos más involucrados en el enlace son P4/6, P1/3 y P2. P5, compartiendo ya un protón con P4/6, no debe unirse, probablemente, a más de un solo catión sodio.

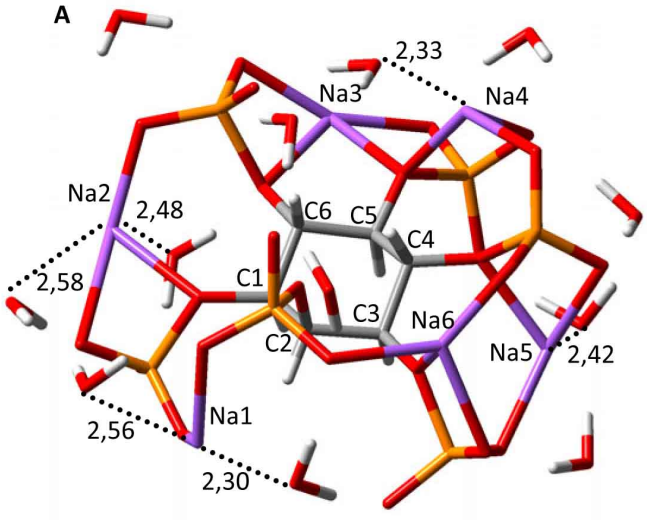
La disposición atómica del siguiente complejo, $[Na_4(H_3L)]^{5-}$, puede racionalizarse en base a la sustitución de un ion sodio por un protón en la especie anterior. Según los valores de $\Delta\delta_{prot}$, este proceso ocurre

espacialmente entre P1/3 y P4/6, aunque afecta a distancia a P2. Al protonarse P1/3, se elimina el ion sodio que lo separa de P4/6, lo que permite la compartición del H^+ que ingresa. Esto ocurre cerca de P2, por lo que es posible que P1/3 se aleje y afecte su señal. Con respecto a P5, el cambio en su entorno es mínimo, por lo que se lo puede considerar similar al correspondiente a la especie $[Na_5(H_2L)]^{5-}$, donde se encuentra enlazado a un sólo catión sodio. Los valores de $\Delta\delta_{compl}$ son menores para P1/3 y P5. En el primer caso, porque la protonación neutralizaría en parte los efectos de la complejación (en efecto, las microespecies mayoritarias con n = 2 no contienen a P1/3 directamente protonado; ver figura 6.5). En el caso de P5, porque se encontraría en contacto con menor cantidad de iones Na^+.

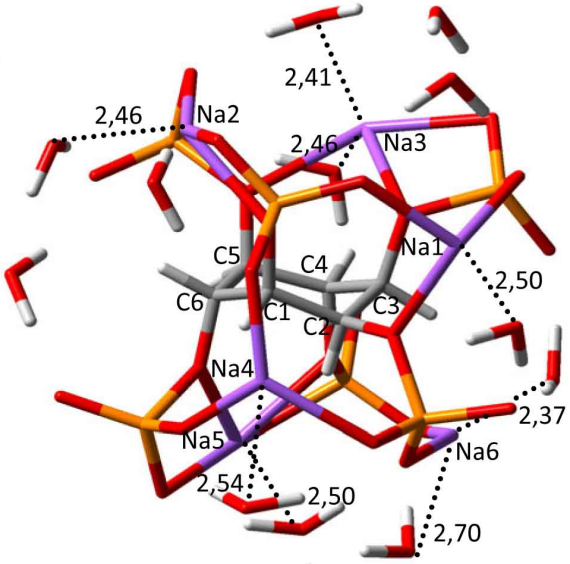
Finalmente, la transformación de la especie $[Na_4(H_3L)]^{5-}$ a $[Na_3(H_4L)]^{5-}$ está mediada por la protonación de P1/3 y la compartición de este protón con P2, dados los bajos valores de $\Delta\delta_{prot}$ para ambos grupos. La única manera de que esto sea posible desde un punto de vista estructural involucra la eliminación de un ion sodio que se encuentre entre ambos fosfatos. Este efecto se confirma al observar los valores correspondientes de $\Delta\delta_{compl}$, los cuales se encuentran apenas por debajo de cero. Analizando este parámetro en el caso de P4/6 y P5, se deduce que la variación en el entorno de ambos grupos es muy leve; tal vez existe una pequeña alteración en la posición de los iones sodio que los rodean y el protón que ambos comparten. Sin embargo, P4/6 parece ser el grupo que más afectado se ve por la complejación, evidenciando un rol mayoritario en la unión del metal alcalino a pH alrededor de la neutralidad.

3.2.2. Características estructurales generales de los complejos

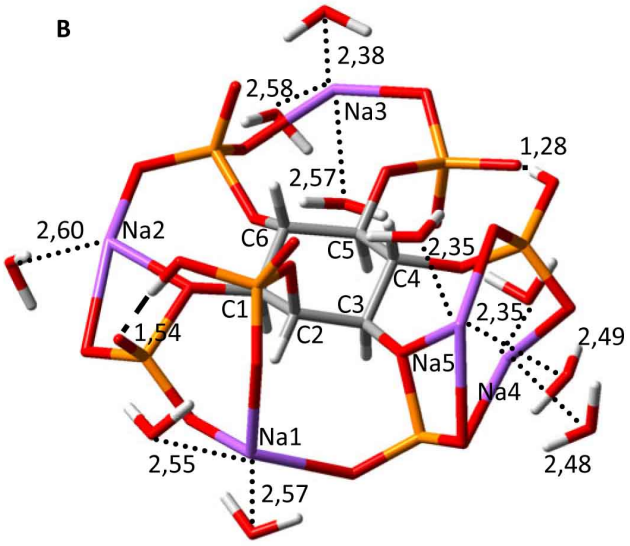
Con los datos estructurales recabados, se realizó el modelado en fase gaseosa de ambos confórmeros de los complejos detectados. Este análisis se repitió considerando los efectos del solvente, mediante la adición de dos moléculas de aguas de coordinación a cada ion metálico. En la figura 6.14 se muestran los resultados para estos últimos cálculos. Un aspecto interesante lo constituye la naturaleza cooperativa del enlace metal-ligando. La especie $[Na_6L]^{6-}$ posee un ion sodio por cada grupo fosfato del fitato. En contraposición a lo que podría pensarse, la unión no se predice en forma localizada (1 metal - 1 grupo fosfato), sino que cada centro metálico se une a varios grupos ionizables y viceversa.



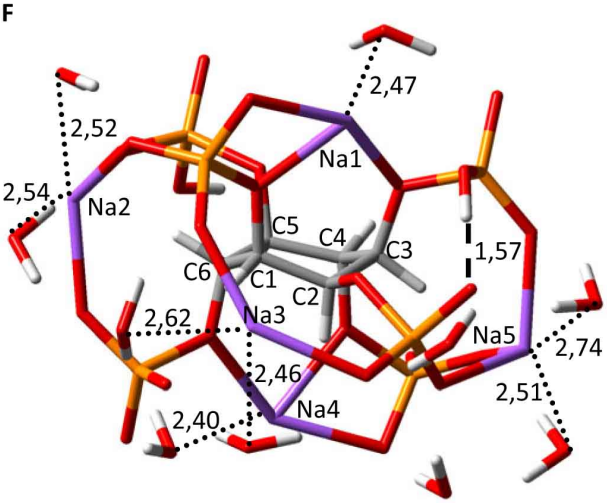
$[Na_6L(H_2O)_{12}]^{6-}$ (1a5e)



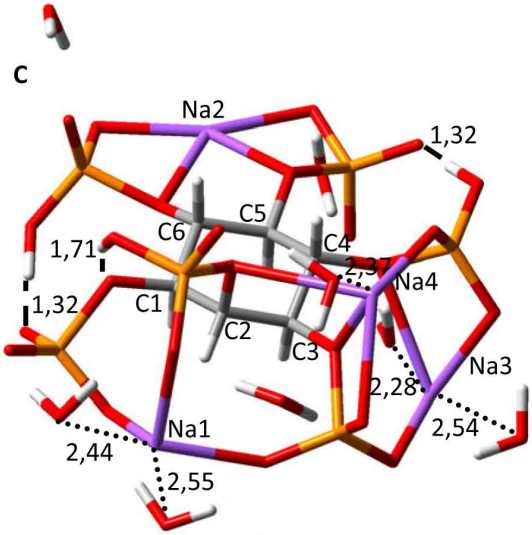
$[Na_6L(H_2O)_{12}]^{6-}$ (5a1e)



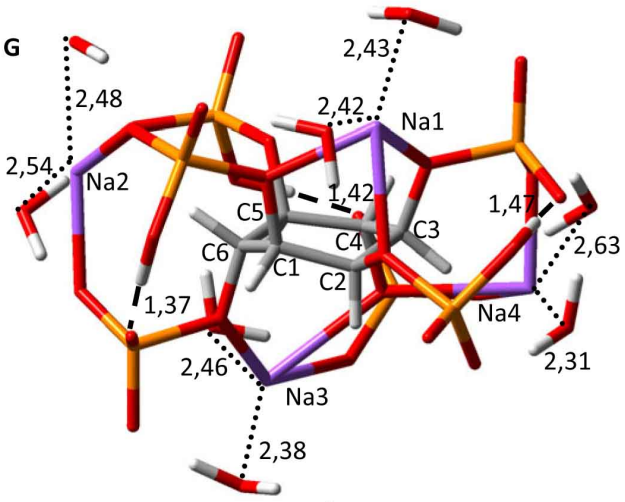
$[Na_5(H_2L)(H_2O)_{10}]^{5-}$ (1a5e)



$[Na_5(H_2L)(H_2O)_{10}]^{5-}$ (5a1e)



$[Na_4(H_3L)(H_2O)_8]^{5-}$ (1a5e)



$[Na_4(H_3L)(H_2O)_8]^{5-}$ (5a1e)

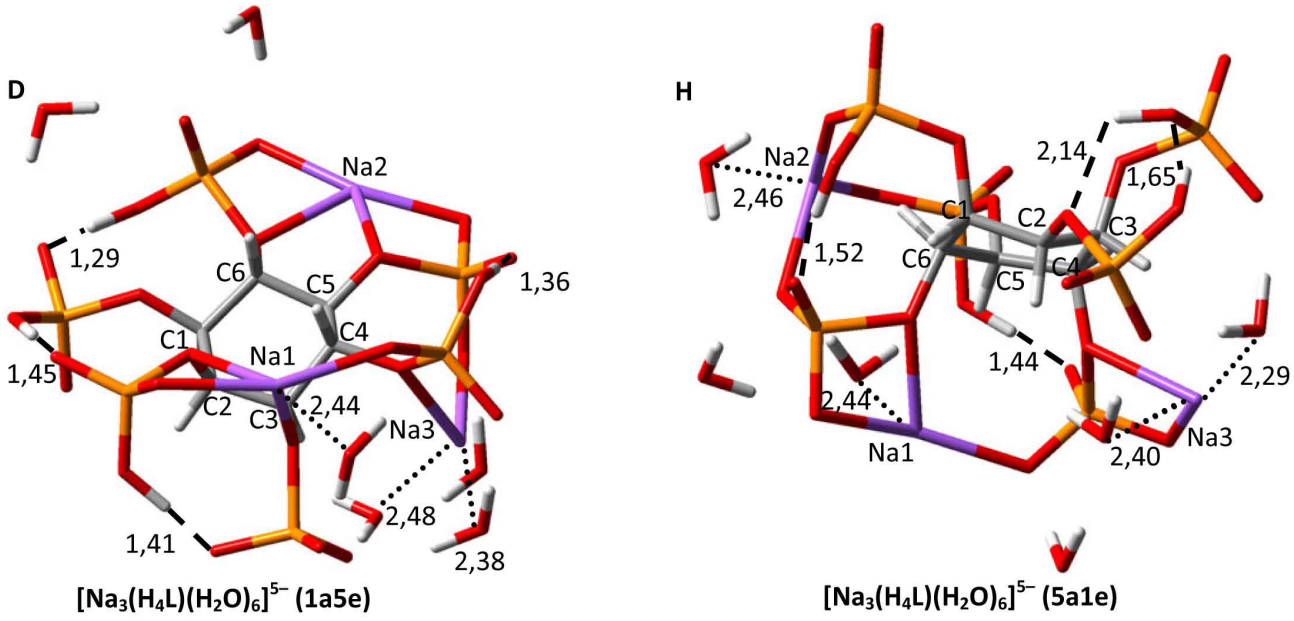


Figura 6.14 Geometrías RB3LYP/LANL2DZ optimizadas para ambos estados conformacionales de los complejos Na^+-InsP_6. $[Na_6L(H_2O)_{12}]^{6-}$ (A,E), $[Na_5(H_2L)(H_2O)_{10}]^{5-}$ (B,F), $[Na_4(H_3L)(H_2O)_8]^{5-}$ (C,G), $[Na_3(H_4L)(H_2O)_6]^{5-}$ (D,H). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas, mientras que los enlaces metal-aguas de hidratación se representan con líneas punteadas. En ambos casos se detalla la distancia correspondiente en Å.

Este fenómeno de cooperativismo puede racionalizarse en base a la distribución espacial de la carga negativa que las especies del ligando deben soportar al deprotonarse. En la figura 6.15A se muestra la suma de las cargas atómicas NPA para los grupos fosfato, los hidrógenos del anillo y los átomos de carbono en algunas de las especies del fitato. Como era previsible, a medida que el ligando pierde protones, partiendo de la especie $H_{12}L$, la carga negativa se centra en los grupos fosfato, dejando al anillo con carga parcial positiva. A pesar de esto, la distribución espacial del potencial electrostático molecular es más compleja y, como se desprende de la figura 6.15B, el mismo decrece hacia la zona interfosfato. Cuando un catión metálico se acerca al fitato en solución, percibe al mismo como una gran especie con carga negativa, es atraído hacia ella y se acomoda en las zonas de menor potencial, marcadas en rojo en la figura 6.15B. En efecto, los iones metálicos parecen encajar entre dos o tres fosfatos en un entorno bastante distorsionado, maximizando las interacciones electrostáticas. Este fenómeno conforma una red de enlaces que en su totalidad da soporte a la gran estabilidad termodinámica de las especies y da

cuenta, efectivamente, del marcado carácter electrostático del enlace que domina la interacción fitato-M^+, discutido en el capítulo 5. Más aún, la naturaleza asociativa del mismo explica que todos los grupos fosfato del ligando se vean afectados por la complejación de forma sustancial y diferencial, como lo evidencian los valores de $\Delta\delta_{compl}$ de la tabla 6.5.

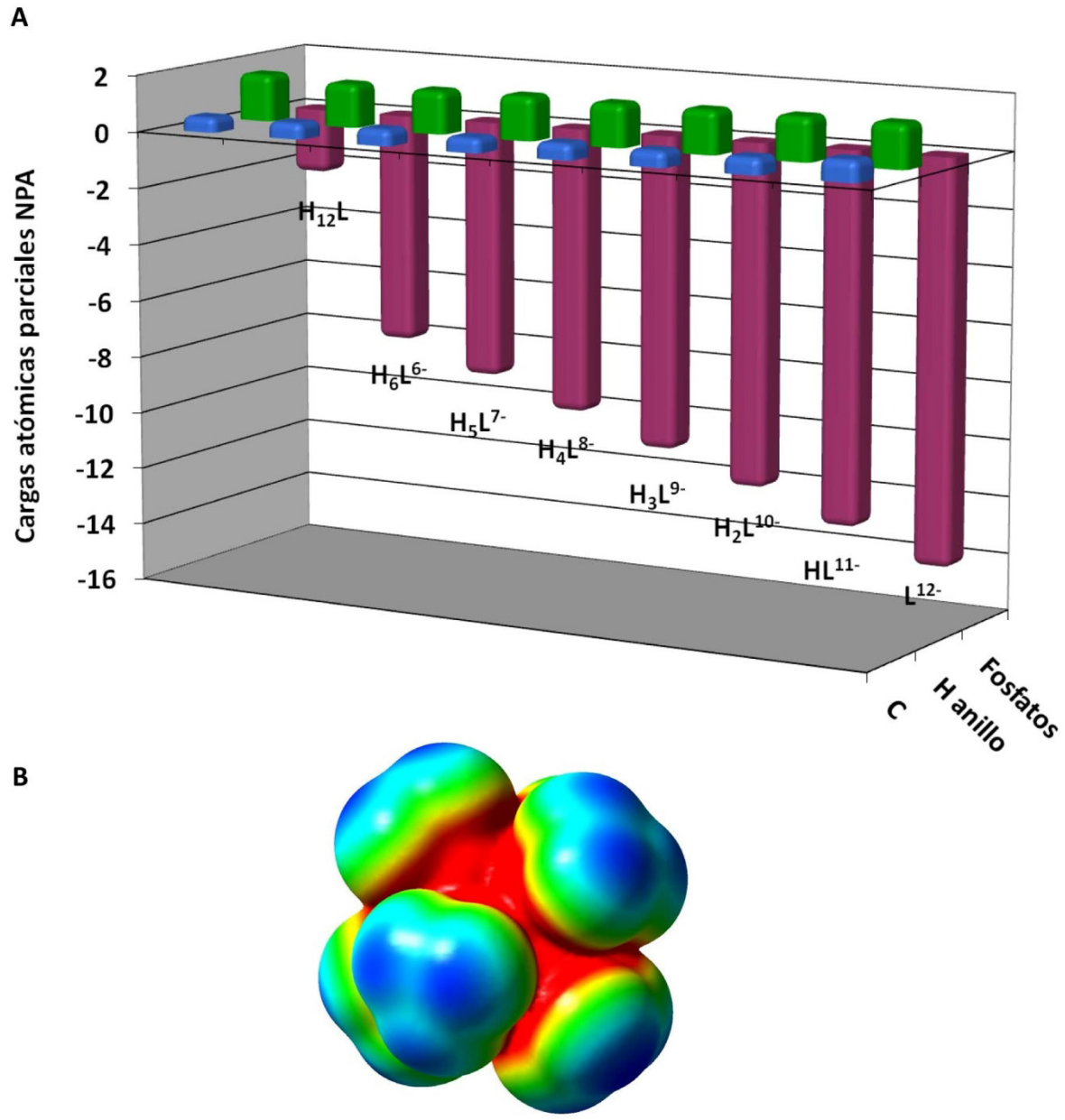


Figura 6.15. (A) Suma de las cargas atómicas NPA para los grupos fosfato, hidrógenos del anillo y carbonos en algunas de las especies del fitato (geometrías RHF/3-21+G*). (B) Potencial electrostático molecular evaluado en una superficie de isodensidad (0,0001 e) para L^{12-} (5a1e). Se marcan de rojo a azul las zonas de menor a mayor potencial eléctrico.

Por otra parte, la afinidad de los iones Na^+ por las moléculas del solvente no parece ser demasiado importante. Las moléculas de agua de coordinación se ubican alejadas del metal y se unen a la especie compleja por fuertes enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato. Esto provoca que las diferencias estructurales entre las geometrías en ausencia y en presencia de aguas de hidratación sean menores, así como la alteración en el entorno de coordinación de los centros metálicos (no se muestra). Una visión más "realista" de estos complejos sería la de entidades con gran carácter de par iónico, en donde los grupos fosfato forman cajas “negativas” que unen a los diversos cationes, dando prioridad a la atracción de tipo electrostático frente a la necesidad de satisfacer, estrictamente, las posiciones y ángulos de un entorno regular de coordinación. El solvente hidrata a las estructuras de los complejos como un todo, y en el marco de los movimientos moleculares en solución podrá, en algunos casos, completar transitoriamente las posiciones de coordinación o unirse a los grupos fosfato que conforman los huecos negativos mediante enlaces de hidrógeno.

3.2.3. Secuencia de complejación

Un análisis pormenorizado de las geometrías de la figura 6.14 revela características estructurales que se relacionan en mayor o menor medida con los resultados espectroscópicos por RMN. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que la técnica de modelado molecular sólo da cuenta de una figura estática acerca de una realidad dinámica compleja en el seno de la solución.

La conformación axial de la especie $[Na_6L]^{6-}$ (figura 6.14E) predice $\Delta\delta_{compl} > 0$ para todos los grupos fosfato, los que unen por lo menos dos iones sodio a la vez. Del mismo modo, está de acuerdo con el orden de los mismos, siendo los fosfatos más afectados aquellos sobre C1/3 y C4/6, los que coordinan a los cationes a través de tres o cuatro átomos de oxígeno. P5 sólo lo hace de forma bidentada, por lo que su señal se ve un poco menos afectada. Finalmente, el fosfato en C2 es el menos sensible a la complejación, ya que aunque se rodea de tres iones Na^+, su disposición espacial aleja el átomo de fósforo de los mismos aproximadamente 0,2 Å de la distancia promedio metal - P del resto de los grupos fosfato.

La inclusión de dos protones sobre las posiciones 2 y 5 genera un cambio estructural que induce la pérdida de un catión sodio. Se desencadena entonces una distorsión de la geometría que finaliza con el cambio conformacional de la especie, dando lugar al complejo $[Na_5(H_2L)]^{5-}$ (1a5e). Según se observa en las figuras 6.14B y F, en el estado 1a5e se permite la interacción de los grupos P5 y P4/6 en el espacio, verificada experimentalmente, a través de un fuerte enlace de hidrógeno. No obstante, debido a la presencia de los centros metálicos, el protón sobre P2 se comparte sólo en parte con el grupo P1/3. Estas características brindan una explicación a las tendencias observadas para los valores de $\Delta\delta_{prot}$, los cuales son menores para P2, P4/6 y P5. Asimismo, los fosfatos en C4/6 y C1/3 son los más afectados por el proceso de complejación, por lo que sus señales sufren la mayor variación (ver tabla 6.5). Por el contrario, P5 se rodea de un solo catión sodio y un protón, dando cuenta de un bajo valor de $\Delta\delta_{compl}$. P2, por su parte, se ve afectado con la coordinación, aunque une estrictamente un sólo ion metálico. En este sentido, dos aspectos estructurales podrían tener relación con este fenómeno. Primeramente, el hidrógeno ecuatorial unido a C2 apunta directamente al átomo Na1, el que se encuentra a sólo 2,3 Å, lo que genera una repulsión del tipo C2-H···Na1, que podría afectar a través de los enlaces covalentes el entorno de P2. Este efecto positivo sobre el desplazamiento químico de la señal permanecería en el complejo $[Na_4(H_3L)]^{5-}$, pero desaparecería en $[Na_3(H_4L)]^{5-}$, donde este ion sodio se libera a la solución (ver valores de $\Delta\delta_{compl}$(P2) en tabla 6.5 y figuras 6.14B, C y D). En segundo lugar, en la dinámica de la solución, es factible que el ion Na5 interaccione con P2 (figura 6.14B), contribuyendo de forma positiva al valor de $\Delta\delta_{compl}$ correspondiente. De hecho, como muestra la figura 6.14C, se predice esta misma interacción a distancia en el complejo $[Na_4(H_3L)]^{5-}$.

El tercer protón en ingresar se ubica, según los datos experimentales, entre los grupos P1/3 y P4/6, liberando un ion Na^+ de la región interfosfato (figuras 6.14C y G). Dado que, como se mencionó anteriormente, P2 se asocia a P1/3 por un enlace de hidrógeno, su señal también se ve afectada. En efecto, en la conformación 1a5e, cuando P1/3 se protona, se retrae hacia P4/6, rompiendo su enlace de hidrógeno con P2. Este es, posiblemente, el factor que más contribuye a la disminución en el desplazamiento químico de la señal de P2 asociada al proceso $[Na_5(H_2L)]^{5-} \rightarrow [Na_4(H_3L)]^{5-}$. Por su parte, P5 no se ve demasiado afectado en esta última transformación; sigue rodeado de un ion

sodio y un protón que comparte con P4/6. Dados los valores de $\Delta\delta_{compl}$, los fosfatos más afectados son P2 y P4/6, los que se rodean de varios centros metálicos. De forma extraña, P1/3 se ve poco afectado con la complejación (bajo valor de $\Delta\delta_{compl}$, tabla 6.5). Es posible que la contribución debida al rearreglo de los protones respecto de la microespecie mayoritaria del ligando (H_3L^{9-}(246)) sea significativa, haciendo de P1/3, aparentemente, el único grupo fosfato rodeado de dos protones al mismo tiempo.

La pérdida de un catión sodio unido a P2 y P1/3 permite el ingreso del cuarto protón, el cual se comparte entre ambos grupos, resultando en valores negativos de $\Delta\delta_{prot}$ y pequeños de $\Delta\delta_{compl}$ (ver tabla 6.5 y figuras 6.14D y H). Asimismo, de acuerdo con lo que se mencionó más arriba, el entorno de P4/6 y P5 varían levemente en el proceso $[Na_4(H_3L)]^{5-} \rightarrow [Na_3(H_4L)]^{5}$, existiendo pequeños rearreglos estructurales derivados del intercambio catiónico.

3.2.4. Determinantes estructurales del cambio conformacional

Como punto final de este análisis, se revisa la influencia de los diversos factores estructurales sobre la energía de ambas conformaciones para las especies complejas y su contribución al cambio conformacional operativo en presencia de sodio. Si las geometrías optimizadas de la figura 6.14 representan a los complejos detectados en solución, sus energías moleculares deben estar en línea con el cambio observado en la estabilización de los confórmeros con el pH. Como muestra la figura 6.16, en donde se representa la diferencia energética entre ambos estados conformacionales de los complejos Na^+-InsP_6 (ΔE), esto mismo es lo que ocurre. Desde el punto de vista computacional, tanto en fase gaseosa como considerando los efectos del solvente, el cambio entre la conformación 1a5e y 5a1e se predice entre las especies $[Na_5(H_2L)]^{5-}$ y $[Na_6L]^{6-}$. El acuerdo con las observaciones experimentales da cuenta de la bondad del modelo estructural propuesto, y en consecuencia, de las conclusiones derivadas.

En la tabla 6.6 se detallan los valores de los indicadores estructurales $X_{O\text{-}H}$, $X_{P\text{-}P}$ y $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ para los complejos de la figura 6.14. Partiendo desde medio fuertemente básico, el ligando adopta la conformación 5a1e, de forma de minimizar las repulsiones entre los grupos aniónicos. Como ya fue discutido

para las especies altamente cargadas del fitato, esta repulsión es de tal magnitud que el ligando debe tensionar el anillo al máximo para poder acomodar los grupos fosfatos muy voluminosos y cargados. Como se desprende de la comparación de los valores de $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ para las especies L^{12-} y $[Na_6L]^{6-}$ (tablas 6.3 y 6.6), la asociación al metal alivia esta repulsión y por tanto estabiliza ambos estados conformacionales. Sin embargo, lo hace posiblemente en mayor proporción para el 1a5e por ser la conformación más impedida desde el punto de vista electrostático y estérico.

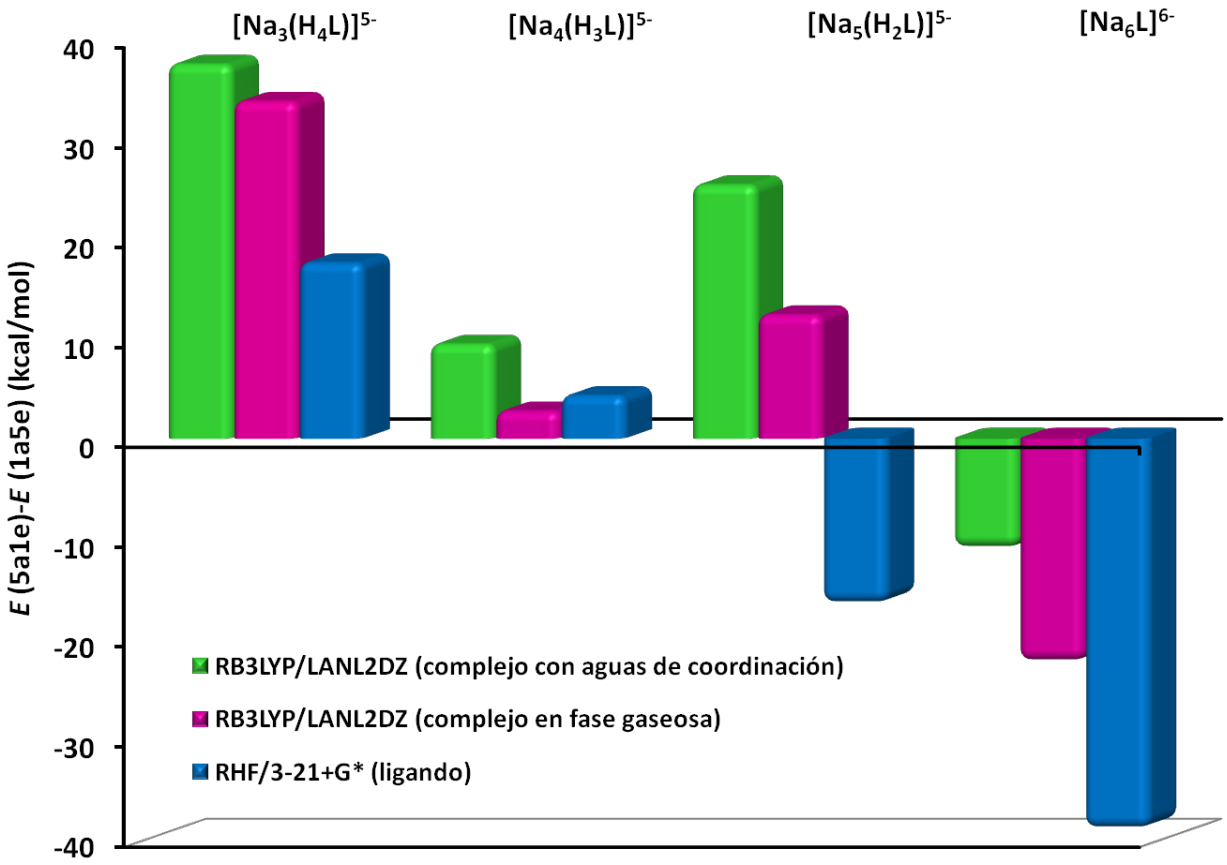


Figura 6.16. Diferencia de energía entre ambos estados conformacionales de los complejos Na^+-InsP_6, en fase gaseosa y considerando dos aguas de hidratación por ion metálico. Se muestran, además, los valores obtenidos para el mismo parámetro en ausencia de ion metálico.

En concordancia con lo anterior, esta estabilización diferencial es la causa del aumento general de los valores de ΔE al colocar el ligando en presencia de sodio, como se advierte en la figura 6.16. Dado que sólo se neutraliza la mitad

de la carga negativa total del ligando, este fenómeno parece no ser suficientemente grande como para invertir el orden de energías y motivar un cambio en la conformación preferida del ligando en el proceso $L^{12-} \rightarrow [Na_6L]^{6-}$. En efecto, si se observan los valores de desviación promedio $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ para este último complejo, se advierte que la tensión en el anillo es similar para la forma ecuatorial y la axial (tabla 6.6). El estado 5a1e sigue siendo más eficiente en separar los grupos fosfato entre sí, (mayor valor de $X_{P\text{-}P}$) y por tanto es el confórmero preferido del complejo $[Na_6L]^{6-}$. De forma adicional, el valor de este último indicador para la conformación 5a1e no presenta variación entre el ligando completamente deprotonado y su complejo con sodio (comparar valores en tablas 6.3 y 6.6). Esto da cuenta de una característica estructural ya discutida para la conformación axial de la especie L^{12-}: la presencia de huecos negativos preformados, los que unen a los cationes en solución con un mínimo de distorsión en la disposición promedio de los grupos fosfato entre sí.

Tabla 6.6. Parámetros estructurales para ambas conformaciones de las especies complejas InsP_6-Na^+ (geometrías RB3LYP/LANL2DZ).

	$X_{O\text{-}H}$ (Å)[a]			$X_{P\text{-}P}$ (Å)[b]			$\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ (°)[c]	
Especies	1a5e	5a1e		1a5e	5a1e		1a5e	5a1e
$[Na_6L]^{6-}$	---	---		5,11	5,73		12	13
$[Na_5(H_2L)]^{5-}$	1,41	1,57		---	---		6	18
$[Na_4(H_3L)]^{5-}$	1,45	1,42		---	---		2	30
$[Na_3(H_4L)]^{5-}$	1,38	1,69		---	---		10	27

[a] $X_{O\text{-}H}$ representa la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en Å. [b] $X_{P\text{-}P}$ corresponde a la distancia promedio, en Å, entre los átomos de fósforo de los grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes. [c] $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ es la desviación promedio, desde el valor esperado de 180°, de todos los ángulos diedros formados por los grupos axiales de carbonos adyacentes en °.

Dado que no se detecta ninguna especie monoprotonada, parece factible que el primer protón que ingresa provoque, simultáneamente, la pérdida de un ion sodio y la entrada de un segundo H^+, dando lugar a $[Na_5(H_2L)]^{5-}$. Estos procesos son lo suficientemente radicales como para motivar el cambio conformacional

del ligando en el complejo. Si se observa la tabla 6.6, el estado 1a5e es el que logra, de hecho, minimizar la tensión en el anillo, mientras que acerca a sus fosfatos lo suficiente como para establecer fuertes enlaces de hidrógeno. Con la tercera protonación el panorama cambia levemente. La necesidad de priorizar la formación de enlaces de hidrógeno lleva al estado 5a1e de la especie $[Na_4(H_3L)]^{5-}$ a tensionar el anillo en gran proporción, aumentando aún más el valor correspondiente de $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$. Sin embargo, como se puede ver en la figura 6.14G y en la tabla 6.6, este aumento energético se ve compensado parciamente por los enlaces de hidrógeno formados, los que son incluso levemente más fuertes a los establecidos en el estado ecuatorial. Esto disminuye la brecha energética entre ambos estados, explicando la irregularidad en los valores de ΔE para este complejo (Figura 6.16). Aunque este fenómeno sea efectivamente operativo en el sistema, dado que es su efecto es sólo parcial, se continúa verificando tanto teórica como experimentalmente la forma ecuatorial como la predominante por debajo de pH = 10.

Finalmente, el cuarto protón vuelve a aumentar la diferencia energética entre ambas conformaciones del ligando, reafirmando el estado ecuatorial como el más estable (figura 6.16). En este caso, en anillo carbonado sufre una tensión mayor para la forma 5a1e, la cual ya no logra la formación eficaz de fuertes enlaces de hidrógeno (ver figuras 6.14D y H y tabla 6.6). Por el contrario, la disposición ecuatorial de los fosfatos permite el establecimiento de una red de enlaces de hidrógeno eficiente, con un mínimo de distorsión estructural.

En conclusión, hacia medio altamente básico el alto grado de deprotonación del ligando permite la unión de varios iones sodio por molécula de ligando. El esquema de unión metal – ligando es cooperativo, mediante la ubicación de los diversos cationes en huecos negativos formados por varios grupos fosfatos. Esto da lugar a especies complejas muy estables, por formación de una red de enlaces con un alto carácter iónico. En este contexto, la conformación 5a1e parece muy adecuada, ya que provee de una estructura preformada que une a los centros metálicos, aliviando la repulsión interfosfato, con un mínimo de tensión estructural. A medida que disminuye el pH, la protonación del ligando va liberando progresivamente iones sodio, y el sistema comienza a priorizar la formación de enlaces de hidrógeno frente a las interacciones M^+-fosfato. En

este sentido, los grupos fosfato deben acercarse mucho para poder compartir un H^+, estabilizando la conformación ecuatorial, y estableciendo, a pH intermedio, un proceso de transición conformacional en solución.

3.3. Sistema InsP_6-K^+

3.3.1. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

Los espectros de RMN de ^{31}P, en función del pH y en presencia de K^+, se muestran en la figura 6.17A. La asignación de las señales se realizó por comparación con los espectros del ligando en medio ácido, analizando a posteriori los desplazamientos químicos con el pH.

La protonación de las especies provoca un desplazamiento de las señales hacia campos altos, observándose cuatro señales bien resueltas. Como se mencionó para el sistema InsP_6-Na^+, considerando el gran exceso empleado de ion metálico, el leve corrimiento de las señales respecto de las del ligando, a pH inferior a 5, es coherente con una interacción no específica ligando-K^+ (figura 6.17B). Por encima de este rango, existe un desplazamiento significativo de las curvas, diferente para cada señal, el que evidencia complejación. Utilizando la misma estrategia aplicada en el sistema conteniendo sodio, el ajuste se realizó con los puntos por encima de pH = 6.

Los resultados del ajuste de las constantes de formación de complejos se detallan en la tabla 6.4. El diagrama de distribución de especies derivado (figura 6.18) predice que es a partir de pH = 5 cuando comienzan a detectarse las especies complejas. En línea con la información contenida en la figura 6.17B, a partir de este punto las señales se apartan significativamente de las del ligando. Estos complejos poseen varios cationes K^+ unidos a varios grupos fosfato a la vez, haciendo que todas las señales se vean en mayor o menor medida afectadas.

Los valores de constantes de equilibrio ajustadas explican satisfactoriamente el comportamiento de las señales en el RMN, dando valores de residuales que se hacen importantes sólo a pH cercanos al punto de corte elegido por el comienzo de la interacción no específica ligando-metal (pH = 6, figura 6.19).

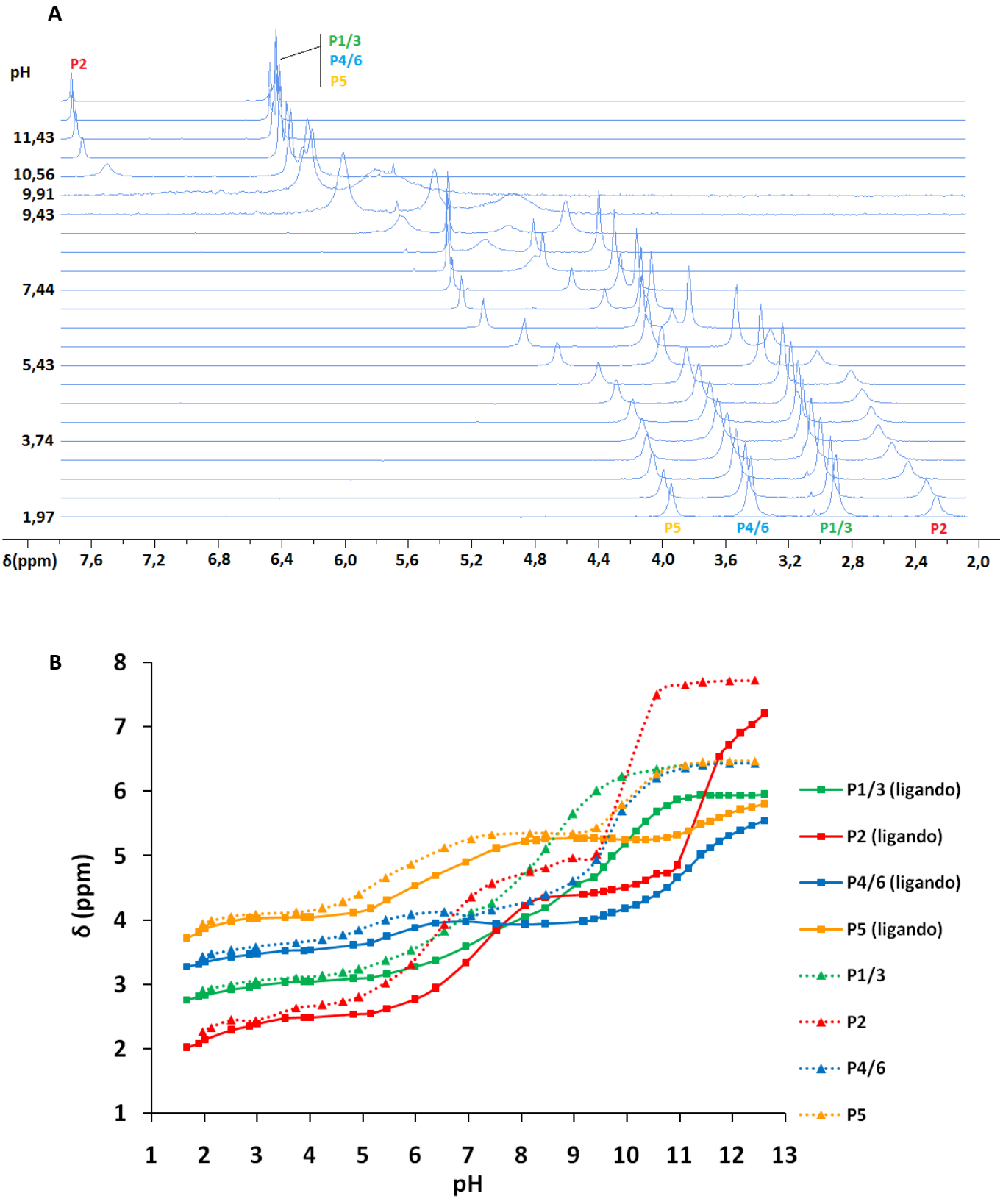


Figura 6.17. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-K^+ en función del pH a 37,0 ˚C e I = 0,15 M ([L] = 5,15 mM, [K^+] = 150,8 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-K^+ (líneas discontinuas).

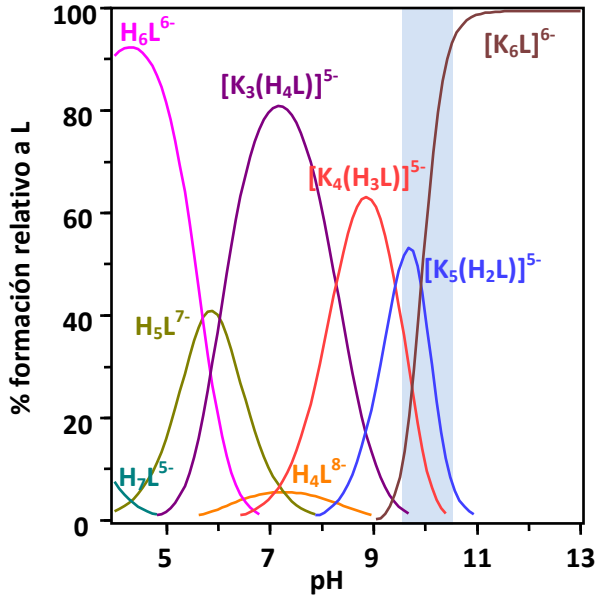


Figura 6.18. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-K^+ a 37,0 ˚C (I = 0,15 M), [L] = 5,15 mM, [K^+] = 150,8 mM. Se resalta la zona de transición conformacional.

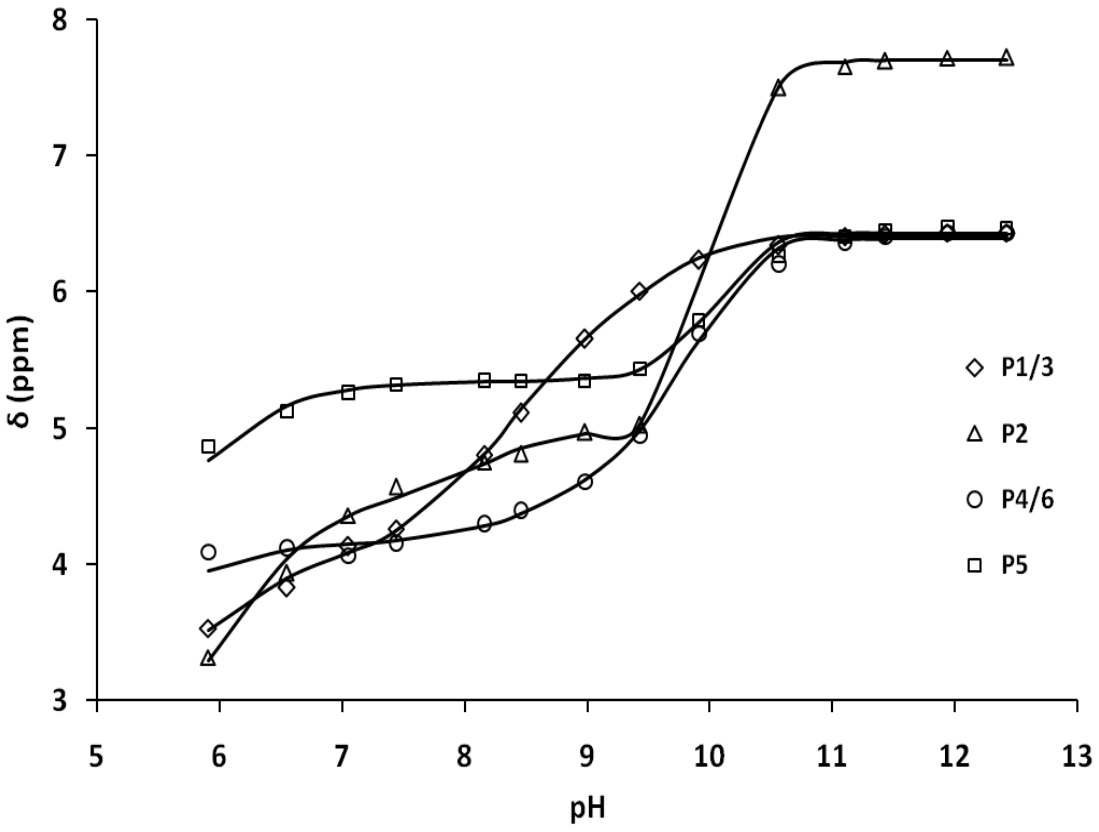


Figura 6.19. Ajuste de los datos experimentales de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-K^+ a 37,0 ˚C (I = 0,15 M). La curva continua corresponde al modelo teórico.

3.3.2. Aspectos estructurales de los procesos de complejación

En la tabla 6.5 se detallan los desplazamientos químicos individuales y su variación debido a los procesos sucesivos de protonación (y pérdida de metal) y complejación (a partir de la especie del ligando en el mismo estado de protonación). Al igual que en presencia de Na^+, los desplazamientos químicos para cada grupo fosfato disminuyen conforme las especies complejas se protonan y aumentan a medida que más cationes potasio se unen al ligando. En efecto, en la mayoría de los casos los valores de $\Delta\delta_{prot}$ son negativos y los de $\Delta\delta_{compl}$ positivos. Existen un par de excepciones a estas tendencias, que se pueden explicar debido a que estas magnitudes están determinadas para procesos donde no sólo ocurren adiciones o eliminaciones de cationes. Las distintas transformaciones del ligando a las especies complejas involucran, usualmente, rearreglos internos del esquema de protonación que llevan a cierta variación adicional de las señales.

Los valores de $\Delta\delta_{compl}$ para la especie $[K_6L]^{6-}$ son sensiblemente menores que los correspondientes a la especie $[Na_6L]^{6-}$, y sus magnitudes relativas han variado al pasar de sodio a potasio. Estos hechos evidencian dos diferencias principales en cuanto a la interacción ligando-metal en ambos casos. En primer lugar, la intensidad con la cual el ligando se asocia con el ion metálico es menor para el ion K^+, como se deriva, también, de los valores ajustados de constantes de complejación (tabla 6.4). Esto está de acuerdo con lo discutido en el párrafo anterior: la interacción posee una gran contribución de carácter electrostático y disminuye al disminuir el potencial iónico del catión. Por otra parte, el esquema de complejación parece variar al cambiar de ion alcalino. El valor de $\Delta\delta_{compl}$ para P1/3 es ahora menor, haciendo que al pasar de Na^+ a K^+ estos grupos fosfato contribuyan menos al enlace ligando-metal. En efecto, la distribución de las señales en el RMN es bastante diferente para las especies $[Na_6L]^{6-}$ y $[K_6L]^{6-}$, como se aprecia en la figura 6.20.

Para poder entender qué causa estos patrones de señales tan diferentes, para complejos que poseen la misma estequiometría, en la figura 6.21 se muestran las geometrías optimizadas para los complejos $[Na_6L]^{6-}$ y $[K_6L]^{6-}$ en fase gaseosa. El ion sodio, al ser más pequeño, interacciona con los grupos fosfato con mayor intensidad y de forma más localizada, lo que provoca una mejor definición de las señales en la figura 6.20. Por el contrario, los iones potasio al tener mayor

tamaño lo hacen en menor grado, actúan sobre varios fosfatos a la vez y se distribuyen a lo largo de todo el ligando. Esto explicaría, en parte, el entorno muy similar para los cinco grupos axiales, que da cuenta del colapso de las señales de P5, P4/6 y P1/3 para $[K_6L]^{6-}$ (figura 6.20). Dada la geometría de más baja energía correspondiente (figura 6.21B), los iones K^+ se encuentran, en su mayoría, asociados preferencialmente a P4/6 y P5, dando una explicación posible al menor valor para $\Delta\delta_{compl}$ determinado para P1/3.

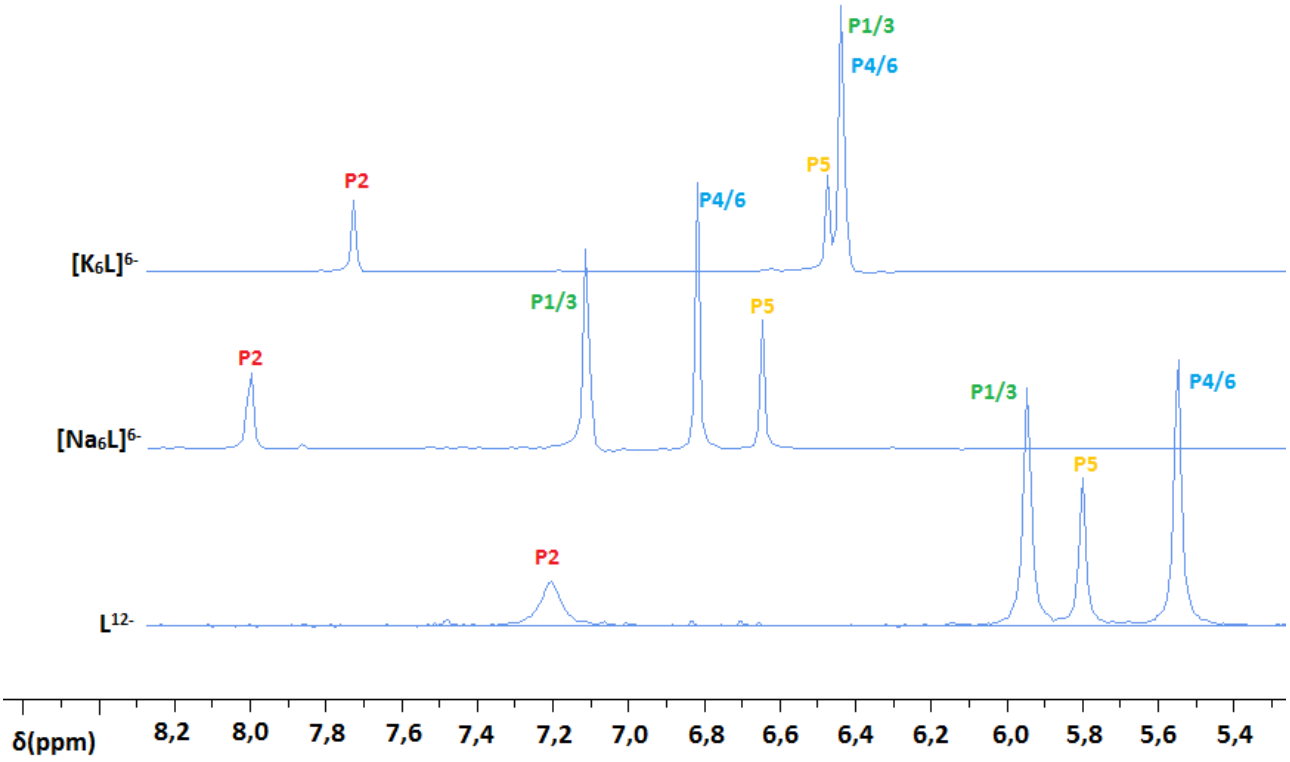


Figura 6.20. Espectros de RMN de ^{31}P a pH > 12 para los sistemas InsP_6-H^+/Na^+/K^+ (37,0 ˚C, *I* = 0,15 M).

Es interesante notar el fenómeno por el cual el cambio de iones sodio por iones potasio genera un pequeño aumento de la tensión del anillo de inositol en la especie $[M_6L]^{6-}$ ($\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ ($[Na_6L]^{6-}$) = 14° y $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ ($[K_6L]^{6-}$) = 18°). Este efecto, aunado a un mayor valor de potencial iónico, explica que el fitato exhiba una leve preferencia por el ion Na^+, según se deriva de las constantes de formación ajustadas de la tabla 6.4.

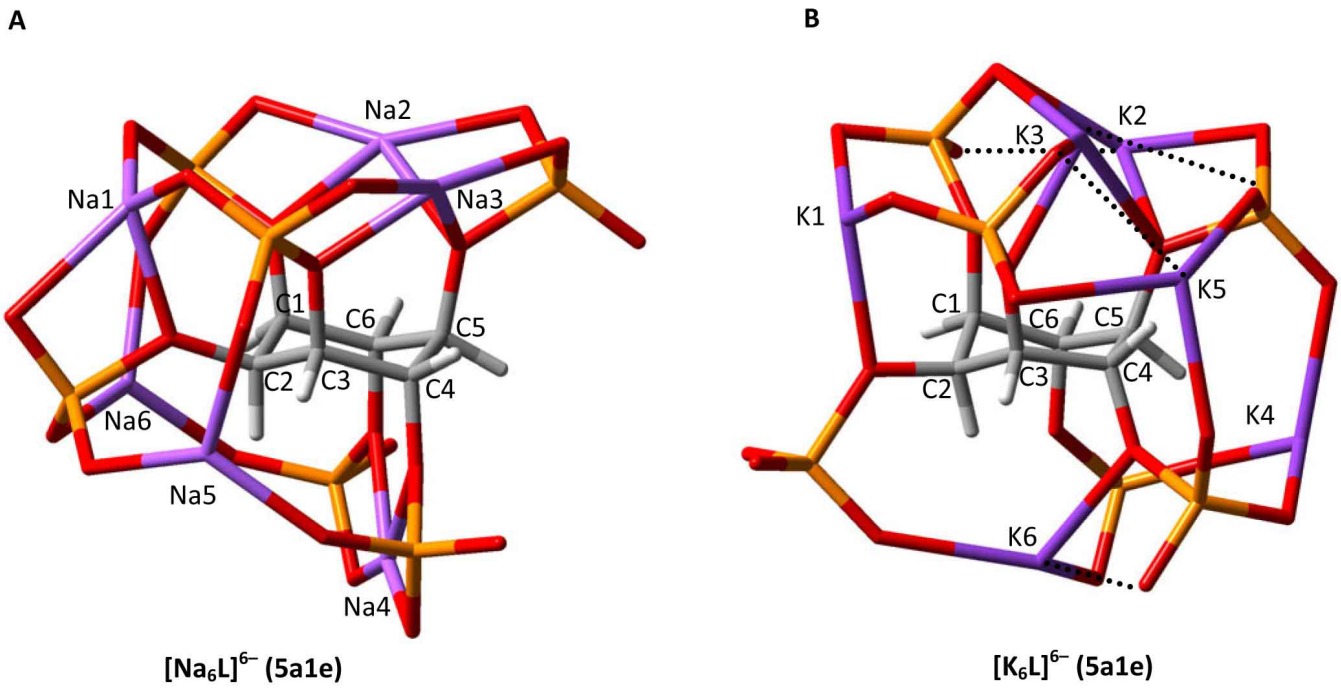


Figura 6.21. Geometrías RB3LYP/LANL2DZ optimizadas para los complejos $[Na_6L]^{6-}$ (A) y $[K_6L]^{6-}$ (B). Los enlaces a distancia metal-ligando se representan con líneas punteadas.

La siguiente especie compleja, $[K_5(H_2L)]^{5-}$, se forma por remoción de un ion K^+ y adición de dos protones sobre la especie $[K_6L]^{6-}$. De la misma forma que ocurría en presencia de sodio, los valores de $\Delta\delta_{prot}$ indican la unión de ambos protones a P2 y P5, siendo este último compartido en gran medida con P4/6. De esta forma, y dado los requerimientos espaciales para su interacción, el que estos dos grupos fosfato estén interconectados provee, al igual que ocurría en el sistema InsP_6-Na^+, de una evidencia sobre la posible ubicación del cambio conformacional del ligando en presencia de potasio, el cual operaría entre las especies $[K_5(H_2L)]^{5-}$ y $[K_6L]^{6-}$. Esta transición provoca, para valores de pH en el rango 9,4 – 10,5, el ensanchamiento y aumento leve del ruido de las señales, como se advierte de la figura 6.17A. Es en estas condiciones donde se predice, en efecto, la coexistencia de ambas especies complejas, según indica la zona resaltada en el diagrama de distribución de especies de la figura 6.18. Los cationes K^+ en la especie $[K_5(H_2L)]^{5-}$ se ubicarían, probablemente, en los huecos delimitados entre los fosfatos (“cajas”), excepto uno de los dos entre P5 y P4/6, ocupado por uno de los protones. Sin embargo, las conclusiones estructurales para este sistema son difíciles de analizar, porque como se dedujo de los resultados mostrados en las figuras 6.21A y B, los iones potasio son

suficientemente grandes como para afectar varios grupos fosfato y, por tanto, varias señales a la vez. Dado los valores de $\Delta\delta_{prot}$ para P2 y P1/3, al igual que ocurría en presencia de sodio, el protón sobre P2 podría pertenecer mayoritariamente a él, a la vez que los iones K^+ podrían prevenir a P1/3 de interaccionar con este último. De acuerdo con la variación de las señales debidas a la complejación los fosfatos más involucrados en el enlace serían P4/6 y P1/3. P5, al encontrarse protonado, es factible que se una, preferentemente, a un ion potasio. Finalmente P2 interacciona, a diferencia de lo que ocurría para las especies con Na^+, bastante menos con los iones potasio, lo que estaría indicando un corrimiento de los iones positivos sobre el ligando, hacia P1/3 y P4/6.

Siguiendo con la estrategia aplicada para el sistema ligando-Na^+, la geometría de la especie $[K_4(H_3L)]^{5-}$ puede racionalizarse en base a la sustitución de un ion K^+ por un protón en la especie compleja anterior ($[K_5(H_2L)]^{5-}$). Analizando los valores de $\Delta\delta_{prot}$, parece probable que el protón entrante se ubique espacialmente entre P1/3 y P4/6, desplazando un catión potasio de su sitio. Asimismo, el valor correspondiente a $\Delta\delta_{prot}$ para P2 es positivo, lo que posiblemente estaría dando evidencia de un rearreglo catiónico sobre el ligando, el que involucraría el acercamiento de iones K^+ hacia la zona delimitada por los grupos P1/3 y P2 y/o el alejamiento de los protones de este último. De acuerdo con esto, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ son máximos para ambos grupos. Parece factible que este efecto sea dependiente del tamaño del catión, ya que no ocurría en presencia de sodio. El cambio en el entorno del grupo fosfato en C5 es pequeño, por lo que se lo podría considerar relativamente similar al correspondiente a la especie $[K_5(H_2L)]^{5-}$.

Para finalizar, el proceso $[K_4(H_3L)]^{5-} \rightarrow [K_3(H_4L)]^{5-}$ involucra la protonación de P1/3 y la compartición de este protón con P2 (valores de $\Delta\delta_{prot}$ para ambos grupos). Esto es coherente con la eliminación de un ion potasio que se encuentre entre ambos fosfatos. En efecto, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ para ambos grupos son cercanos a cero, mientras que es máximo en el caso de P4/6. Al igual que ocurría con la especie análoga de sodio, éste es el grupo que posee un rol primordial en la unión del metal alcalino a pH cercano a la neutralidad. P2 y P5 se ven afectados parcialmente por la complejación, lo que estaría indicando cierta cooperación de su parte para con la unión de los cationes.

4. Conclusiones

Se presentaron en este capítulo los resultados del estudio del comportamiento químico-estructural del InsP_6 en ausencia y presencia de Na^+ y K^+, en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura. Se obtuvieron, para el fitato, cuatro señales bien resueltas en los espectros de RMN de ^{31}P, correspondientes a los cuatro grupos fosfatos simétricamente equivalentes de la molécula. No se observaron mesetas claras en las curvas obtenidas al graficar el desplazamiento químico δ en función del pH, lo que permite establecer que varias especies del ligando en distinto grado de protonación coexisten en el sistema. El ajuste matemático de las curvas de titulación por RMN dio como resultado el conjunto de constantes de protonación y los desplazamientos químicos individuales para las distintas formas del ligando. La variación de estos últimos debido a los procesos sucesivos de protonación permitieron extraer información estructural de las especies, la cual fue complementada con la proporcionada por el modelado molecular de las mismas. Se propusieron tres factores determinantes, cuyo peso relativo modula las estabilidades de los distintos confórmeros en fase gaseosa y, por tanto, el cambio conformacional derivado: el establecimiento de fuertes enlaces de hidrógeno, la gran repulsión electrostática que sufren los grupos ionizables a través del espacio y la tensión generada sobre las distancias y ángulos de enlace del anillo de inositol. La hidratación de las especies, por su parte, resultó ser un determinante crítico en el establecimiento del rango de pH de transición conformacional.

En este trabajo se aplicó con éxito, asimismo, el método de “expansión de clúster”, el cual permitió la determinación de las microconstantes de protonación del fitato, que junto con la información anterior brindan una caracterización completa de la secuencia de protonación.

Se presentó en este capítulo la primera caracterización espectroscópica del proceso de protonación del fitato por medidas UV-visible. La forma general de los espectros mostró la aparición de dos bandas claramente diferenciadas; una de muy baja intensidad que se extiende por encima de los 300 nm y una segunda, extremadamente absortiva, que se encuentra por debajo de este rango. El ajuste de los espectros individuales para las especies L^{12-}, HL^{11-}, H_2L^{10-} y H_3L^{9-} indicó que, al protonarse, el ligando deja de absorber progresivamente en

el rango de longitudes de onda estudiado y las bandas se desplazan hacia longitudes de onda menores. El espectro electrónico calculado del ligando en fase gaseosa está de acuerdo con esta tendencia, y permitió racionalizar el origen de cada banda y por tanto de su variación con el estado de protonación del fitato.

En presencia de los iones alcalinos, se observó un leve desplazamiento de todas las señales hacia campos bajos a pH menor a 5, fenómeno coherente con una interacción no específica ligando-metal. Por el contrario, por encima de este valor, se registró un desplazamiento significativo de las curvas, diferente para cada señal, el que evidencia procesos específicos de complejación. A medida que el pH del sistema varía, se establecen dos tipos de procesos químicos compitiendo por el ligando, los cuales presentan efectos contrapuestos sobre las señales de RMN: protonación y complejación. Para desentrañar la contribución particular de ambos, se ajustaron los datos experimentales con un modelo que logró reproducir el comportamiento químico de los espectros registrados en función del pH. Los valores determinados de desplazamiento químico para cada fosfato y el modelado computacional de los complejos detectados, permitió ahondar en las características estructurales generales de los complejos y proponer una posible secuencia de complejación. Se revisó, además, la influencia de los diversos factores estructurales sobre la energía de ambas conformaciones para las especies complejas y su contribución al cambio conformacional operativo en presencia de los iones alcalinos. Hacia medio altamente básico, el alto grado de deprotonación del ligando permite la unión de varios iones, en un esquema de unión metal – ligando cooperativo, mediado por la ubicación de los diversos cationes en huecos negativos formados por varios grupos fosfatos. En este contexto, la conformación 5a1e es muy adecuada, ya que provee de una estructura preformada que une a los centros metálicos, aliviando la repulsión interfosfato, con un mínimo de tensión estructural. A medida que disminuye el pH, la protonación del ligando va liberando progresivamente iones M^+, y el sistema comienza a priorizar la formación de enlaces de hidrógeno frente a las interacciones M^+-fosfato, dando prelación a la conformación ecuatorial.

La intensidad con la cual el ligando se asocia con el ion metálico es mayor para el Na^+, de acuerdo con una interacción de gran carácter electrostático. Además,

el esquema de complejación varía moderadamente al cambiar de ion alcalino. Los iones Na^+, más pequeños, interaccionan con los grupos fosfato con mayor intensidad y de forma más localizada. En contraposición, los iones potasio lo hacen con menor fuerza y actúan sobre varios fosfatos a la vez, distribuyéndose a lo largo de todo el ligando.

5. Referencias bibliográficas

1. Mernissi-Arifi, K.; Wehrer, C.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1994,** *55*, 263-277.
2. Felemez, M.; Marwood, R. D.; Potter, B. V. L.; Spiess, B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999,** *266*, 334-340.
3. Felemez, M.; Ballereau, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *New Journal of Chemistry* **2000,** *24*, 631-638.
4. Isbrandt, L. R.; Oertel, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1980,** *102*, 3144-3148.
5. Brigando, C.; Mossoyan, J. C.; Favier, F.; Benlian, D. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1995,** 575-578.
6. Paton, G.; Noailly, M.; Mossoyan, J. C. *Journal of Physical Organic Chemistry* **1999,** *12*, 401-407.
7. Egbewatt, A. N.; Dill, K. *Inorganica Chimica Acta* **1987,** *136*, L37-L39.
8. Champagne, E. T.; Fisher, M. S.; Hinojosa, O. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 199-215.
9. Bebot-Brigaud, A.; Dange, G.; Fauconnier, N.; Gérard, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999,** *75*, 71-78.
10. Heighton, L.; Schmidt, W. F.; Siefert, R. L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008,** *56*, 9543-9547.
11. Sala, M.; Makuc, D.; Kolar, J.; Plavec, J.; Pihlar, B. *Carbohydrate Research* **2011,** *346*, 488-494.
12. Riley, A. M.; Trusselle, M.; Kuad, P.; Borkovec, M.; Cho, J.; Choi, J. H.; Qian, X.; Shears, S. B.; Spiess, B.; Potter, B. V. L. *ChemBioChem* **2006,** *7*, 1114-1122.
13. Dozol, H.; Blum-Held, C.; Guedat, P.; Maechling, C.; Lanners, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Molecular Structure* **2002,** *643*, 171-181.
14. Guédat, P.; Schlewer, G.; Krempp, E.; Riley, A. M.; Potter, B. V. L.; Spiess, B. *Chemical Communications* **1997,** 625-626.
15. Blum-Held, C.; Bernard, P.; Spiess, B. *Journal of the American Chemical Society* **2001,** *123*, 3399-3400.
16. Barrientos, L. G.; Murthy, P. P. N. *Carbohydrate Research* **1996,** *296*, 39-54.
17. Volkmann, C. J.; Chateauneuf, G. M.; Pradhan, J.; Bauman, A. T.; Brown, R. E.; Murthy, P. P. N. *Tetrahedron Letters* **2002,** *43*, 4853-4856.
18. Johnson, L. F.; Tate, M. E. *Canadian Journal of Chemistry* **1969,** *47*, 73.
19. Costello, A. J. R.; Glonek, T.; Myers, T. C. *Carbohydrate Research* **1976,** *46*, 159-171.
20. Emsley, J.; Niazi, S. B. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements* **1981,** *10*, 401-407.
21. Bieth, H.; Spiess, B. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* **1986,** *182*, 1935-1943.
22. Bauman, A. T.; Chateauneuf, G. M.; Boyd, B. R.; Brown, R. E.; Murthy, P. P. N. *Tetrahedron Letters* **1999,** *40*, 4489-4492.
23. Champagne, E. T.; Robinson, J. W.; Gale, R. J. *Analytical Letters* **1985,** *18*, 2421-2443.
24. Borkovec, M.; Koper, G. J. M. *Analytical Chemistry* **2000,** *72*, 3272-3279.
25. Horsley, W. J.; Sternlicht, H. *Journal of the American Chemical Society* **1968,** *90*, 3738-3748.
26. Moedritzer, K. *Inorganic Chemistry* **1967,** *6*, 939.
27. Foresman, J. B.; Frisch, A. *Exploring chemistry with electronic structure methods;* second ed.; Gaussian, Inc.: Pittsburgh,PA, 1996.
28. Day, G.; Glaser, R.; Shimomura, N.; Takamuku, A.; Ichikawa, K. *Chemistry - A European Journal* **2000,** *6*, 1078-1086.

Capítulo 7

Estudio estructural en solución de los sistemas InsP_6-M^{2+}/M^{3+}

En este capítulo se completa el estudio termodinámico y estructural de las especies complejas solubles presentes en los sistemas InsP_6-ion metálico. Se analiza en detalle la interacción del ligando con los iones Mg^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}, mediante la evaluación de los resultados obtenidos de la aplicación de espectroscopía de RMN de ^{31}P y UV-visible, en función del pH y la concentración de los componentes del sistema. A partir de esta discusión se amplía la información brindada por el análisis potenciométrico, y se proponen, en base al tratamiento de los datos espectroscópicos, posibles modos de coordinación, geometrías del entorno de coordinación, conformación adoptada por el ligando en los complejos y otros parámetros estructurales que caracterizan las propiedades de complejación intrínsecas del fitato frente a iones di y trivalentes.

1. Introducción

A lo largo de esta tesis se han planteado argumentos que apoyan la importancia que posee en diversos campos la información químico-estructural de los sistemas conteniendo fitato e iones metálicos. Dentro de este enfoque dual del comportamiento del InsP_6, las técnicas espectroscópicas UV-visible y de RMN han probado ser metodologías muy adecuadas, aportando información complementaria a la obtenida por métodos de análisis estrictamente termodinámico, como la potenciometría de alta resolución. Los primeros trabajos en abordar el tema fueron publicados por Martin y Evans[1-3]. En estos reportes, se proponen relaciones estequiométricas metal-ligando tentativas para los complejos solubles del fitato con iones M^{2+}, en base a la evaluación de la influencia del metal sobre las curvas potenciométricas del ligando. A partir de aquí, los autores extraen información sobre el rango de pH

en donde se verifica la complejación metálica y por comparación con los datos estructurales del ligando aportados por Emsley y Niazi[4], postulan el confórmero (5a1e ó 1a5e) que se une a cada ion metálico. De esta manera, los resultados marcan que la conformación 5a1e es más adecuada para la complejación de los iones Ca^{2+} y Ni^{2+} [1,3], mientras que la 1a5e es la forma predominante en los complejos conteniendo Co^{2+} y Cu^{2+} [2,3]. Desafortunadamente, dado que las conclusiones de Emsley y Niazi fueron rebatidas a posteriori (ver referencias en capítulo 6), la información estructural anterior perdió rápidamente apoyo experimental.

Los siguientes trabajos en el tema, impulsados por Champagne y sus colaboradores[5,6], se basaron en medidas directas de los espectros de RMN de ^{13}C y ^{31}P del fitato, en presencia y en ausencia de iones metálicos. Según sus resultados, el ion Zn^{2+} muestra una leve preferencia por el grupo fosfato en C5, mientras que P4/6 estaría relacionado con la asociación del Cu^{2+}. Basados en consideraciones de cooperativismo en la unión y en la variación de la solubilidad de las fases sólidas correspondientes con la fuerza iónica, los autores proponen que los iones cinc son coordinados, a pH = 7, preferentemente por el confórmero 5a1e, incluso cuando en estas condiciones posee una concentración ínfima en solución[5]. En el caso del ion Ca^{2+}, la variación en los desplazamientos químicos indica que se une a los fosfatos P5 y P4/6, pero a diferencia de lo discutido por Martin y Evans[1], se propone una conformación 1a5e del complejo correspondiente[6]. De forma interesante, en este trabajo posterior los mismos investigadores no encuentran, a diferencia de lo presentado más arriba, ninguna indicación clara de sitios preferenciales de unión del ion Zn^{2+} sobre el fitato.

En el año 1999, Bebot-Brigaud *et al*.[7] reportaron un estudio potenciométrico y espectroscópico por medidas UV-visible y de RMN de ^{31}P de los sistemas fitato-M(II), para algunos metales de transición d. En él, se concluye que los fenómenos asociados a la variación de las curvas de desplazamiento químico con el pH para el ion Zn^{2+} son complejos, por lo que los investigadores centran la discusión en la evaluación cualitativa de los espectros. En este contexto, para pH por debajo de 5, el ion metálico parece asociarse preferentemente a los fosfatos deprotonados en posición 2 ó 5, en un esquema de unión monocoordinado. Por el contrario, en el rango de pH 5 - 9, la deprotonación de

los grupos P1/3 y P4/6 lo haría asociarse con los grupos P2-P1/3 ó P5-P4/6 de forma bidentada. De éstos, la primera opción parece ser la principal, por las importantes variaciones en los desplazamientos químicos de las señales correspondientes. Este reporte da cuenta, además, del estudio espectroscópico UV-visible del sistema InsP_6-Co^{2+} en función del pH. Mediante inspección visual de los espectros, los autores concluyen que, probablemente, el centro metálico posee geometría tetraédrica en los complejos $[Co(H_2L)]^{8-}$ y $[Co(H_3L)]^{7-}$, mientras que es octaédrica en $[Co(H_4L)]^{6-}$, $[Co(H_5L)]^{5-}$, $[Co(H_6L)]^{4-}$ y $[Co(H_7L)]^{3-}$.

Finalmente, otra estrategia aplicada es la variación de los tiempos de relajación de los núcleos de fósforo o carbono en presencia de iones paramagnéticos. De esta manera se ha propuesto que el sitio de coordinación del ion Mn^{2+}, a pH = 7,3, estaría asociado al grupo P2 del fitato, aunque no existen aún detalles adicionales sobre el patrón de complejación asociado[8]. Por su parte, un reporte muy reciente[9], publicado posteriormente al inicio de esta tesis, indica que los sitios de interacción preferencial del ion Fe^{3+} sobre el InsP_6, en medio neutro donde fue posible interpretar los datos experimentales, corresponden a P1/3 y P2.

Los trabajos citados hasta aquí comparten algunas características en común. En primer término, basan su análisis estructural en un tratamiento cualitativo o semicuantitativo de los datos experimentales, usualmente llevado a cabo por simple inspección o comparación del comportamiento del ligando en presencia o ausencia de los iones considerados. En este sentido, algunos evaden la caracterización química de los complejos formados (estequiometrías, estado de protonación, carga, predominancias, etc.)[1-3,5,6,8], mientras que otros identifican las especies[7,9] pero el tratamiento de los datos experimentales no brinda la posibilidad de un análisis dirigido de los aspectos estructurales de cada una. Por otra parte, las condiciones empleadas son variadas y en todos los casos se apartan de las condiciones fisiológicas. Un grupo de reportes conduce sus experimentos a 25 °C en presencia de altas concentraciones de ion alcalino[1-3,5,6], el que interactúa de forma sustancial con el ligando, otro en un medio no interactuante y a 27 °C [7], y el resto sin ajuste de fuerza iónica[8,9].

En este marco, se exponen en este capítulo los resultados del análisis químico-estructural en solución de los sistemas fitato-M(II)/M(III). Siguiendo la misma estrategia metodológica del capítulo anterior, los experimentos fueron

conducidos en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura.

2. Parte experimental

El comportamiento químico del InsP_6 en ausencia y en presencia de iones metálicos fue analizado por RMN de ^{31}P, a 37,0 °C en NMe_4Cl 0,15 M, de acuerdo con las condiciones citadas en el capítulo 4. Las concentraciones utilizadas de ligando y metal fueron: InsP_6-Mg^{2+} ([L] = 1,99 mM, [Mg] = 1,99 mM), InsP_6-Ca^{2+} ([L] = 2,05 mM, [Ca] = 2,03 mM), InsP_6-Co^{2+} ([L] = 10,04 mM, [Co] = 4,98 mM), InsP_6-Ni^{2+} ([L] = 10,04 mM, [Ni] = 4,99 mM), InsP_6-Zn^{2+} ([L] = 2,00 mM, [Zn] = 1,00 mM) e InsP_6-Fe^{3+} ([L] = 2,10 mM, [Fe] = 0,96 mM). La asignación de los espectros en presencia de metal se realizó, en general, por comparación con los espectros del ligando. En algunos casos, dada la complejidad del sistema en estudio, se hizo necesaria la realización de experimentos adicionales con concentración de metal variable, a pH constante, para confirmar el esquema de asignación propuesto. En estas corridas, alícuotas de una solución del ion metálico se agregaron a una del ligando cuyo pH se ajustó previamente con NMe_4OH. El pH se mantuvo constante en todo momento por agregado de HCl o NMe_4OH. Para el sistema InsP_6-Fe(III) se tuvieron en cuenta, al momento del ajuste las constantes de formación, las constantes de hidrólisis de formación de los complejos $[Fe(OH)]^{2+}$ y $[Fe(OH)_2]^{+}$ determinadas en esta tesis y la correspondiente a la especie $Fe(OH)_3$ estimada por las ecuaciones de Liu *et al*. [10].

El estudio espectroscópico UV-visible del comportamiento del ligando en presencia de iones metálicos fue realizado en las condiciones mencionadas en el capítulo 4. Se registraron los espectros en presencia de Fe(III), Co(II), Ni(II) y Cu(II) en el rango visible. La concentración de metal y la relación metal:ligando se fijaron en cada sistema de modo de optimizar el compromiso entre la solubilidad y la obtención de valores de absorbancia adecuados para el ajuste. Las condiciones para cada sistema fueron Co^{2+}([L] = 9,98 mM, [M] = 4,94 mM), Ni^{2+}([L] = 9,97 mM, [M] = 4,96 mM), Cu^{2+}([L] = 10,1 mM, [M] = 2,58 mM). Se utilizó un camino óptico de 1 cm, un ancho de rendija de 5 nm y se usó como referencia una solución de NMe_4Cl 0,15 M.

3. Resultados y discusión

3.1. Sistema InsP_6-Mg^{2+}

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{31}P correspondientes a este sistema se muestran en la figura 7.1A. Se observan cuatro señales bien resueltas en medio ácido, correspondientes a los cuatro grupos fosfato simétricamente equivalentes: P5, P4/6, P1/3 y P2. Las mismas se desplazan a campos mayores con la protonación del ligando, debido al fenómeno electrónico protón-grupo fosfato discutido en el capítulo anterior.

La asignación de este sistema es bastante compleja, debido a que las bandas se ensanchan y varían su posición de forma sustancial en un rango de pH estrecho. El esquema de asignación aplicado en medio ácido sigue el orden encontrado para el ligando. Para confirmar la asignación en medio básico, realizada a partir del seguimiento de las señales con el pH, se efectuaron corridas a pH = 12,4 (constante), con concentración de fitato fija y de metal variable. Los resultados se muestran en la figura 7.2. Con la adición de magnesio, las bandas del ligando se desplazan haciendo que las señales correspondientes a P1/3 y P4/6 intercambien incluso su posición. En particular, observando el espectro correspondiente a condiciones 1:1 metal ligando ([L] = 1,9 mM, [Mg] = 2,08 mM]), es posible una asignación inequívoca en el rango básico de los espectros de la figura 7.1A. El orden de las señales es, en el sentido de aumento del campo, P2, P5, P4/6 y P1/3.

En base a esto, en la figura 7.1B, se realiza una comparación entre los desplazamientos químicos obtenidos en ausencia y presencia de Mg^{2+}, para una relación metal:ligando 1:1. Los espectros son muy similares a pH ≈ 2, pero se apartan gradualmente al aumentar el pH. Este fenómeno está indicando que los procesos de complejación operan aún en medios fuertemente ácidos. Asimismo, las curvas en presencia de metal varían tanto por encima como por debajo de las del ligando, haciendo que se crucen entre sí para todos los grupos fosfato. Este comportamiento no se registraba en presencia iones alcalinos, lo que sugiere una diferencia en la interacción ligando-metal entre ambos tipos de sistemas. El ajuste de las curvas correspondientes a este sistema arroja los resultados resumidos en la tabla 7.1.

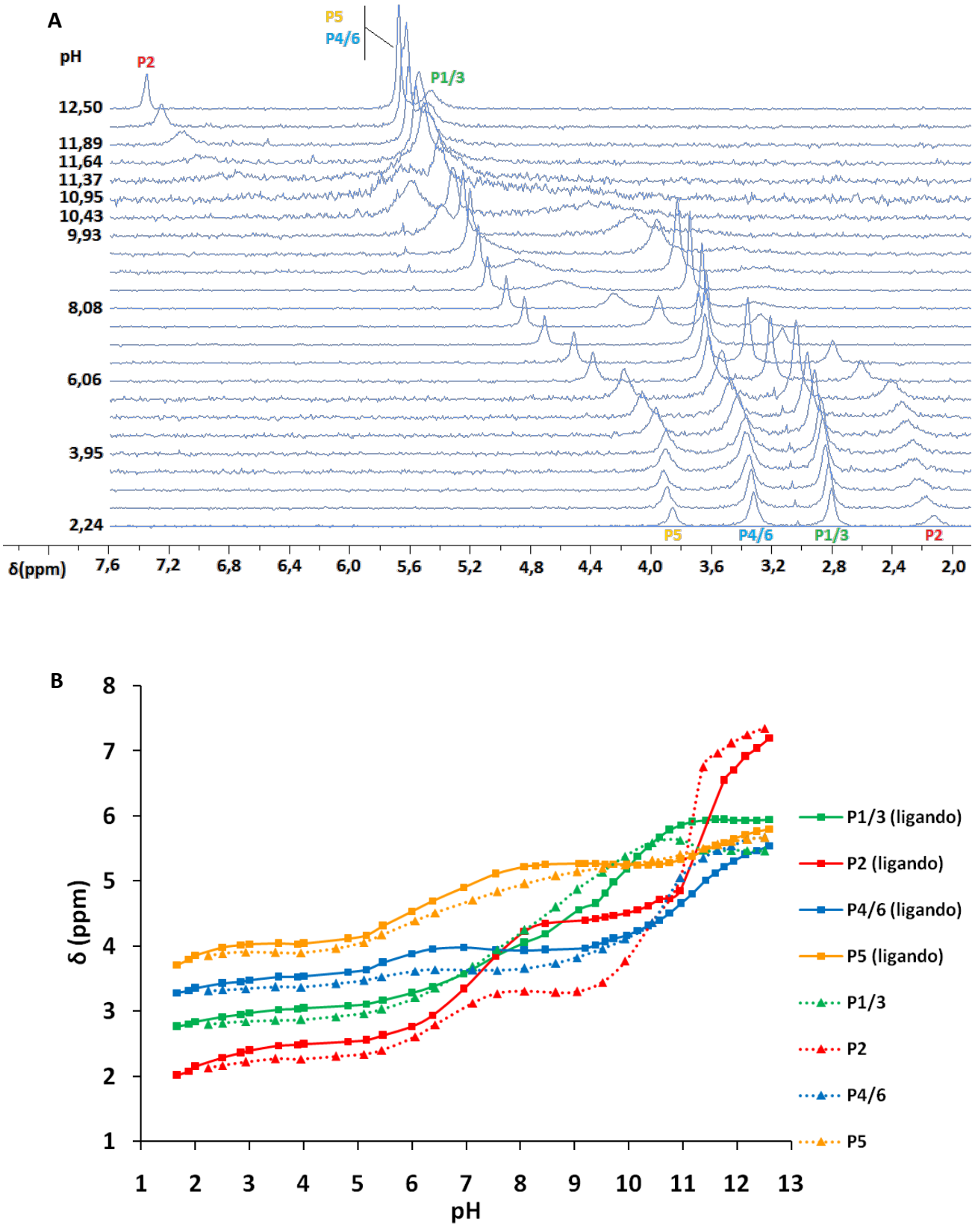


Figura 7.1. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Mg^{2+} en función del pH a 37,0 ˚C e I = 0,15 M ([L] = 1,99 mM, [Mg^{2+}] = 1,99 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Mg^{2+} (líneas discontinuas).

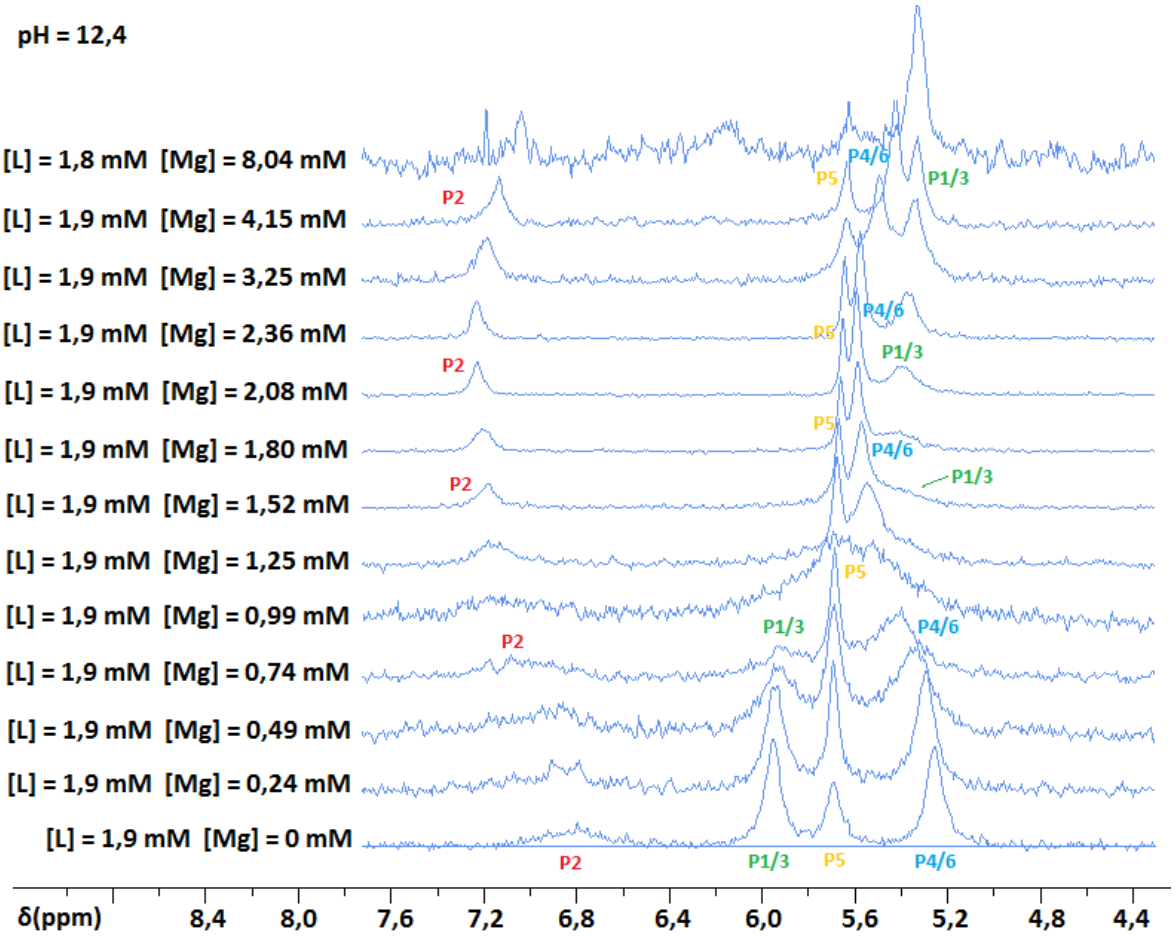


Figura 7.2. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Mg^{2+} en función de la concentración de metal y ligando, a pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Mediante espectroscopía de RMN es posible el ajuste de un modelo teórico de especies con seis procesos de complejación, los que dan a lugar a seis complejos de estequiometria 1:1 ligando:metal, en diverso grado de protonación. Según se muestra en la figura 7.3, los mismos son detectados en todo el rango de pH de estudio, siendo $[Mg(H_4L)]^{6-}$ la especie predominante a pH fisiológico.

Para completar el análisis espectroscópico de este sistema es necesario analizar el comportamiento del mismo en presencia de exceso de metal. De vuelta en la figura 7.2, si se observan en detalle los espectros se advierte que al continuar el agregado de magnesio hasta relación 2:1 (metal:ligando), las bandas cambian moderadamente y de forma sistemática. Esto denota, de acuerdo con lo discutido anteriormente, la formación mayoritaria de la especie 1:1 monoprotonada.

Tabla 7.1. Logaritmo de las constantes globales de formación ajustadas para los sistemas InsP_6-M(II) estudiados, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Metal	Equilibrio	log K_{RMN} [a]	σ (RMN)	log K_{UV-vis} [b]	σ (UV-vis)
Mg(II)	$Mg^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Mg(HL)]^{9-}$	5,55(4)	0,026	---	---
	$Mg^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Mg(H_2L)]^{8-}$	5,84(4)		---	
	$Mg^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Mg(H_3L)]^{7-}$	5,86(2)		---	
	$Mg^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Mg(H_4L)]^{6-}$	5,58(3)		---	
	$Mg^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Mg(H_5L)]^{5-}$	5,38(3)		---	
	$Mg^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Mg(H_6L)]^{4-}$	4,84(2)		---	
	$5\ Mg^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Mg_5(H_2L)]$	---		---	
Ca(II)	$4\ Ca^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [Ca_4L]^{4-}$	16,2(3)	0,041	---	---
	$3\ Ca^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [Ca_3L]^{6-}$	13,9(2)		---	
	$2\ Ca^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [Ca_2L]^{8-}$	9,9(1)		---	
	$Ca^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [CaL]^{10-}$	6,48(7)	0,021	---	
	$Ca^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Ca(HL)]^{9-}$	6,68(7)		---	
	$Ca^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Ca(H_2L)]^{8-}$	6,27(6)		---	
	$Ca^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Ca(H_3L)]^{7-}$	5,62(7)		---	
	$Ca^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Ca(H_4L)]^{6-}$	5,26(7)		---	
	$Ca^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Ca(H_5L)]^{5-}$	5,01(7)		---	
	$Ca^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Ca(H_6L)]^{4-}$	4,24(5)		---	
Co(II)	$Co^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [CoL]^{10-}$	7,4(1)	0,039	---	0,018
	$Co^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Co(HL)]^{9-}$	8,2(1)		8,7(4)	
	$Co^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Co(H_2L)]^{8-}$	---		8,5(4)	
	$Co^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Co(H_3L)]^{7-}$	---		8,37(4)	
	$Co^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Co(H_4L)]^{6-}$	---		6,48(4)	
Ni(II)	$Ni^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [NiL]^{10-}$	8,7(2)	0,043	---	0,0015
	$Ni^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Ni(HL)]^{9-}$	8,9(2)		12,6(4)	
	$Ni^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Ni(H_2L)]^{8-}$	9,0(2)		13,7(4)	
	$Ni^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Ni(H_3L)]^{7-}$	---		11,2(3)	
	$Ni^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Ni(H_4L)]^{6-}$	---		8,5(3)	
Cu(II)	$Cu^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Cu(H_2L)]^{8-}$	---	---	9,4(2)	0,026
	$Cu^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Cu(H_3L)]^{7-}$	---		9,37(1)	

	$Cu^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Cu(H_4L)]^{6-}$	---		6,88(1)	
	$5\ Cu^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Cu_5(H_2L)]$	---		34,4(3)	
Zn(II)	$3\ Zn^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [Zn_3L]^{6-}$	18,77(8)	0,031	---	---
	$2\ Zn^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [Zn_2L]^{8-}$	12,70(5)		---	
	$Zn^{2+} + L^{12-} \leftrightarrow [ZnL]^{10-}$	6,1(1)	0,034	---	---
	$Zn^{2+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Zn(HL)]^{9-}$	7,0(1)		---	
	$Zn^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Zn(H_2L)]^{8-}$	7,4(1)		---	
	$Zn^{2+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Zn(H_3L)]^{7-}$	6,9(1)		---	
	$Zn^{2+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Zn(H_4L)]^{6-}$	5,83(7)		---	
	$Zn^{2+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Zn(H_5L)]^{5-}$	5,5(2)		---	
	$Zn^{2+} + H_6L^{6-} \leftrightarrow [Zn(H_6L)]^{4-}$	4,0(1)		---	
	$5\ Zn^{2+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Zn_5(H_2L)]$	---		---	

[a] Resultados espectroscópicos por RMN. [b] Resultados espectroscópicos por medidas UV-visible.

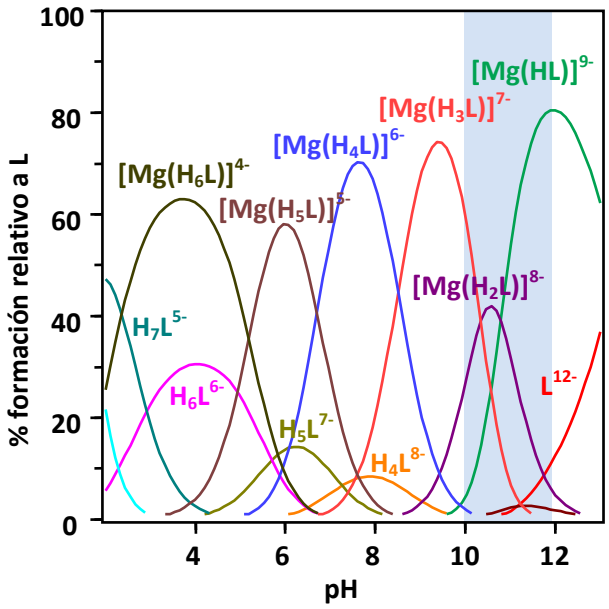


Figura 7.3. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Mg^{2+} en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 1,99 mM, [Mg^{2+}] = 1,99 mM). Se resalta la zona de transición conformacional.

Si se agrega una cantidad en exceso de metal hasta relación 4:1 (metal:ligando), estando el sistema por debajo de la saturación, el espectro

cambia de forma importante, a la vez que aumenta el ruido espectral. Aparentemente, alguna especie soluble se ha formado en el sistema, y es apreciable sólo a grandes relaciones metal:ligando. Si se amplía el rango de estudio, de relación metal-ligando 1:1 (ausencia de fase sólida) hasta 5:1 (sistema que presenta un sólido en suspensión en forma de opalescencia), se obtienen los espectros de la figura 7.4. A medida que se incrementa la concentración del metal, por encima de relación metal:ligando 2:1, la banda señalada en verde (P1/3) se fusiona con su vecina, mientras que aparece en el sistema una quinta banda bastante ancha señalada en rojo. Dado que se detecta la presencia de más de cuatro señales es factible que una nueva especie esté formándose en el sistema, con una velocidad lenta de interconversión con la especie 1:1 existente ($[Mg(HL)]^{9-}$). En presencia de un gran exceso de metal, los espectros tienden hacia una distribución de las bandas idéntica en desplazamientos químicos e intensidad a la obtenida en el espectro con mayor concentración de magnesio de la figura 7.2. Más aún, este esquema no corresponde a la especie totalmente deprotonada del ligando ni a la especie 1:1 detectada en estas condiciones (comparar figuras 7.2 y 7.4).

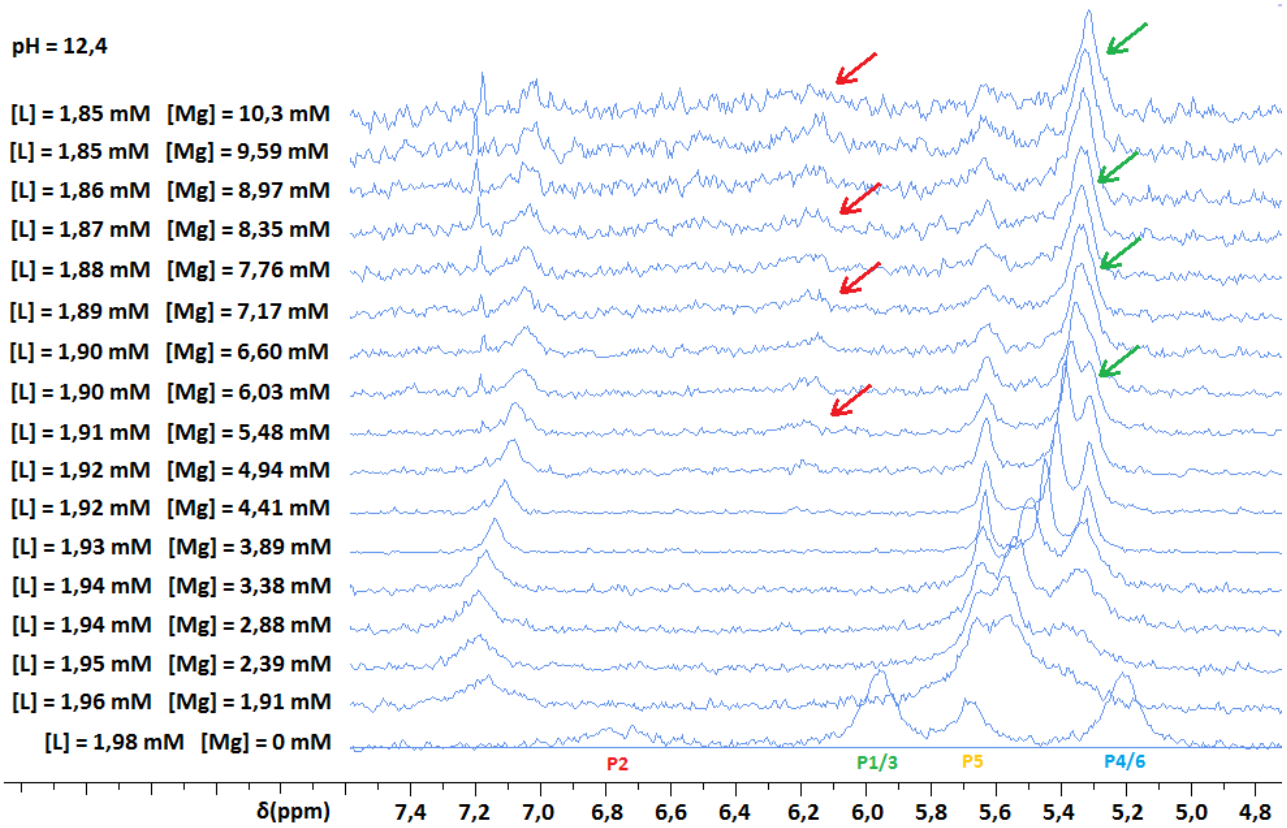


Figura 7.4. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Mg^{2+} en función de la concentración de metal y ligando, a pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Para extraer más información sobre la identidad de esta nueva especie, la cual es predominante en presencia de exceso de ion metálico, se comparan su espectro en solución (espectro superior en la figura 7.2) con otro correspondiente al filtrado de una suspensión obtenida de agregar cloruro de magnesio en exceso (10 veces de metal respecto del ligando) a una solución 8,7 mM de InsP_6 (pH final = 12,4). Los resultados, resumidos en la figura 7.5, muestran una coincidencia en el patrón de distribución de las señales. De esta manera, parece probable que esta nueva especie sea aquella que coexiste con el sólido en condiciones de exceso del metal. Una hipótesis a manejar involucra al complejo neutro [$Mg_5(H_2L)$], el cual, según ha sido reportado, coexiste con el sólido de la misma estequiometría[11,12]. El mismo tendería a agregarse en el punto de saturación para dar lugar a la fase sólida amorfa.

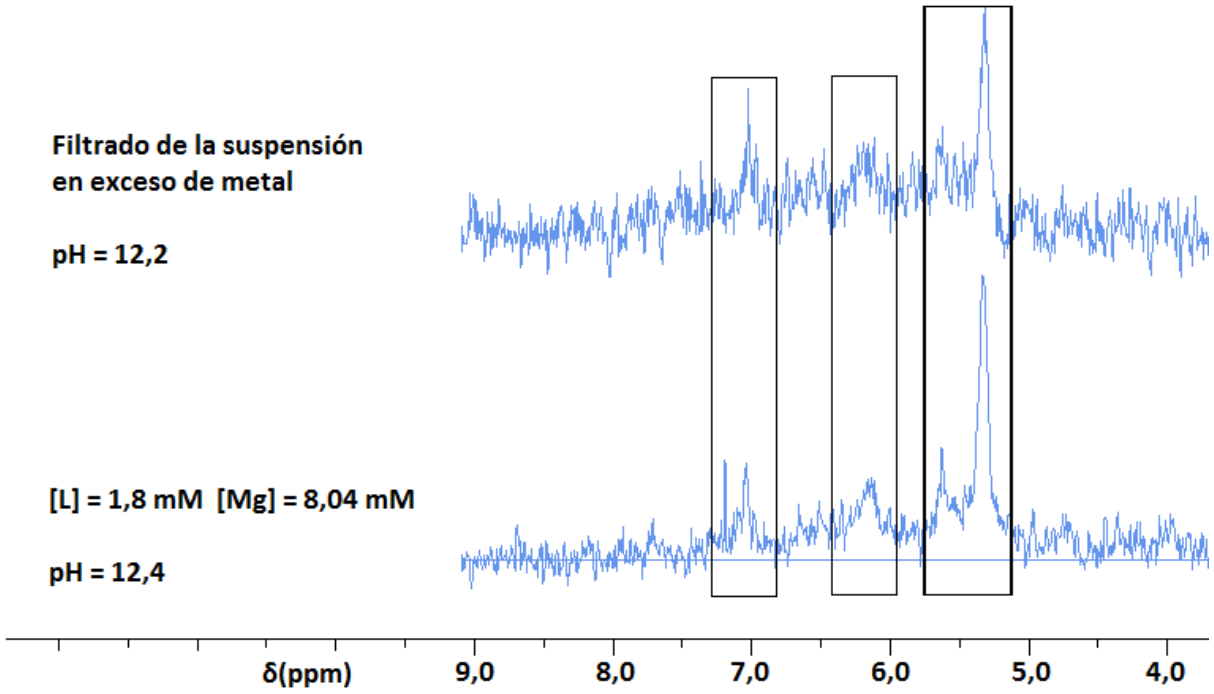


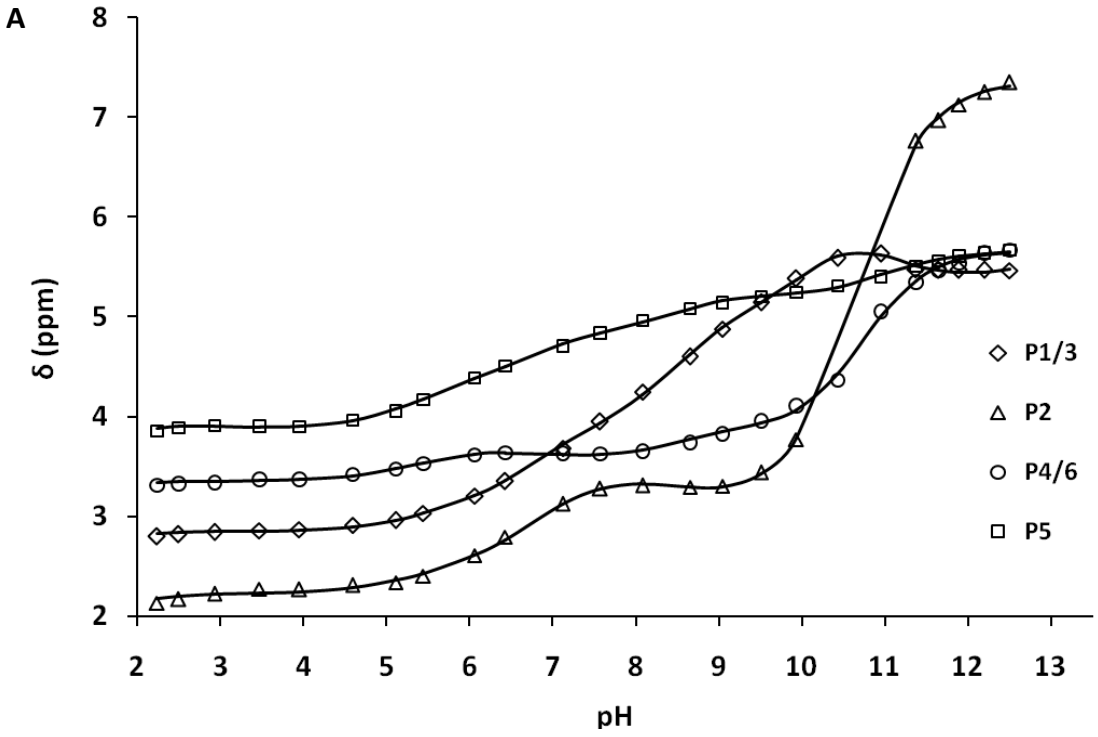
Figura 7.5. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Mg^{2+} de una solución con exceso de ion metálico y del filtrado de una suspensión de fitato de magnesio (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Así, como se puede ver en la figura 7.6A, los valores de constantes de equilibrio ajustadas (tabla 7.1) permiten reproducir de forma satisfactoria la variación en el desplazamiento químico de las señales con el pH de los espectros de la figura

7.1. A partir de esta información es posible la estimación de los desplazamientos químicos individuales y, en base a ellos, su variación en los procesos de protonación sucesiva de la especie compleja ($\Delta\delta_{prot}$), en el proceso de complejación tomando como punto de partida la especie correspondiente del ligando ($\Delta\delta_{compl}$) y en el proceso global desde la forma totalmente deprotonada del ligando ($\Delta\delta_L$). Los valores correspondientes se muestran en la tabla 7.2.

Según reportes anteriores, el análisis de estas magnitudes es bastante complejo, ya que la adición de un ion metálico a soluciones de fitato produce dos efectos contrapuestos sobre los desplazamientos químicos de las señales: (i) un efecto de disminución del campo por desplazamiento de los protones unidos a los grupos fosfato y (ii) un efecto de aumento del campo por la complejación del ion metálico [7]. En este marco, un estudio detallado de la variación de las señales con el pH se vuelve imposible. Al margen de esto, las tendencias generales en los valores de $\Delta\delta$ revelan información interesante sobre las características estructurales del sistema.

La asociación de la especie completamente deprotonada del ligando con el ion magnesio y un protón, para formar el complejo $[Mg(HL)]^{9-}$, afecta principalmente a los fosfatos en posición 1/3 y 5, como lo evidencian los valores negativos de $\Delta\delta_L$. Para que esto sea posible, ambos grupos deben estar cercanos en el espacio, de forma de compartir ambos iones positivos, lo que está en concordancia con la conformación 5a1e para la especie. En efecto, los valores de $\Delta\delta_L$ son en general pequeños, lo que está de acuerdo con un estado conformacional similar al de la especie L^{12-}. Es viable, entonces, que el magnesio esté unido directamente a los fosfatos axiales 1 y 3, mientras que un protón se comparte entre los fosfatos 1/3 y 5 (figura 7.6B). Los valores ajustados de $\Delta\delta_{compl}$ son compatibles con el modelo anterior, siendo los fosfatos sobre C1 y C3 los más afectados por la complejación. Es de destacar el gran valor de este parámetro para los fosfatos en posición 2 y 4/6, el cual se explica debido al rearreglo protónico experimentado por el ligando desde la especie HL^{11-} a la especie $[Mg(HL)]^{9-}$. En este proceso, un protón migra desde el espacio entre ambos fosfatos hacia P1/3, provocando un efecto sustancial de disminución del campo.



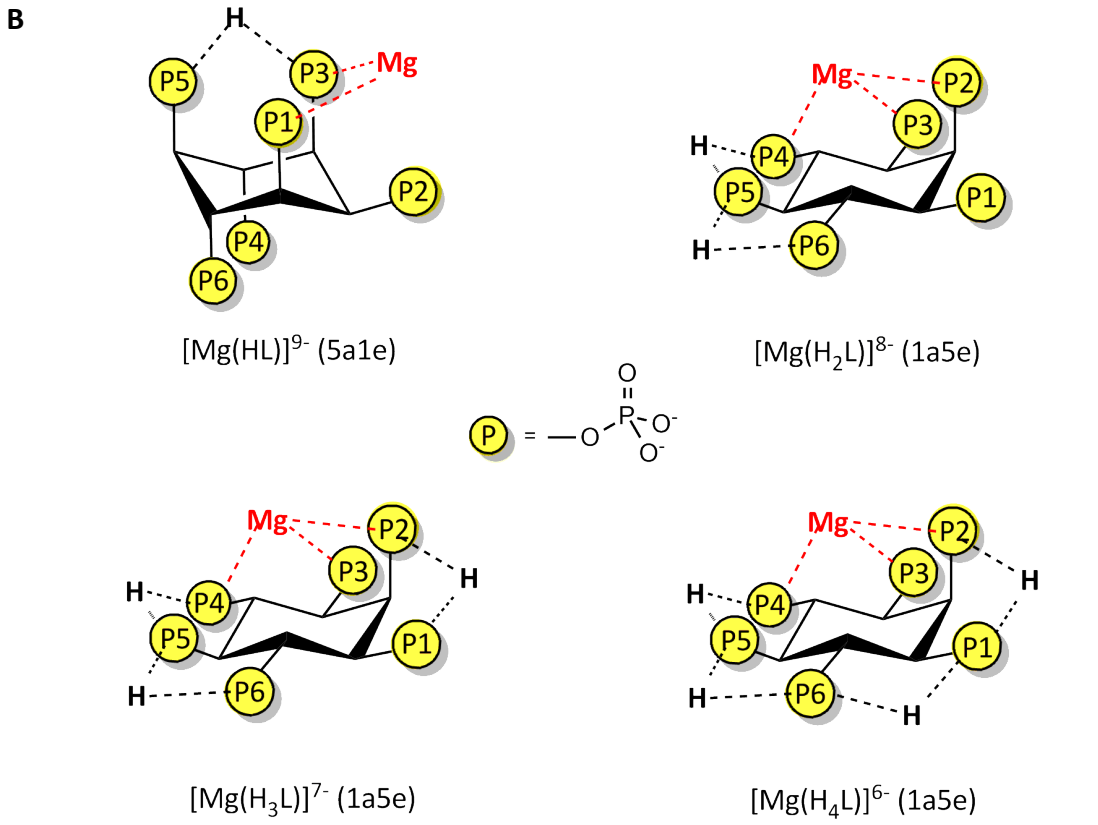


Figura 7.6. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema InsP_6-Mg^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Mg^{2+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

Tabla 7.2. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$, $\Delta\delta_{comp}$ (a partir de la especie del ligando correspondiente) y $\Delta\delta_L$ (determinado a partir de la especie totalmente deprotonada del ligando) para el sistema InsP_6-Mg^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{9-}$	5,315	7,416	5,720	5,629
$[Mg(H_2L)]^{8-}$	6,124	4,934	4,317	5,198
$[Mg(H_3L)]^{7-}$	5,158	3,089	3,902	5,246
$[Mg(H_4L)]^{6-}$	3,934	3,297	3,534	4,817
$[Mg(H_5L)]^{5-}$	3,063	2,453	3,593	4,291
$[Mg(H_6L)]^{4-}$	2,751	2,105	3,262	3,800
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{9-}$	---	---	---	---
$[Mg(H_2L)]^{8-}$	0,809	-2,482	-1,403	-0,431
$[Mg(H_3L)]^{7-}$	-0,965	-1,845	-0,415	0,048
$[Mg(H_4L)]^{6-}$	-1,225	0,208	-0,367	-0,429
$[Mg(H_5L)]^{5-}$	-0,870	-0,844	0,059	-0,526
$[Mg(H_6L)]^{4-}$	-0,313	-0,349	-0,331	-0,492
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{9-}$	-0,551	3,806	1,381	0,602
$[Mg(H_2L)]^{8-}$	0,097	0,049	-0,234	-0,100
$[Mg(H_3L)]^{7-}$	0,415	-1,274	-0,066	-0,002
$[Mg(H_4L)]^{6-}$	-0,141	-1,097	-0,373	-0,476
$[Mg(H_5L)]^{5-}$	-0,294	-0,380	-0,463	-0,471
$[Mg(H_6L)]^{4-}$	-0,299	-0,394	-0,280	-0,225
	$\Delta\delta_L$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{9-}$	-0,637	0,112	0,184	-0,165
$[Mg(H_2L)]^{8-}$	0,172	-2,370	-1,220	-0,596
$[Mg(H_3L)]^{7-}$	-0,794	-4,215	-1,635	-0,548
$[Mg(H_4L)]^{6-}$	-2,018	-4,007	-2,002	-0,977

$[Mg(H_5L)]^{5-}$	-2,889	-4,851	-1,943	-1,503
$[Mg(H_6L)]^{4-}$	-3,201	-5,199	-2,274	-1,995

La protonación de esta especie compleja da lugar a $[Mg(H_2L)]^{8-}$, y en el proceso los valores de $\Delta\delta_{prot}$ varían de forma importante. Los fosfatos más afectados resultan ser P2, P4/6 y P5, mientras que P1/3 posee un valor de $\Delta\delta_{prot}$ significativamente alto. Este cambio tan marcado en las señales sería consistente con un rearreglo interno de los protones y el magnesio sobre el ligando, de acuerdo con un posible cambio conformacional, que permita que los fosfatos en C2, C4/6 y C5 participen ahora activamente en la unión de los iones Mg^{2+} y H^+. Evidencia de este posible cambio conformacional se obtiene también de los valores de Δδ del proceso de complejación del magnesio por la especie H_2L^{10-}. En este caso, todos los valores son bastante pequeños, lo que da cuenta del mismo estado conformacional tanto para la forma protonada del ligando como su complejo. Se propone, entonces, un cambio conformacional operativo desde el estado 5a1e a 1a5e entre las especies complejas $[Mg(HL)]^{9-}$ y $[Mg(H_2L)]^{8-}$. Según los diagramas de distribución de especies de la figura 7.3, ambas especies coexisten en el rango de pH 10 – 12, donde ocurre, como era de esperarse, el ensanchamiento y movimiento apreciable de alguna de las señales en los espectros de la figura 7.1. Si se observan en general los valores de $\Delta\delta_L$, a partir de la especie diprotonada sus valores resultan muy negativos y disminuyen sistemáticamente con la protonación sucesiva, por lo que se predice que el estado 1a5e se mantenga a lo largo del resto de los complejos 1:1, desde $[Mg(H_2L)]^{8-}$ hasta $[Mg(H_6L)]^{4-}$.

Teniendo en cuenta el estado 1a5e para $[Mg(H_2L)]^{8-}$ y dado los valores relativos de Δδ para la protonación y complejación podría proponerse un esquema de unión del magnesio que involucre a los fosfatos en C2, C1/3 y C4/6, mientras que los protones se ubican entre P5 y P4/6 (figura 7.6B). De esta forma, los fosfatos más afectados en la transformación $[Mg(HL)]^{9-} \rightarrow [Mg(H_2L)]^{8-}$ serían P2 y P4/6 (menores valores de $\Delta\delta_{prot}$), mientras que P1/3 se deprotona y se aleja en promedio del ion magnesio (valor positivo de $\Delta\delta_{prot}$). Asimismo, este patrón de complejación permite que en el proceso $H_2L^{10-} \rightarrow [Mg(H_2L)]^{8-}$ el grupo fosfato más afectado sea P4/6, que ahora además de unirse al protón se asocia al ion magnesio. P5 se rodea entonces de dos protones, los cuales se han

desplazado hacia él debido a la unión del catión metálico, lo que genera una leve baja en el valor de $\Delta\delta_{compl}$. Adicionalmente, es de esperar que los valores de $\Delta\delta_{prot}$ para P2 y P1/3 no varíen significativamente con la complejación, ya que la asociación del Mg^{2+} desplaza a un protón que en la especie H_2L^{10-} se encontraba entre ambos grupos fosfato.

Los valores de $\Delta\delta_{prot}$ indican que el tercer protón se ubica en la especie $[Mg(H_3L)]^{7-}$ sobre P2, siendo compartido en cierto grado con P1/3 (figura 7.6B). Esto debe provocar un leve desplazamiento del ion magnesio hacia P4/6, lo que explica el valor negativo para este parámetro. Partiendo de la especie H_3L^{9-}, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ marcan un rearreglo de los protones de forma que se alejan levemente de P1/3, posiblemente desplazándose hacia P5. El fosfato más afectado es, como era esperable P2, que además de conservar su protón ahora se une al ion magnesio. A partir de esta especie y hasta $[Mg(H_6L)]^{4-}$ los valores de $\Delta\delta_L$ marcan que los fosfatos más afectados por la protonación y complejación son P2, P1/3 y P4/6, los que se espera entonces coordinen al ion Mg^{2+}, mientras P5 soporta el desplazamiento de los protones hacia él.

La transformación $[Mg(H_3L)]^{7-} \rightarrow [Mg(H_4L)]^{6-}$ parece estar mediada por la asociación de un protón a P1/3, el cual se comparte probablemente con P4/6 (valores negativos de $\Delta\delta_{prot}$). Esto afecta a la distancia a P5, seguramente a través de la red de enlaces de hidrógeno existentes entre los grupos fosfato adyacentes (figura 7.6B). Si se analizan los valores de desplazamiento de las señales debidos a la asociación del ion magnesio a la especie protonada del ligando, todos los grupos fosfato se ven afectados. Este efecto puede racionalizarse teniendo en cuenta los microestados predominantes dentro del macroestado con n = 4 (H_4L^{8-}(1234/1236) y H_4L^{8-}(1346)). El grupo más perturbado es, sin dudas, P2, ya que retiene el protón que poseía sólo en una de las dos microespecies de H_4L^{8-}, pero además se retira "hacia atrás" para poder unirse directamente al ion magnesio ($\Delta\delta_{compl}$ negativo). El desplazamiento químico de las señales correspondiente a P4/6 y P5 se ve también disminuido en este proceso. Ambas microespecies, tienen un sólo ion H^+ entre ambos grupos fosfato. Al unirse el ion metálico, P4/6 se asocia directamente a él, además de compartir protones con grupos adyacentes. Asimismo, el fosfato en posición 5 se rodea ahora de dos protones, cuando en ninguna de las dos microespecies del ligando se encontraba siquiera protonado

directamente. Finalmente, P1/3 se ve alterado en menor medida, ya que sobre él se produce el desplazamiento de un hidrogenión por el ion metálico entrante (ambas microespecies poseen este grupo protonado), generando efectos contrapuestos sobre el valor de desplazamiento químico.

Para los siguientes complejos, el análisis de los resultados de la tabla 7.2 es muy complejo. En estas dos especies, todos los "huecos" entre los grupos fosfatos han sido ocupados por el ion magnesio y los protones. Por tanto, de aquí en más, las protonaciones sucesivas serán sobre grupos que se encuentran asociados al ion metálico o a la red de enlaces de hidrógeno existente, provocando un rearreglo que afecta a todas las señales. De acuerdo con esto, los valores de $\Delta\delta_{prot}$ para las especies $[Mg(H_5L)]^{5-}$ y $[Mg(H_6L)]^{4-}$ son más parecidos entre sí que en los casos anteriores. En términos generales, es posible que el quinto protón se ubique entre P2 y P1/3, estando este último probablemente no unido al ion magnesio, lo que provocaría que se afectara P5 a través de la red de enlaces de hidrógeno. El efecto sobre la señal de los grupos en C4/6 es mínimo, por lo que se deduce que probablemente existan efectos contrapuestos de alejamiento y acercamiento de los protones y el ion magnesio sobre ambos. Por su parte, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ son todos negativos y muy similares entre sí, lo que ocurre también para la especie $[Mg(H_6L)]^{4-}$. Como se mencionó, la distribución de los protones y el ion magnesio es, en ambas especies, deslocalizada en el ligando, por lo que todas las señales se verán afectadas de forma similar. No obstante, los valores correspondientes a $[Mg(H_5L)]^{5-}$ son levemente más negativos para los grupos P4/6 y P5, lo que se explica a partir de las microespecies predominantes del ligando: H_5L^{7-} (12345/12356) y H_5L^{7-}(12346). En ambas, los fosfatos ubicados en C4/6 o C5 están deprotonados, por lo que se ven más afectados con la unión del ion magnesio, el cual no solamente se une parcialmente P4/6, sino que además provoca un rearreglo de los protones hacia ambos grupos.

3.2. Sistema InsP_6-Ca^{2+}

La figura 7.7A muestra los espectros de RMN de ^{31}P del sistema InsP_6-Ca^{2+} para relación molar 1:1 metal:ligando. Siguiendo la misma estrategia adoptada para el sistema con magnesio, la asignación de las bandas en medio ácido sigue el orden encontrado para el ligando.

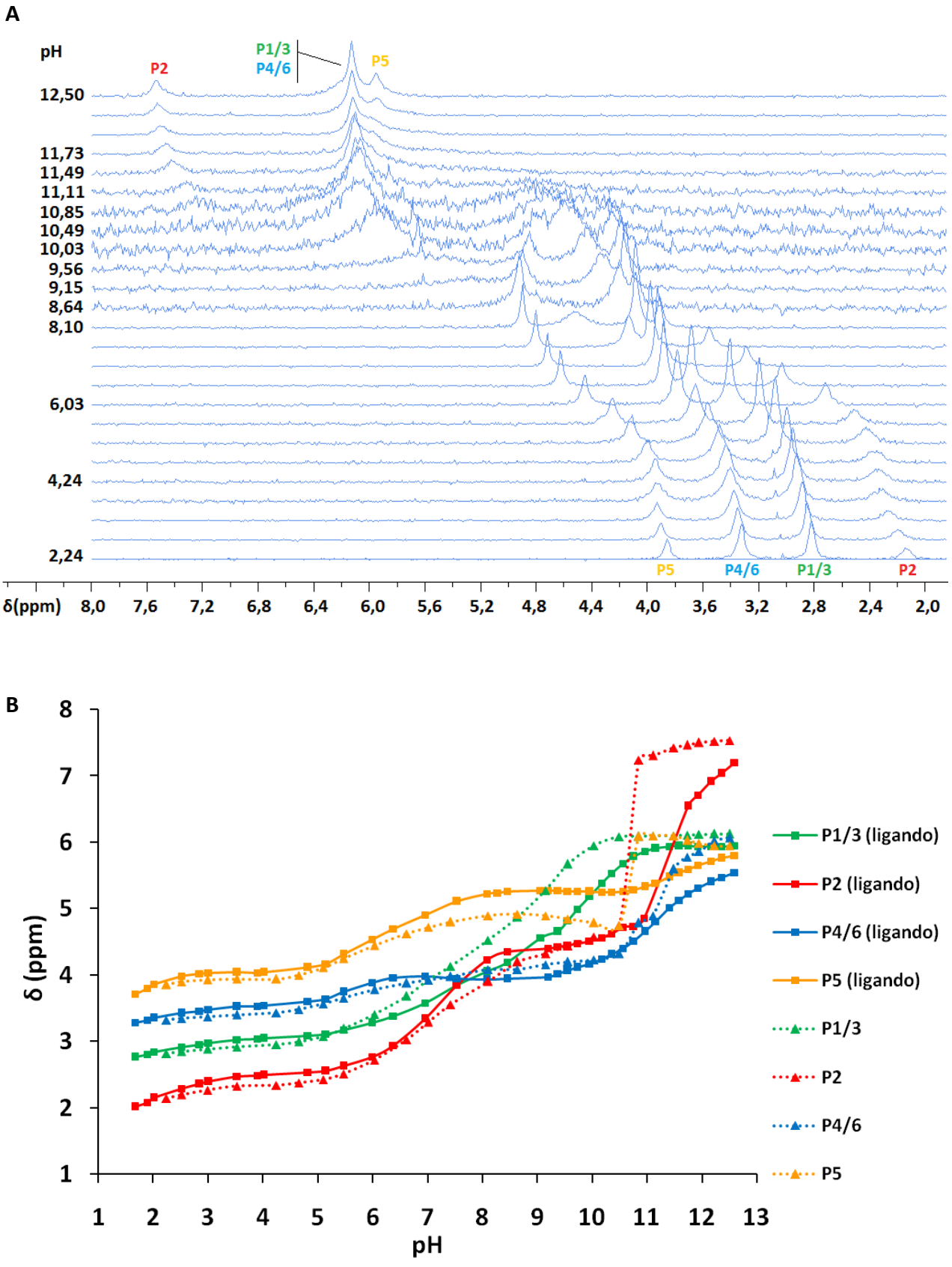


Figura 7.7. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Ca^{2+} en función del pH, a 37,0 ˚C e I = 0,15 M ([L] = 2,05 mM, [Ca^{2+}] = 2,03 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Ca^{2+} (líneas discontinuas).

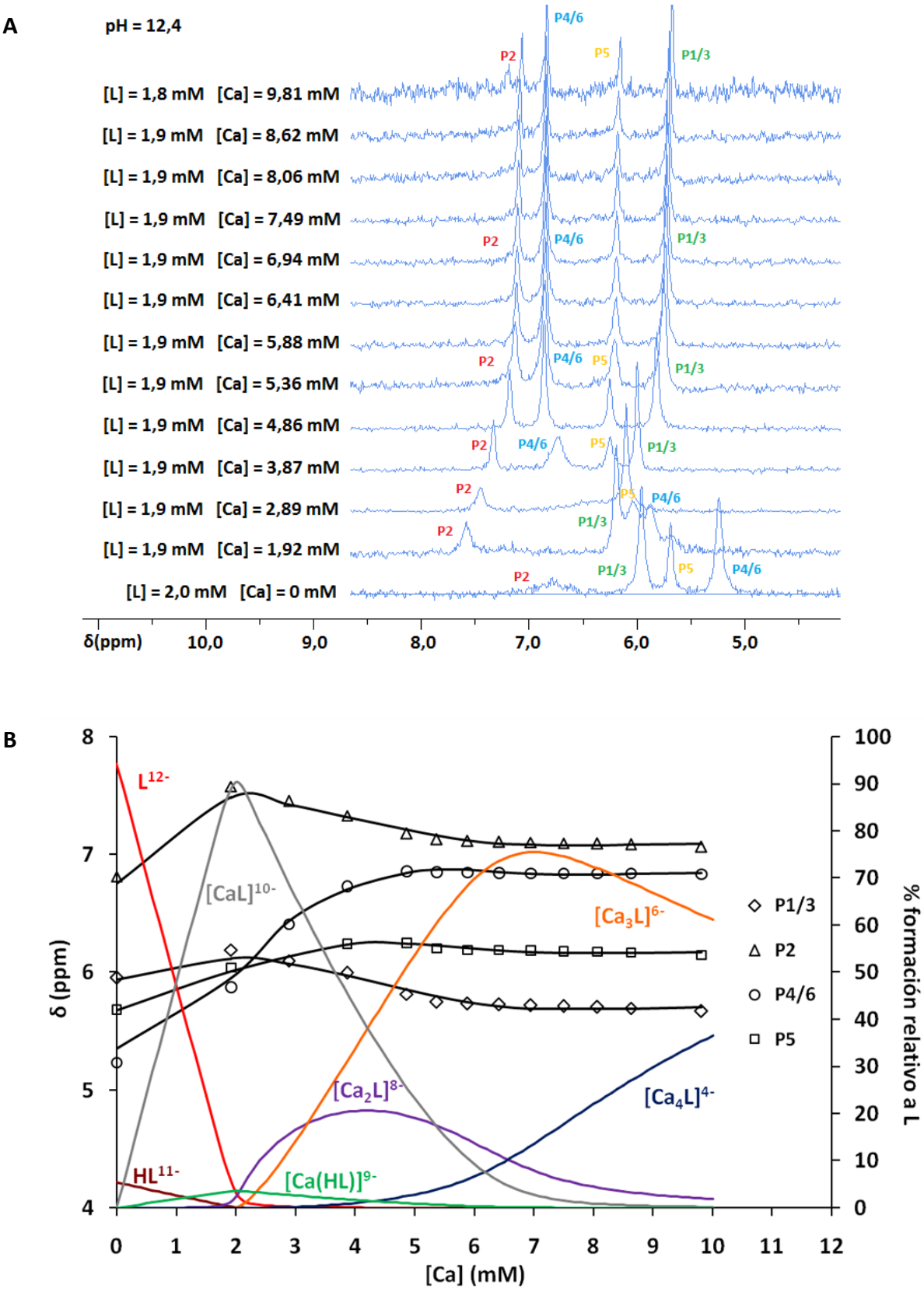


Figura 7.8. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Ca^{2+} en función de la concentración de metal y ligando, a pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (B) Ajuste de los datos de (A), en donde la curva continua en negro corresponde al modelo teórico y superpuesto se muestra el diagrama de distribución de especies en base al modelo ajustado.

Las señales se encuentran bien resueltas a lo largo del experimento, excepto en el rango 9,0 - 11,5, en donde aumenta el ruido espectral. El esquema de asignación aplicado siguiendo cada señal, fue verificado a partir de corridas a pH y concentración de fitato constantes y concentración de metal variable. Los resultados se detallan en la figura 7.8A. Partiendo del ligando libre, a medida que la concentración de calcio aumenta, las señales se desplazan hacia valores mayores de desplazamiento químico. Sin embargo, dado que lo hacen de forma diferencial provocan que las bandas correspondientes a P1/3, P5 y 4/6 colapsen en una banda ancha a relaciones molares metal:ligando cercanas a la unidad. Con un incremento extra en la concentración de ion metálico, las bandas se cruzan, para dar un esquema P2, P4/6, P5 y P1/3, en orden de campo creciente, que se mantiene hasta la precipitación de la fase sólida correspondiente. Con esta información fue posible la asignación de los espectros de la figura 7.7A en el rango básico. El orden de las señales es, en el sentido de aumento del campo, P2, P1/3, P4/6 y P5.

Considerando este patrón de señales, la figura 7.7B muestra la variación de los desplazamientos químicos de las señales en función del pH para el ligando, en presencia y ausencia de metal. De la misma forma que ocurría en el sistema conteniendo magnesio, una comparación entre las curvas muestra que los espectros son muy similares a pH muy ácido y se apartan gradualmente al aumentar el pH. Son esperables, entonces, procesos de complejación que operen aun en medio ácido, dando especies donde el ligando presenta un alto grado de protonación. De acuerdo al perfil obtenido de las curvas, se espera que los fosfatos P2 y P5 sean los más afectados con el cambio de magnesio por calcio en el sistema.

El ajuste del comportamiento de las curvas en función del pH arroja los valores de constantes de formación que están resumidos en la tabla 7.1. El modelo que mejor describe los datos experimentales contiene un mayor número de especies que el ajustado en presencia de magnesio. Se detectan siete procesos de complejación que dan a lugar a especies de estequiometria 1:1 ligando:metal, donde el ligando se presenta en un amplio grado de protonación. Esto se encuentra de acuerdo con la variación entre las curvas en ausencia y presencia de metal de la figura 7.7B, las cuales se apartan entre sí en todo el rango de pH estudiado. Según la figura 7.9, se detectan dos especies en

medio ácido, $[Ca(H_5L)]^{5-}$ y $[Ca(H_6L)]^{4-}$, que extienden el rango de complejación hasta pH ≈ 2. Para valores de pH cercanos al fisiológico el complejo predominante es $[Ca(H_4L)]^{6-}$.

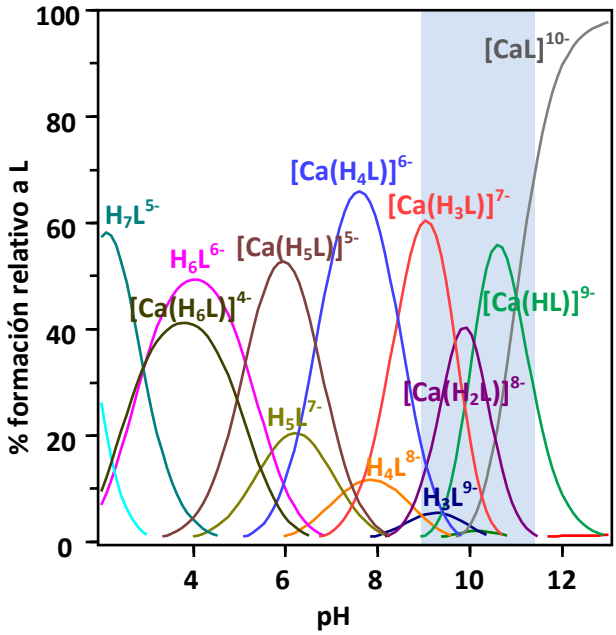


Figura 7.9. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Ca^{2+} en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 2,05 mM, [Ca^{2+}] = 2,03 mM). Se resalta la zona de transición conformacional.

Los valores de constantes de equilibrio de la tabla 7.1 permiten explicar de forma satisfactoria la conducta del desplazamiento químico de todas las señales a medida que varía el pH (figura 7.10A). Con esta información, es posible estimar los desplazamientos químicos individuales y su variación en los procesos de protonación y complejación. Para los valores obtenidos, resumidos en la tabla 7.3, un análisis pormenorizado de las tendencias no es viable. Esto se debe a varias causas. En primer lugar, al igual que ocurrió con el sistema InsP_6-Mg^{2+}, existen dos efectos opuestos sobre los desplazamientos químicos de las señales, debidos al desplazamiento de los protones unidos a los grupos fosfato y la complejación del ion metálico [7]. Por otra parte, si se revisan las tendencias observadas en los desplazamientos de las señales en presencia y ausencia del ion metálico (figura 7.7B), en medio ácido, donde la carga de las especies del ligando es moderada, la interacción con el ion metálico posee la misma naturaleza que se estableció para el ion magnesio. Por el contrario, a valores de pH alto, todas las señales en presencia de calcio poseen

desplazamientos químicos mayores respecto de las bandas correspondientes al ligando. Este efecto de disminución del campo se observó para los sistemas conteniendo iones alcalinos (capítulo 6) y puede asociarse con el desblindaje de los átomos de fósforo debido a la polarización de la carga negativa desde los grupos fosfato hacia el catión metálico. Esto hace que, para especies altamente cargadas del ligando, existan dos efectos que se contraponen: la disminución de los desplazamientos químicos debido al enlace del catión a los grupos fosfato y el aumento de los mismos por la polarización de la carga negativa de los grupos ionizables adyacentes. Dado el mayor tamaño del ion Ca^{2+} respecto del ion Mg^{2+}, este último fenómeno es posible que sea sustentado por interacciones a través del espacio.

La especie totalmente deprotonada del fitato, con una carga -12, interactúa con el calcio formando el complejo $[CaL]^{10-}$, predominante en medio básico y también altamente cargado. La interacción es fuerte, como lo evidencian los valores positivos de $\Delta\delta_{compl}$ correspondientes. Suponiendo que aquellos fosfatos que se enlazan directamente al calcio sufren, en cierta extensión, un efecto de aumento del campo por la coordinación metálica, aquellos fosfatos con menor valor de $\Delta\delta_{compl}$ se encontrarían más involucrados en el enlace, mientras que el resto se vería polarizado a la distancia. En este marco, el ion Ca^{2+} se acerca al ligando "por fuera" del anillo carbonado, hacia donde se encuentran axialmente dispuestos los fosfatos en 1/3 y 5 (figura 7.10B). P2, al encontrarse ecuatorial también se ve afectado, y su participación en el enlace no debe ser descartada. P4/6 sufre los efectos del desblindaje causados por el catión entrante, por lo que su señal se corre hacia desplazamientos químicos mayores. Es interesante notar que el valor de $\Delta\delta_{compl}$ para P4/6 se aparta de los correspondientes al resto de los fosfatos. Esto marca una diferencia en el entorno correspondiente, lo cual logra explicarse satisfactoriamente mediante la conformación 5a1e para el ligando.

La protonación de la especie anterior, para dar lugar a $[Ca(HL)]^{9-}$ está seguida por un valor de $\Delta\delta_{prot}$ muy bajo para P4/6. Es esperable que el protón se asocie entonces a estos dos grupos fosfato, estabilizando el estado conformacional 5a1e (figura 7.10B). El ion calcio tiende a alejarse todo lo posible del protón que ingresa, por lo que se corre levemente hacia los fosfatos en C1/3 y C2, provocando un aumento en el desplazamiento químico de la señal de P5.

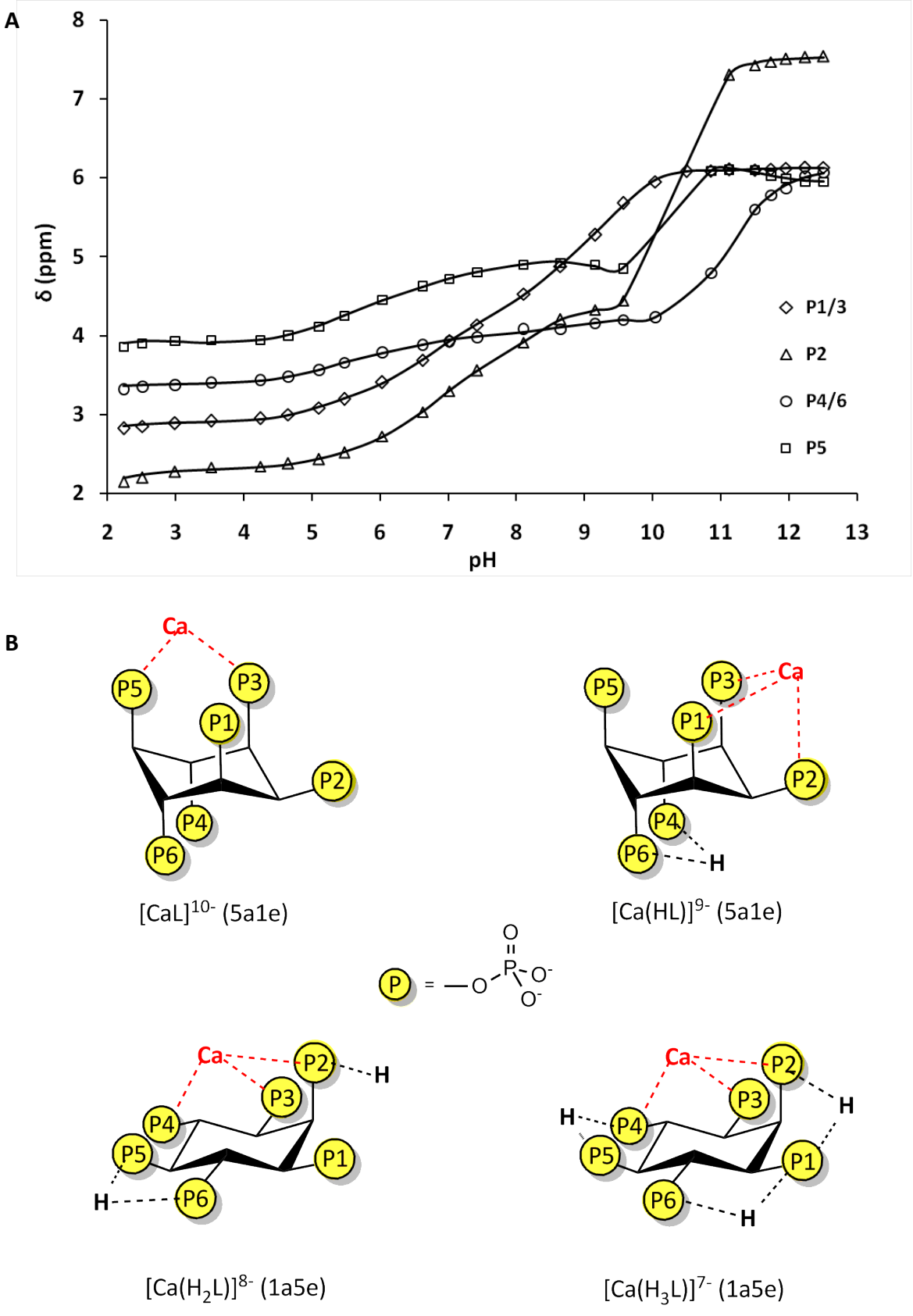


Figura 7.10. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema InsP_6-Ca^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Ca^{2+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

El proceso HL^{11-} → $[Ca(HL)]^{9-}$ causa un incremento importante en el desplazamiento químico de la señal de P2, mientras que la señal correspondiente a P4/6 se traslada a campos mayores. Esto es coherente con el mencionado desplazamiento del protón hacia P4/6, que en la forma protonada del ligando se encontraba casi exclusivamente sobre P2. Este protón, que se encontraba cerca de P1/3 en el ligando monoprotonado, ahora se intercambia por el ion calcio, haciendo que $\Delta\delta_{compl}$ de P1/3 sea pequeño. En el caso de P5, el valor de este parámetro es positivo, lo que concuerda con un efecto de desblindaje a larga distancia provocado por el ion metálico. Los valores de $\Delta\delta_L$, determinados a partir de la especie L^{12-} del ligando, están de acuerdo con el modelo anterior, siendo P4 y P6 los grupos fosfato más afectados por la protonación. El fosfato sobre C5 se desblinda, mientras que las posiciones 1, 2 y 3 sobre el anillo sufren un corrimiento mínimo por los efectos contrapuestos de desblindaje y coordinación del ion metálico.

Tabla 7.3. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$, $\Delta\delta_{comp}$ (a partir de la especie del ligando correspondiente) y $\Delta\delta_L$ (determinado a partir de la especie totalmente deprotonada del ligando) para el sistema InsP_6-Ca^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	6,133	7,530	6,139	5,931
$[Ca(HL)]^{9-}$	6,033	7,479	3,952	6,610
$[Ca(H_2L)]^{8-}$	6,348	3,344	4,338	3,995
$[Ca(H_3L)]^{7-}$	5,276	4,630	4,167	5,029
$[Ca(H_4L)]^{6-}$	4,282	3,562	4,025	4,786
$[Ca(H_5L)]^{5-}$	3,294	2,507	3,701	4,347
$[Ca(H_6L)]^{4-}$	2,715	2,053	3,197	3,708
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	---	---	---	---
$[Ca(HL)]^{9-}$	-0,099	-0,051	-2,187	0,679
$[Ca(H_2L)]^{8-}$	0,315	-4,135	0,385	-2,616
$[Ca(H_3L)]^{7-}$	-1,072	1,286	-0,171	1,035

$[Ca(H_4L)]^{6-}$	-0,994	-1,068	-0,141	-0,243
$[Ca(H_5L)]^{5-}$	-0,988	-1,054	-0,324	-0,439
$[Ca(H_6L)]^{4-}$	-0,580	-0,455	-0,504	-0,639
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	0,181	0,226	0,603	0,137
$[Ca(HL)]^{9-}$	0,167	3,869	-0,387	1,584
$[Ca(H_2L)]^{8-}$	0,321	-1,541	-0,213	-1,303
$[Ca(H_3L)]^{7-}$	0,533	0,267	0,199	-0,219
$[Ca(H_4L)]^{6-}$	0,208	-0,833	0,118	-0,507
$[Ca(H_5L)]^{5-}$	-0,063	-0,326	-0,354	-0,415
$[Ca(H_6L)]^{4-}$	-0,335	-0,446	-0,345	-0,317
	$\Delta\delta_L$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	0,181	0,226	0,603	0,137
$[Ca(HL)]^{9-}$	0,081	0,175	-1,584	0,816
$[Ca(H_2L)]^{8-}$	0,396	-3,960	-1,199	-1,800
$[Ca(H_3L)]^{7-}$	-0,676	-2,674	-1,370	-0,765
$[Ca(H_4L)]^{6-}$	-1,669	-3,742	-1,511	-1,008
$[Ca(H_5L)]^{5-}$	-2,657	-4,797	-1,835	-1,447
$[Ca(H_6L)]^{4-}$	-3,237	-5,251	-2,339	-2,087

La formación de $[Ca(H_2L)]^{8-}$ se encuentra asociada a grandes valores (en valor absoluto) del indicador $\Delta\delta_L$ para P2, P4/6 y P5, tendencia que se mantiene para el resto de las especies complejas con mayor grado de protonación. Esto estaría indicando un cambio importante en el entorno químico de la mayoría de los grupos fosfatos, lo que podría relacionarse con una posible transición conformacional del ligando. De hecho, el ensanchamiento y movimiento apreciable de las señales en los espectros de la figura 7.7A comienza a partir de valores de pH cercanos a 9 y se extiende hasta poco por encima de pH = 11, rango en el que ocurre el intercambio entre $[Ca(HL)]^{9-}$ y $[Ca(H_2L)]^{8-}$ (figura 7.9B). Los valores de $\Delta\delta_{prot}$, influidos en parte por el mencionado cambio conformacional, muestran que los fosfatos más afectados por ambos protones son P2 y P5. Asimismo, dado el valor tan bajo que posee este parámetro para

P2 es factible que el ion calcio se ubique cerca del mismo, siendo la coordinación asistida en cierto grado por P1/3 y P4/6 (figura 7.10B). En concordancia, este esquema de coordinación es similar al que surgía de los datos experimentales en presencia de magnesio. Además, el protón sobre P2 se vería impedido en cierta medida de ser compartido efectivamente con P1/3, debido a los requerimientos espaciales dados por el enlace al ion metálico, lo que podría explicar el valor positivo de $\Delta\delta_{prot}$ para este último. En el caso de la señal de P4/6, el corrimiento hacia mayores desplazamientos químicos debidos al proceso $[Ca(HL)]^{9-} \rightarrow [Ca(H_2L)]^{8-}$ se explicaría a través del desplazamiento de protones que sufre la microespecie H_2L^{10-}(46) por la coordinación del ion Ca^{2+}. Los valores de Δδ debidos a la complejación del catión metálico son menores para P2 y P5, lo cual está de acuerdo con la restricción de ambos protones en las posiciones 2 y 5 respecto de la especie H_2L^{10-}, en donde se encontraban además asociados a los grupos en C4 y C6. Los pequeños valores en el caso de P4/6 y P1/3 evidencian el desplazamiento de los protones por la unión del ion calcio.

El proceso de formación de $[Ca(H_3L)]^{7-}$, a partir del complejo diprotonado, va seguido por un rearreglo interno de los protones asociados. Los valores de $\Delta\delta_{prot}$ para P1/3 y P2 son importantes y opuestos en signo, por lo que el protón que pertenecía a P2 pudo haberse trasladado más cerca de P1/3 (figura 7.10B). Un segundo protón se ubicaría entonces entre P1/3 y P4/6, lo más alejado posible del ion calcio (asociado de cierta forma a P2, P1/3 y P4/6). Finalmente, es posible que el último protón se sitúe entre P5 y el fosfato en C4/6 asociado al ion Ca^{2+}, provocando un acercamiento de P5 al catión metálico, y por tanto el desblindaje observado ($\Delta\delta_{prot}$ (P5) > 0). Por otra parte, el proceso de coordinación del catión calcio por parte de la especie H_3L^{9-} afecta en mayor medida a los grupos en posición 1 y 3, y el valor positivo de $\Delta\delta_{compl}$ tiene relación con el desplazamiento de protones en dos de las tres microespecies predominantes en el sistema: H_3L^{9-}(123) y H_3L^{9-}(134/136). P5 es el único grupo cuyo valor de $\Delta\delta_{compl}$ es negativo. En efecto, el mismo se encuentra protonado solo en el 11 % de la especie triprotonada, mientras que en el complejo $[Ca(H_3L)]^{7-}$ se asocia completamente a un protón.

La transformación del complejo $[Ca(H_3L)]^{7-}$ a $[Ca(H_4L)]^{6-}$ es probable que esté mediada por la asociación de un protón a P5 y que el mismo sea compartido

con P4/6. Este fenómeno podría desencadenar un rearreglo de protones sobre el ligando y una migración del metal hacia el espacio entre P1/3 y P2, amortiguando el efecto del cambio en las señales de P4/6 y P5 (desblindados a la distancia) y disminuyendo los valores de δ correspondientes a P2 y P1/3 (que ahora unen al catión calcio). En línea con esto, si se analizan los valores de desplazamiento de las señales debidos a la asociación del Ca^{2+} a la especie protonada del ligando, los grupos fosfato más afectados son P2 y P5. El primero por coordinar al metal y el segundo por rodearse ahora de dos protones, cuando en las microespecies mayoritarias del ligando se encontraba deprotonado (H_4L^{8-}(1234/1236) y H_4L^{8-}(1346)). La influencia del proceso de complejación sobre P1/3 se vería disminuida por el desplazamiento de un protón por parte del calcio, mientras que en el caso de P4/6 la variación de su señal es mínima, debido, posiblemente, a que en este proceso compartiría un protón adicional con P5, pero se vería desblindado a distancia por el ion metálico.

A partir del quinto protón, los valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{compl}$ son todos negativos, por lo que todas las señales se ven afectadas. Este efecto podría estar relacionado con el hecho de que el protón entrante afecta tanto la posición del ion metálico como la red de enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato. Pequeñas variaciones en la posición de los grupos ionizables provocarían variaciones en todas las señales, complicando el análisis estructural.

Es interesante notar que el esquema cooperativo de coordinación propuesto, que involucra la unión del metal a P1/3, P2 y P4/6, es similar al reportado para el sustrato de la fitasa alcalina de Bacillus[13]. Esta proteína reconoce específicamente al complejo InsP_6-Ca, donde el metal, según se reporta, podría estar unido a P1/3 y P4/6. De acuerdo con el mecanismo propuesto, el complejo se une al sitio activo de la enzima por la zona donde se encuentra el ion calcio y el grupo P1/3 es hidrolizado selectivamente en primera instancia. Es factible pensar que el modelo estructural discutido aquí sea coherente, en principio, con este mecanismo. La disposición entre P2 y P4/6 y el anclaje al metal podrían restringir a P1/3 a una disposición adecuada para un efectivo ataque nucleofílico.

Para completar el estudio de este sistema, se analiza el comportamiento del ligando en medio básico y en condiciones de exceso de ion metálico. Si se

observa la figura 7.8A, surge una primera diferencia respecto de lo antes mencionado en el caso del magnesio. En primer lugar, el esquema general de 4 señales integrando 1:2:1:2 se mantiene, y por más que las mismas se cruzan entre sí, no se observa la aparición de otras de forma superpuesta en el rango de condiciones abarcado. En este caso, no parece haber, por tanto, ninguna especie que se forme lentamente, como ocurría con el complejo neutro $[Mg_5(H_2L)]$, que precedía a la fase sólida de la misma estequiometria. En esta misma línea, en la figura 7.11 se comparan los espectros de RMN obtenidos en condiciones de exceso de ion metálico (condiciones de saturación del sistema) y mediante el filtrado de una suspensión de fitato de calcio.

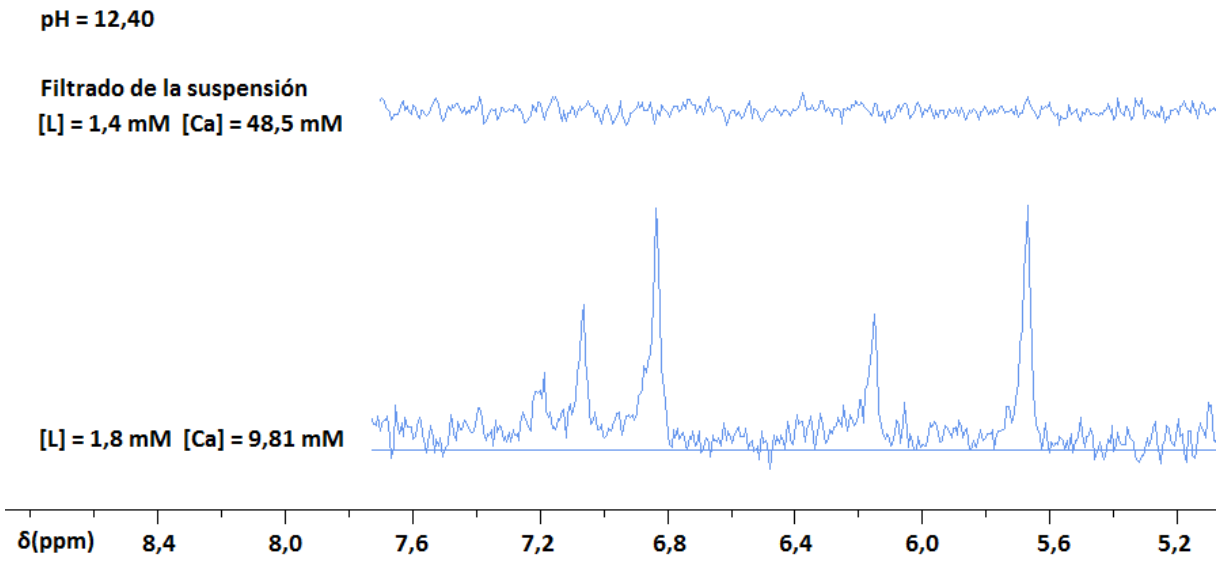


Figura 7.11. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Ca^{2+} de una solución con exceso de ion metálico y del filtrado de una suspensión de fitato de calcio (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

El proceso de remoción de la fase sólida provoca de hecho la desaparición completa de las señales, por lo que no se detecta ninguna especie polimetálica asociada al fitato de calcio. En conclusión, la o las especie(s) que se forma(n) en condiciones cercanas a la saturación del sistema, si existen, son tan poco solubles que quedan por debajo del límite de detección de la técnica de RMN, a diferencia de lo que ocurría con el complejo pentamagnésico, el cual permanecía en solución en concentración detectable al retirar el sólido.

Por otra parte, el análisis pormenorizado de los desplazamientos químicos de la figura 7.8A en función de la concentración de metal revela un comportamiento de las señales que tampoco surgía en el contexto de la discusión del sistema InsP_6-Mg^{2+}. Los valores de δ aumentan hasta condiciones de igual concentración de metal y ligando, donde ocurre la formación de especies de estequiometria 1:1, un hecho que ya se mencionó al analizar los valores de Δδ de la tabla 7.3. Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de calcio y la relación metal:ligando, las señales se mueven hacia campos altos, cruzándose entre sí a la vez. Finalmente, el esquema de las señales se estabiliza, manteniéndose prácticamente constante hasta la precipitación del sólido correspondiente. Este patrón no puede explicarse por la formación de la especie $[CaL]^{10-}$ y sus formas protonadas. Requiere la inclusión de otras especies complejas, cuyas estequiometrias difieran, principalmente, en la relación metal a ligando. Como se muestra en la figura 7.8B, los datos experimentales lograron ser ajustados, y el modelo que se detalla en la tabla 7.1 es el que mejor reproduce este comportamiento de las señales. Los complejos detectados poseen estequiometrias que van desde 2:1 hasta 4:1 metal:ligando. Estos complejos son predominantes en estas condiciones, lo que explica la intensidad de las señales en la figura 7.8A. Los mismos se suceden, según la figura 7.8B, en orden creciente de relación Ca/L a medida que aumenta la concentración de metal. La especie del ligando en los complejos corresponde a la forma totalmente deprotonada, lo cual es lógico dado el alto valor de pH fijado durante la corrida (12,4). De forma interesante, de acuerdo a lo ya discutido, no se logra el ajuste de un modelo que contenga una especie pentacálcica, dado que en esas condiciones comienza a observarse la precipitación de la fase sólida de la misma estequiometría[11,12].

Para finalizar, se muestran en la tabla 7.4 los desplazamientos químicos individuales y los valores de Δδ relacionados para las especies polimetálicas. Así como ocurría en el caso del resto de las especies ajustadas para calcio, el análisis detallado de los valores carece de sentido práctico, dado que se contraponen de manera compleja los efectos de complejación y desblindaje. Nuevamente, el análisis se basará en que cada ion Ca^{2+} provoca una disminución de los valores de desplazamiento químico en los fosfatos a los que se une, mientras que aumenta los de los fosfatos más alejados.

Tabla 7.4. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{comp\ sucesiva}$ (para el proceso de ganancia sucesiva de un ion calcio) y $\Delta\delta_L$ (determinado a partir de la especie totalmente deprotonada del ligando) para el sistema InsP_6-Ca^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	6,133	7,530	6,139	5,931
$[Ca_2L]^{8-}$	6,325	7,427	8,602	7,107
$[Ca_3L]^{6-}$	5,605	7,024	6,694	6,092
$[Ca_4L]^{4-}$	5,835	7,185	7,021	6,257
	$\Delta\delta_{compl\ sucesiva}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	0,181	0,226	0,603	0,137
$[Ca_2L]^{8-}$	0,192	-0,103	2,463	1,176
$[Ca_3L]^{6-}$	-0,720	-0,402	-1,908	-1,015
$[Ca_4L]^{4-}$	0,229	0,160	0,327	0,165
	$\Delta\delta_L$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CaL]^{10-}$	0,181	0,226	0,603	0,137
$[Ca_2L]^{8-}$	0,373	0,123	3,066	1,313
$[Ca_3L]^{6-}$	-0,347	-0,280	1,158	0,298
$[Ca_4L]^{4-}$	-0,117	-0,119	1,485	0,463

La tendencia general de los valores de $\Delta\delta_{compl\ sucesiva}$, definido a partir del proceso general $[Ca_nL]^{(12-2n)-} \rightarrow [Ca_{(n+1)}L]^{(12-2n-2)-}$, muestra que el primer ion calcio se ubicaría, preferentemente, cerca de P1/3 y P5 (y en parte P2), por encima del anillo carbonado (conformación del ligando 5a1e). El segundo catión se asociaría a P2 y P1/3, polarizando la carga de P4/6 y P5. La formación de $[Ca_3L]^{6-}$ estaría entonces mediada por la unión de un ion Ca^{2+} al grupo P4/6, por debajo del anillo, lo cual provoca una gran disminución en el valor de $\Delta\delta_{compl\ sucesiva}$ correspondiente. A partir de esta especie, todos los fosfatos estarán en contacto con por lo menos un ion metálico y por tanto todos los grupos se verán afectados de forma importante. En efecto, es a partir de la formación del complejo 3:1 metal:ligando donde el esquema de las señales deja de variar apreciablemente (ver figuras 7.8A y B). El último catión calcio se ubicaría por

encima del anillo, afectando por desblindaje mayoritariamente a P4/6. Finalmente, los valores de variación en los desplazamientos químicos debidos a la complejación de la especie L^{12-}, $\Delta\delta_L$, muestran que en general el grupo P4/6 es el más afectado por la polarización de la carga negativa hacia los iones calcio, los que se encuentran en su mayoría por encima del anillo carbonado. Este comportamiento diferencial de P4/6 reafirma la propuesta del estado 5a1e como conformación más estable del ligando en las especies polimetálicas de calcio.

3.3. Sistema InsP_6-Zn^{2+}

Los espectros de RMN de ^{31}P del fitato en presencia de cinc se muestran en la figura 7.12A. La relación molar utilizada fue de 2:1 (fitato:metal), de forma de garantizar la solubilidad del sistema. El esquema de asignación de las señales encontradas se basó en la distribución de las mismas para el ligando en función del pH. Sin embargo, como ocurría en los sistemas conteniendo magnesio y calcio, en medio básico las bandas se ensanchan y varían sustancialmente su desplazamiento químico con el pH. Este efecto complica la asignación de las señales, por lo que fue necesario la verificación de la identidad de las mismas a partir de experimentos realizados a pH y concentración de fitato constantes y concentración de metal variable. Para este sistema, la solubilidad del fitato de cinc no permitió un análisis adicional a concentraciones y relaciones metal:ligando más altas que las empleadas. Los resultados, expuestos en la figura 7.13A, muestran que un aumento en la concentración de cinc provoca un movimiento hacia campos menores para P2, P5 y P4/6, mientras que a P1/3 le ocurre lo contrario. En este caso, la señal de P1/3 se cruza parcialmente con P5 y P4/6, quedando superpuesta con ellas en los espectros con mayor concentración de metal. El efecto de desblindaje que se observaba para calcio ha disminuido para cinc. Éste es parcialmente contrarrestado por la coordinación metálica, dado que ahora sólo parte de las señales se corren hacia δ mayores. A partir de los espectros de la figura 7.13A es posible obtener, asimismo, información complementaria para la asignación de las bandas en medio básico en los espectros de la figura 7.12A. En el sentido de aumento del desplazamiento químico, las señales en medio altamente básico se suceden en el orden: P4/6 < P5 ≈ P1/3 < P2.

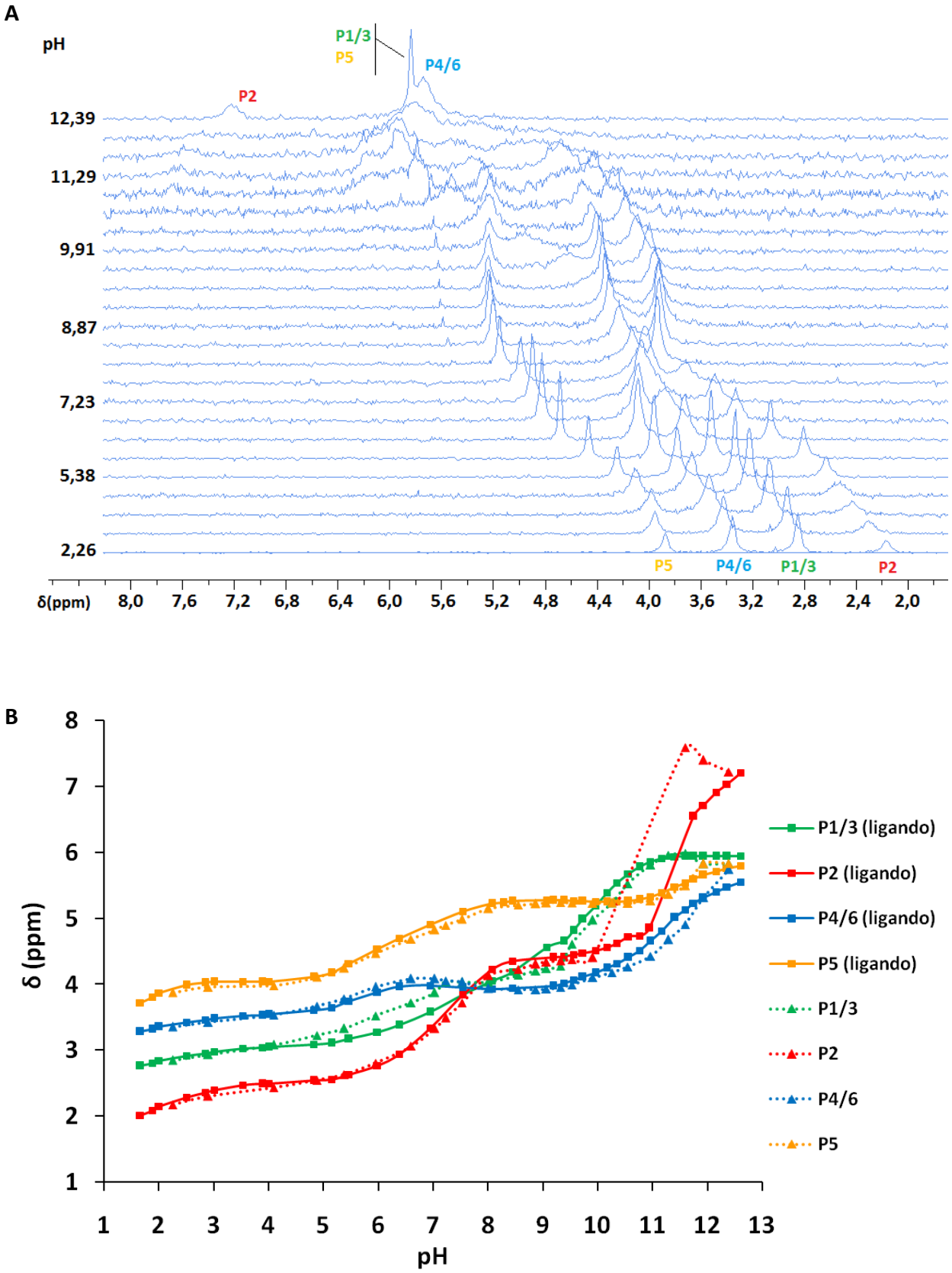


Figura 7.12. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Zn^{2+} en función del pH a 37,0 ˚C e I = 0,15 M ([L] = 2,00 mM, [Zn^{2+}] = 1,00 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Zn^{2+} (líneas discontinuas).

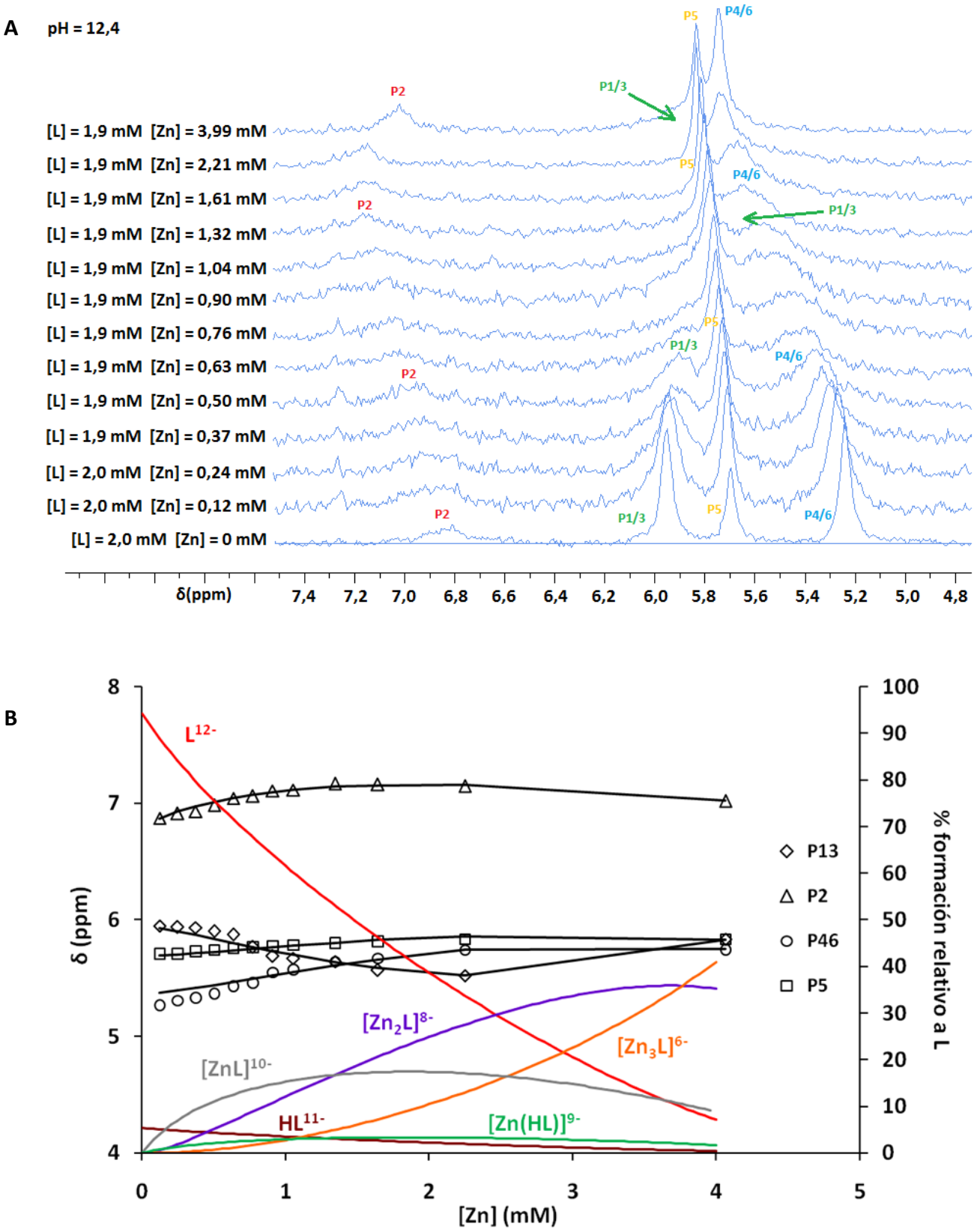


Figura 7.13. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Zn^{2+} en función de la concentración de metal y ligando, pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (B) Ajuste de los datos de (A), en donde la curva continua en negro corresponde al modelo teórico y superpuesto se muestra el diagrama de distribución de especies en base al modelo ajustado.

Con los datos de desplazamiento químico asignados se construye la figura 7.12B, en donde las curvas de cada señal se comparan en presencia y ausencia de Zn^{2+}. Las señales del ligando se desplazan mínimamente en presencia del metal, lo que estaría indicando que los efectos de aumento del campo por coordinación metálica, y baja en el mismo por desplazamiento de protones y desblindaje, están prácticamente neutralizando su efecto. Según ha sido reportado por Bebot-Brigaud *et al.* [7], este aspecto hace muy complicada la realización de un análisis exhaustivo de los aspectos estructurales asociados a este sistema. No obstante, a diferencia del reporte mencionado, en el marco de este trabajo se propone su estudio desde un punto de vista cuantitativo, a través del ajuste del comportamiento de las señales con el pH y el análisis de los valores de Δδ derivados.

El ajuste de las curvas en presencia del ion metálico es satisfactorio, como se evidencia por la comparación entre los puntos experimentales y la curva determinada a partir del modelo teórico calculado (figura 7.14A). El conjunto de constantes que describe el sistema es entonces el que se detalla en la tabla 7.1. Las especies detectadas corresponden a complejos 1:1 (metal:ligando), solubles y estables. En este sentido el modelo es idéntico al ajustado para calcio y muy similar al correspondiente con magnesio. Más aún, los valores de las constantes para los tres iones son también muy similares y mayores a las encontradas para iones alcalinos, por lo que la interacción ligando-metal sigue siendo determinada principalmente por la carga del catión metálico. Los resultados concuerdan muy bien además con los ya reportados por Bebot-Brigaud en otras condiciones experimentales [7].

Como se observa en la figura 7.15, se detectan dos especies en el rango ácido de pH, $[Zn(H_5L)]^{5-}$ y $[Zn(H_6L)]^{4-}$. Éstas extienden la capacidad complejante del fitato hasta pH = 2. A pH similar al fisiológico los complejos predominantes son $[Zn(H_4L)]^{6-}$ y $[Zn(H_3L)]^{7-}$. Por encima de pH = 10 los resultados muestran la formación de dos especies complejas, también de estequiometria 1:1, con el ligando totalmente deprotonado o monoprotonado ($[Zn(HL)]^{9-}$ y $[ZnL]^{10-}$). Estas especies no son particularmente estables respecto del complejo $[Zn(H_2L)]^{8-}$ (ver valores de logaritmo de constantes de estabilidad en tabla 7.1).

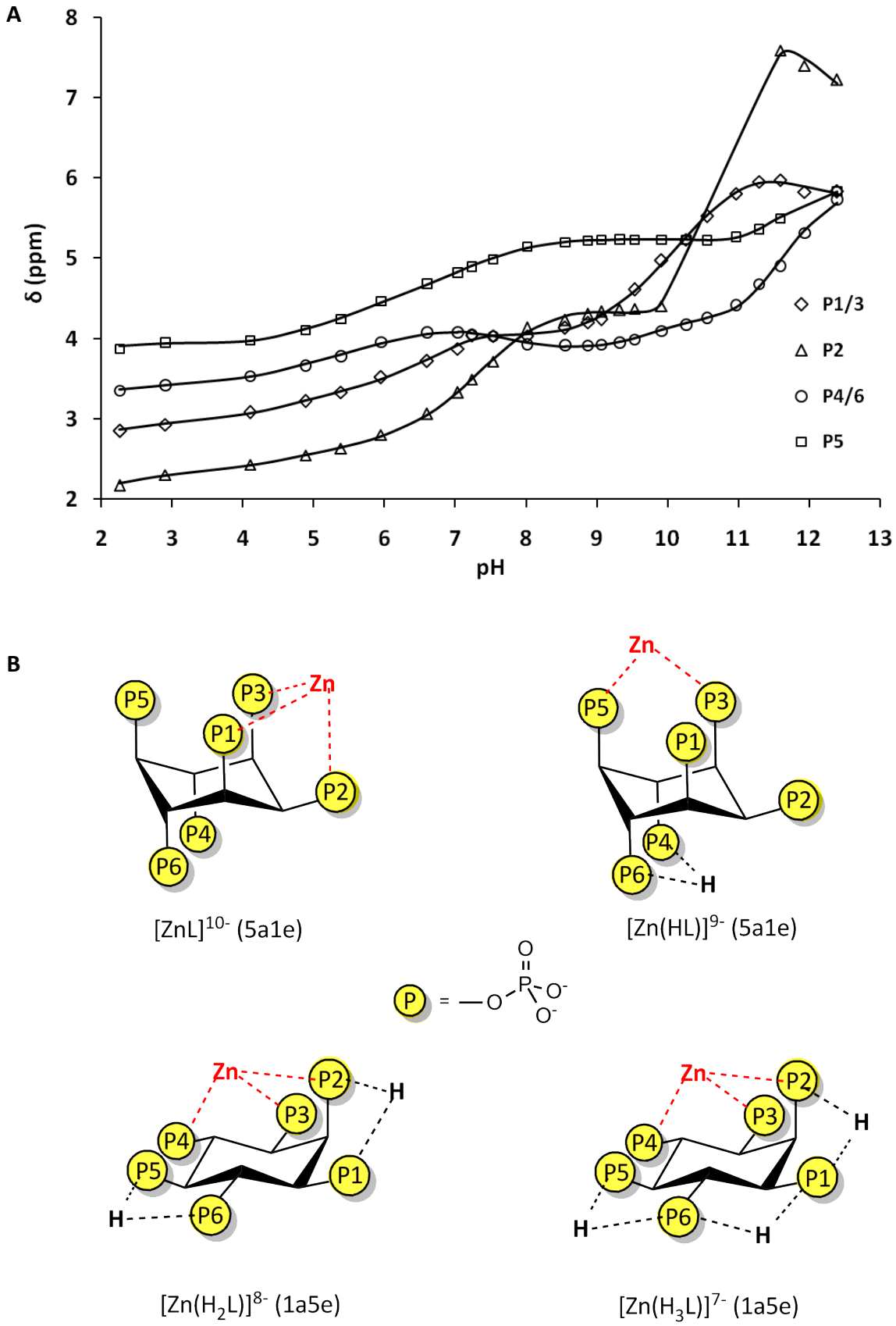


Figura 7.14. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema InsP_6-Zn^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Zn^{2+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

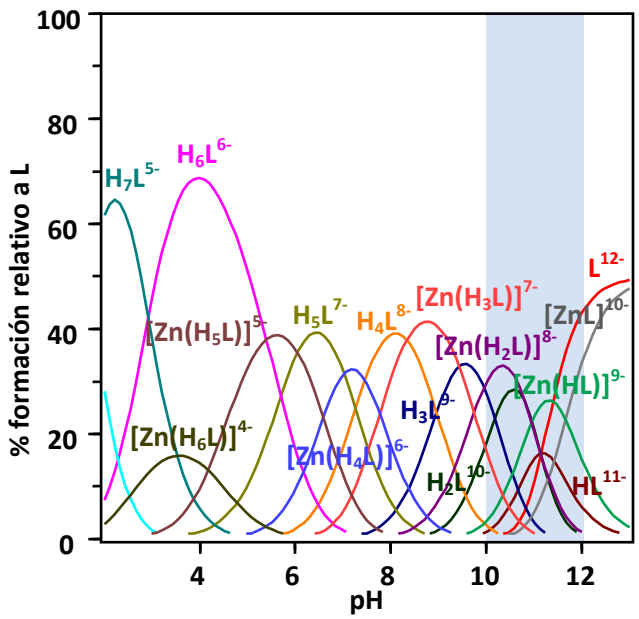


Figura 7.15. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Zn^{2+} en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 2,0 mM, [Zn^{2+}] = 1,0 mM). Se resalta la zona de transición conformacional.

Teniendo en cuenta la distribución de especies en el sistema, en la tabla 7.5 se resumen los resultados del cálculo de los desplazamientos químicos individuales y su variación asociada a los procesos de protonación y complejación. En medio extremadamente básico, el fitato interacciona en su forma totalmente deprotonada con el ion cinc, formando el complejo $[ZnL]^{10-}$, altamente cargado. A partir de los valores de $\Delta\delta_{compl}$ es factible que el ion metálico se una a la "caja" formada por los grupos P1/3 y P2, mientras que polariza a la distancia la carga negativa de los grupos más alejados P4/6 y P5 (figura 7.14B). Esto se encuentra de acuerdo con lo discutido anteriormente por Bebot-Brigaud [7], aunque en este reporte se propone un esquema de unión bidentado. Parece más probable, por los resultados del presente trabajo, que el mismo sea de tipo asociativo P1-P2-P3. La conformación del ligando en esta especie que mejor explica lo anterior es 5a1e, haciendo que P4/6 tenga, al estar por debajo del anillo carbonado, un comportamiento diferencial respecto del resto de los grupos, como lo demuestra el alto valor de $\Delta\delta_L$.

La protonación de la especie anterior está asociada a un aumento muy importante en el desplazamiento químico de la señal de P2. Este valor de δ individual está afectado de un error no menor, ya que esta señal se ensancha y varía su posición rápidamente con el pH, haciendo muy difícil una asignación

exacta y dando lugar a valores de Δδ probablemente sobreestimados. No obstante, asumiendo la misma conformación que la especie $[ZnL]^{10-}$ (5a1e), el valor positivo de $\Delta\delta_{prot}$ para P2 puede explicarse en parte debido a que al protonarse el grupo P4/6 ($\Delta\delta_{prot} < 0$) el fosfato en posición 2 se sentirá atraído hacia esa zona (como lo hace en la especie HL^{11-}), por lo que el ion Zn^{2+} se asociará probablemente a P1/3 y P5, provocando una disminución en el desplazamiento químico de la señal de este último (figura 7.14B). De acuerdo con esto, los Δδ para el proceso de complejación desde la especie HL^{11-} son mayores en valor absoluto para P2 y P4/6, grupos entre los que el protón se traslada al pasar del ligando al complejo. No obstante, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ para P1/3 y P5 no son suficientes como para dar cuenta de la coordinación. Además, los valores de $\Delta\delta_L$ para este complejo son importantes. No se debe descartar, por tanto, que la especie $[Zn(HL)]^{9-}$ pueda existir en ambas conformaciones 5a1e y 1a5e, provocando una alteración extra en los valores de desplazamiento químico. En la conformación 1a5e es probable que el ion metálico y el protón estén unidos principalmente entre los grupos P4/6 y P5, dando cuenta de los valores negativos de $\Delta\delta_{comp}$. Verificando lo anterior, el ruido en los espectros de la figura 7.12A, así como el ensanchamiento y movimiento rápido de bandas, se extiende desde pH = 10 hasta pH = 12, donde según los diagramas de la figura 7.15B se espera la transición $[Zn(H_2L)]^{8-} \rightarrow [ZnL]^{10-}$.

Tabla 7.5. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$, $\Delta\delta_{comp}$ (a partir de la especie del ligando correspondiente) y $\Delta\delta_L$ (determinado a partir de la especie totalmente deprotonada del ligando) para el sistema InsP_6-Zn^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[ZnL]^{10-}$	5,523	6,358	6,385	6,088
$[Zn(HL)]^{9-}$	6,505	12,29	3,573	4,997
$[Zn(H_2L)]^{8-}$	5,202	3,610	4,304	5,245
$[Zn(H_3L)]^{7-}$	3,809	4,438	3,768	5,211
$[Zn(H_4L)]^{6-}$	4,555	3,263	4,340	4,795
$[Zn(H_5L)]^{5-}$	3,597	2,724	3,967	4,276

$[Zn(H_6L)]^{4-}$	2,712	1,769	3,038	3,313
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[ZnL]^{10-}$	---	---	---	---
$[Zn(HL)]^{9-}$	0,982	5,929	-2,813	-1,092
$[Zn(H_2L)]^{8-}$	-1,302	-8,677	0,732	0,249
$[Zn(H_3L)]^{7-}$	-1,394	0,829	-0,536	-0,034
$[Zn(H_4L)]^{6-}$	0,747	-1,175	0,572	-0,415
$[Zn(H_5L)]^{5-}$	-0,958	-0,539	-0,372	-0,519
$[Zn(H_6L)]^{4-}$	-0,885	-0,955	-0,930	-0,963
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[ZnL]^{10-}$	-0,429	-0,946	0,849	0,294
$[Zn(HL)]^{9-}$	0,639	8,677	-0,767	-0,030
$[Zn(H_2L)]^{8-}$	-0,825	-1,275	-0,247	-0,053
$[Zn(H_3L)]^{7-}$	-0,934	0,075	-0,200	-0,038
$[Zn(H_4L)]^{6-}$	0,481	-1,132	0,432	-0,498
$[Zn(H_5L)]^{5-}$	0,241	-0,110	-0,088	-0,486
$[Zn(H_6L)]^{4-}$	-0,337	-0,730	-0,504	-0,712
	$\Delta\delta_L$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[ZnL]^{10-}$	-0,429	-0,946	0,849	0,294
$[Zn(HL)]^{9-}$	0,553	4,983	-1,964	-0,798
$[Zn(H_2L)]^{8-}$	-0,750	-3,694	-1,232	-0,549
$[Zn(H_3L)]^{7-}$	-2,143	-2,866	-1,768	-0,584
$[Zn(H_4L)]^{6-}$	-1,397	-4,041	-1,197	-0,999
$[Zn(H_5L)]^{5-}$	-2,354	-4,580	-1,569	-1,518
$[Zn(H_6L)]^{4-}$	-3,240	-5,535	-2,499	-2,482

A partir de la especie siguiente, $[Zn(H_2L)]^{8-}$, los valores de $\Delta\delta_L$ se vuelven todos negativos, con una tendencia a la baja esperable por la ganancia de iones Zn^{2+} y

H^+. Esto podría indicar la ausencia de un cambio ulterior en el estado conformacional al continuar bajando el pH, lo que además está de acuerdo con el bajo nivel de ruido espectral en el rango de pH 2 - 10 (figura 7.12A). La formación del complejo diprotonado conlleva valores de $\Delta\delta_{prot}$ grandes, mientras que son menores los correspondientes a $\Delta\delta_{comp}$. Se podría considerar entonces completa la transición conformacional, haciendo que este último parámetro, que es calculado a partir del ligando en el estado 1a5e, dé valores moderados. Los grupos fosfatos más afectados por la coordinación metálica son P2 y P1/3, aunque P4/6 debe, como ocurría para los sistemas con magnesio y calcio, participar en cierta medida del enlace (figura 7.14B). P5 se ve realmente poco afectado por la unión del metal, por lo que es posible que conserve el protón que se encontraba sobre él en la correspondiente microespecie predominante del ligando ($H_2L(25)^{10-}$). El segundo protón se ubicaría, según los valores de $\Delta\delta_{prot}$, sobre P2 hacia P1/3.

El tercer protón que se une a las especies complejas se ubicaría sobre P1/3 y P4/6, disminuyendo el desplazamiento químico de sus señales (figura 7.14B). Además, el valor positivo de $\Delta\delta_{prot}$ para P2 es signo de una posible transferencia del protón sobre sí mismo hacia P1/3 al pasar de $[Zn(H_2L)]^{8-}$ a $[Zn(H_3L)]^{7-}$. En efecto, esta disposición de los iones positivos sobre el ligando condice con lo observado en los valores estimados de $\Delta\delta_{compl}$. El grupo más afectado es P1/3, que en la microespecie mayoritaria con n = 3 estaba completamente deprotonado (H_3L^{9-} (246)), y ahora enlaza a un ion cinc y se asocia con al menos dos protones. Por otra parte, P2 y P4/6 sufren en menor medida este cambio, ya que el ion cinc desplaza los protones de esta microespecie en P2 y P4/6 hacia la zona entre P1/3 y P4/6, neutralizando los efectos en parte. Todos estos cambios ocurren más lejos de P5, afectando poco su señal.

Finalmente, el proceso $[Zn(H_3L)]^{7-} \rightarrow [Zn(H_4L)]^{6-}$ vendría mediado por la protonación del grupo P5, lo que originaría que los tres grupos fosfato no coordinados compartan un protón con su vecino. Si se supone la unión del metal a los grupos ubicados en C1-C2-C6, los fosfatos libres serían P3, P4, P5, los que cuentan con cuatro "huecos" entre los fosfatos adyacentes donde albergar cuatro protones como máximo. Este proceso afectaría mayoritariamente las señales de P2, no protonado en $[Zn(H_3L)]^{7-}$, y P5, que se

rodea ahora de dos protones. De acuerdo, para el proceso $H_4L^{8-} \rightarrow [Zn(H_4L)]^{6-}$, los $\Delta\delta_{compl}$ son negativos para P2 y P5. En cuanto a P2, mantiene el protón que poseía en dos de las microespecies predominantes ($H_4L(1234/1236)^{8-}$ y $H_4L(2456)^{8-}$) pero ahora se asocia a un ion Zn^{2+}. Por otra parte, si se analizan las microespecies con n = 4, P5 se encuentra deprotonado en un 80 % de la especie H_4L^{8-} y el enlace al metal contribuye a su asociación con dos protones de su entorno. Los valores positivos de este parámetro para P4/6 y P1/3 encuentran explicación parcial en el desplazamiento de protones por parte del ion metálico desde estos grupos (microespecies predominantes del ligando $H_4L(1234/1236)^{8-}$ y $H_4L(1346)^{8-}$) hacia P2 y P5.

A partir de este punto los protones adicionales afectarían a todas las señales. Este efecto es muy complejo, por lo que se soslaya el análisis correspondiente del resto de los valores de la tabla 7.5. Por último, a diferencia de lo discutido por Bebot-Brigaud y sus colaboradores [7], en este trabajo el modelo propuesto incluye siempre un esquema bidentado para la complejación metálica, en el entendido de que la distribución de carga negativa alrededor del ligando deja "huecos" o "cajas" donde pueden ubicarse los iones positivos, haciendo que dos o más grupos fosfato puedan unirse al catión. Esto está de acuerdo, como se discutió para el ion calcio, con el modelo de coordinación bidentado encontrado en ciertos sistemas biológicos [13].

Hasta aquí el análisis del sistema se ha realizado en presencia de exceso de fitato. Para completar el estudio químico, se discuten los resultados del estudio de la interacción InsP_6-Zn^{2+} en presencia de exceso de metal. La figura 7.13A muestra el desplazamiento de las señales del ligando en presencia de concentraciones crecientes de cinc en medio altamente básico (pH = 12,4 = constante). Es posible ajustar dicho comportamiento a un modelo teórico de especies químicas que se suceden en el sistema. Los resultados de este ajuste, que se detallan en la tabla 7.1, muestran la formación de dos complejos del ligando completamente deprotonado, de estequiometrías 2:1 y 3:1. Ambas se suceden a medida que se adiciona cinc al sistema, y como se deriva de la figura 7.13B, poseen una estabilidad similar, coexistiendo con predominancias menores al 40 % en un amplio rango de valores de concentración de metal. Esta distribución de especies logra explicar de forma satisfactoria la variación de los desplazamientos químicos de las señales de la figura 7.13A, dando

cuenta del entrecruzamiento de las señales de P1/3, P5 y P4/6 y el movimiento de "vaivén" de la señal de P2 (ver ajuste en la figura 7.13B).

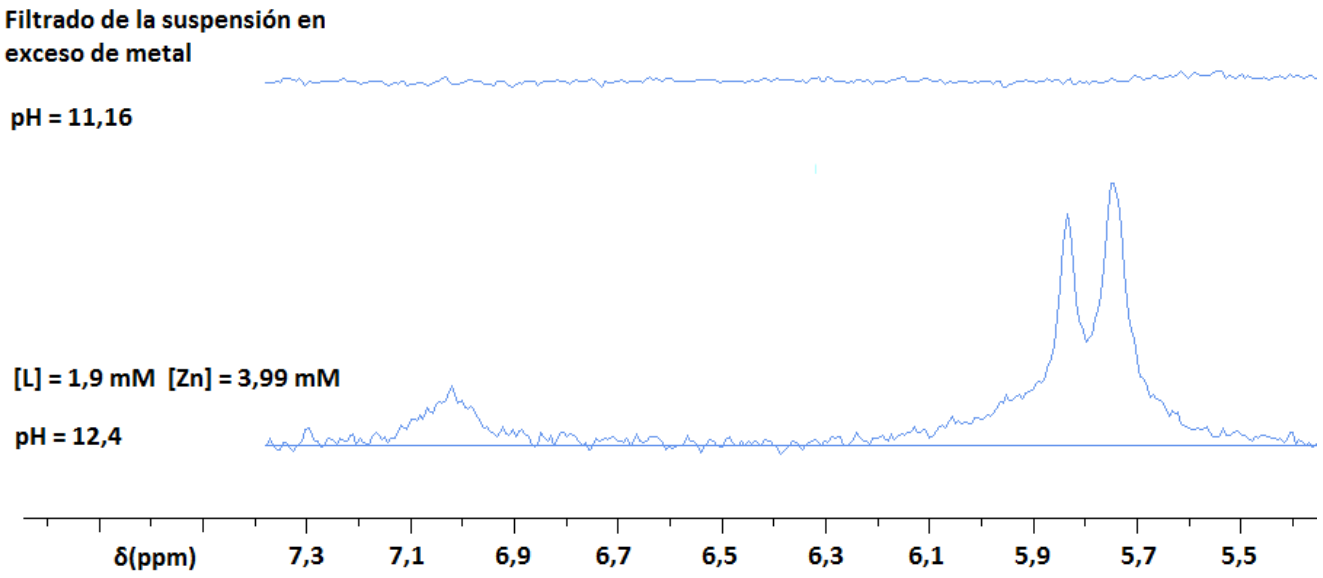


Figura 7.16. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Zn^{2+} de una solución con exceso de ion metálico y del filtrado de una suspensión de fitato de cinc (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

A diferencia de lo observado para el sistema fitato-magnesio, no existe ninguna especie que se forme lentamente antes de la aparición de la fase sólida, la que en este caso se da a concentraciones de metal por encima de las mostradas en la figura 7.13A. De hecho, la comparación entre los espectros de RMN obtenidos en condiciones de exceso de ion metálico y mediante el filtrado de una suspensión de fitato de cinc, verifican lo anterior (figura 7.16). El filtrado del sólido remueve completamente las señales, no detectándose ninguna especie asociada al fitato de cinc sólido. Por lo tanto, las especies complejas asociadas a la fase sólida que pudieran formarse en condiciones de exceso de ion metálico, como el complejo neutro $[Zn_5(H_2L)]$ detectado en los experimentos potenciométricos, lo hacen en condiciones que se encuentran fuera de las aplicadas en los experimentos de RMN (bajo pH, en exceso de ion metálico) y/o poseen una solubilidad muy baja, que restringe su concentración a niveles indetectables en estas condiciones.

En resumen, en presencia de exceso de metal, en medio muy básico, los complejos 1:1 de cinc aumentan su nuclearidad, dando especies de estabilidad

muy similar con estequiometrias 2:1 y 3:1 (metal:ligando). A mayores relaciones metal:ligando la fase sólida aparece en el sistema, siendo tal vez mediada por una especie pentametálica, no detectada mediante los datos espectroscópicos por RMN, de solubilidad seguramente muy baja.

El ajuste de los datos de la figura 7.13A aporta, además de las constantes de formación globales de la tabla 7.1, los valores de desplazamiento químico individuales de las especies polimetálicas. Los mismos, junto con los valores de Δδ relacionados se muestran en la tabla 7.6.

Tabla 7.6. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{comp\ sucesiva}$ (para el proceso de ganancia sucesiva de un ion cinc) para el sistema InsP_6-Zn^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[ZnL]^{10-}$	5,523	6,358	6,385	6,088
$[Zn_2L]^{8-}$	3,736	6,957	6,730	6,382
$[Zn_3L]^{6-}$	7,575	6,849	5,043	5,401
	$\Delta\delta_{compl\ sucesiva}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[ZnL]^{10-}$	-0,429	-0,946	0,849	0,294
$[Zn_2L]^{8-}$	-1,787	0,600	0,344	0,293
$[Zn_3L]^{6-}$	3,839	-0,108	-1,687	-0,980

Siguiendo la estrategia adoptada para la interpretación de los datos de las especies análogas de calcio, los valores de $\Delta\delta_{compl\ sucesiva}$, determinados para el proceso genérico $[Zn_nL]^{(12-2n)-} \rightarrow [Zn_{(n+1)}L]^{(12-2n-2)-}$ muestran que el primer ion cinc se asocia a la caja preformada por los fosfatos en C1, C2 y C3 (conformación 5a1e). El siguiente ion Zn^{2+} se uniría entre ambos fosfatos en 1 y 3, tal vez con cierta participación a distancia de P5, aunque su $\Delta\delta_{compl\ sucesiva}$ sigue siendo positivo por el efecto de desblindaje de ambos cationes. Los valores correspondientes a $[Zn_3L]^{6-}$ son difíciles de interpretar, siendo los más afectados de error, por estimarse a partir de los puntos experimentales del extremo superior del rango de concentraciones de metal utilizadas. No obstante, el tercer ion cinc parece ubicarse por debajo de anillo, entre ambos

fosfatos P4 y P6. Este último efecto provocaría que por encima del anillo carbonado los iones cinc restantes se rearreglen, acercándose a P2 y P5, causando un aumento en el valor de $\Delta\delta_{\text{compl sucesiva}}$ para P1/3.

3.4. Sistema InsP_6-Co^{2+}

3.4.1. Estudio espectroscópico UV-visible

Los espectros UV-visible en función del pH para una solución de fitato de 9,98 mM y de metal 4,94 mM, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C, se muestran en la figura 7.17A. Un análisis general evidencia un cambio importante en el perfil espectroscópico de los complejos en la zona visible, que se da a partir de pH = 9. En este proceso ocurre un movimiento de las bandas hacia mayores longitudes de onda, a medida que la intensidad crece alrededor de 10 veces la original. Experimentalmente, se observa un cambio de color notorio a simple vista, desde una solución rosada (medio ácido-neutro) a otra de tinte violáceo (medio básico). Estos aspectos son totalmente concordantes con un cambio en la geometría del entorno de coordinación del centro metálico [14].

Dada la estructura del fitato, caracterizado por grupos donores del tipo P-O, es lógico suponer que es un ligando ubicado abajo en la serie espectroquímica y que el ion cobalto se asocia a él en un estado de alto espín [15]. El diagrama de niveles de energía para el ion Co^{2+} de alto espín prevé un cambio importante de las bandas en el rango visible desde una geometría octaédrica hacia una tetraédrica [14,15]. En el primer caso, el espectro electrónico está dominado por una transición del tipo $^4T_{1g}(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$, aunque el nivel $^4A_{2g}$ está generalmente cerca del nivel $^4T_{1g}(P)$, con lo que las transiciones a estos dos niveles están estrechamente unidas, dando un banda ancha de baja intensidad. En los sistemas tetraédricos, las bandas en el espectro visible son mucho más intensas y aparecen a mayores longitudes de onda. La transición principal, $^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(P)$, está asociada a una banda que posee envolturas complejas, debido a varias transiciones a estados doblete excitados, cuya intensidad se ve aumentada por el acoplamiento espín-órbita[14]. En conclusión, en presencia del InsP_6, el ion cobalto(II) sufre un cambio importante en la geometría del poliedro de coordinación, desde un entorno octaédrico hacia uno tetraédrico. Este proceso operaría en un rango de pH relativamente estrecho (9 – 11).

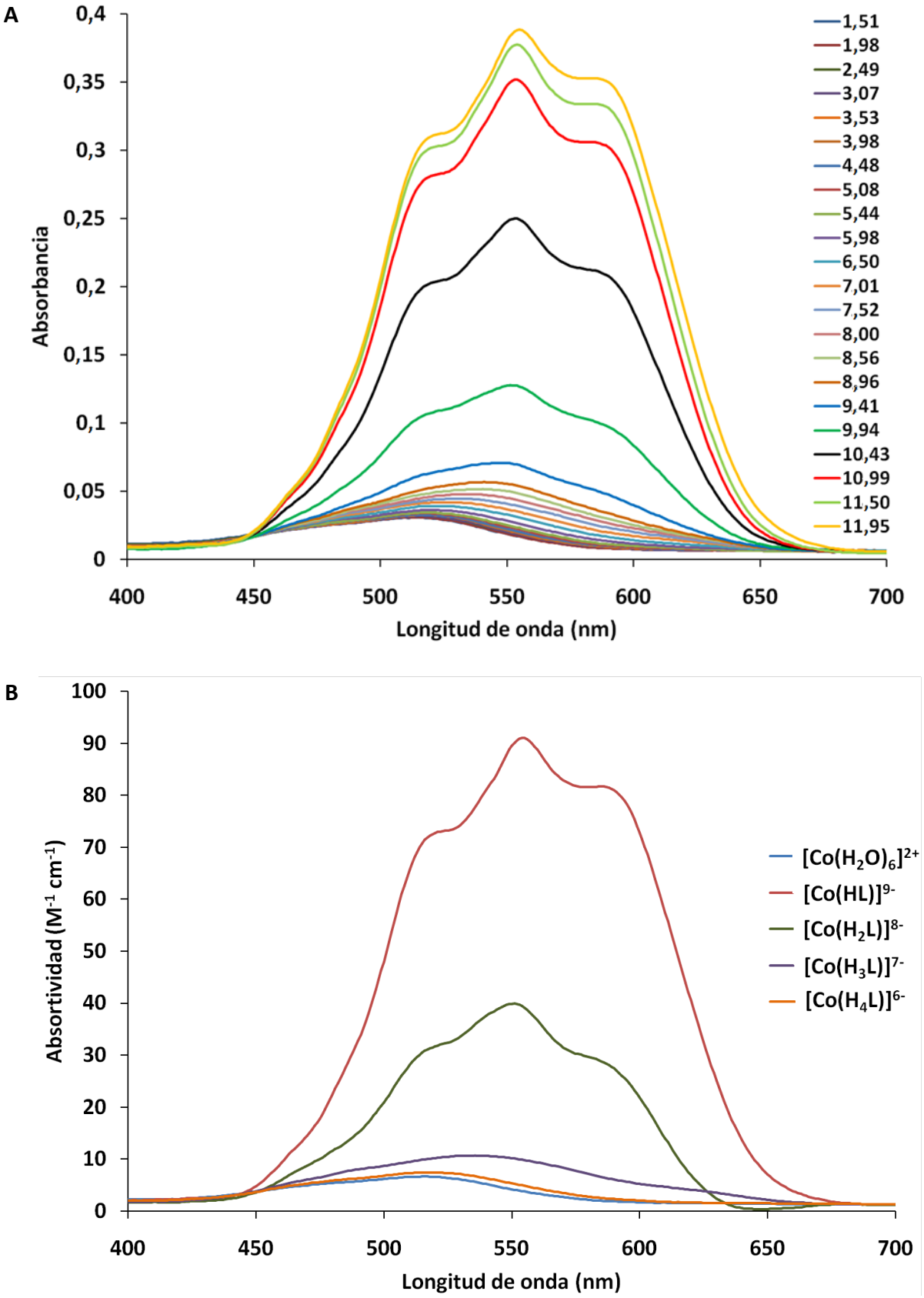


Figura 7.17. (A) Espectros UV-visible para el sistema InsP_6-Co^{2+} en función del pH ([L] = 9,98 mM, [Co^{2+}] = 4,94 mM), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Se detallan a la derecha los valores de pH ajustados en cada caso. (B) Espectros UV-visible individuales de las especies.

Un estudio espectroscópico similar, reportado por Bebot-Brigaud en condiciones que se apartan moderadamente de las fisiológicas[7], arriba a conclusiones similares. Sin embargo, realizan un análisis del sistema sólo desde un punto de vista cualitativo. En este trabajo se pretende ampliar este estudio, en condiciones similares a las fisiológicas, analizando cuantitativamente el comportamiento químico y espectroscópico del sistema mediante el ajuste de un modelo de especies a los datos experimentales. De esta forma, se podrá obtener datos que permitan caracterizar estructuralmente los complejos.

La mencionada variación de los espectros visibles con el pH facilita el ajuste de las especies complejas para este sistema, disminuyendo los errores asociados. Los resultados, que se resumen en la tabla 7.1, plantean un modelo similar al potenciométrico, detectándose las especies $[Co(HL)]^{9-}$, $[Co(H_2L)]^{8-}$, $[Co(H_3L)]^{7-}$ y $[Co(H_4L)]^{6-}$. Los espectros individuales de estas especies se muestran en la figura 7.17B. Dadas las características de las bandas, se puede concluir que en la especie $[Co(HL)]^{9-}$, el ion cobalto se rodea de cuatro átomos donores ubicados en una geometría tetraédrica. Asimismo, para valores menores de pH, la protonación de las especies induce un cambio en el entorno de coordinación, ubicando al ion metálico en una geometría esta vez octaédrica (especies $[Co(H_3L)]^{7-}$ y $[Co(H_4L)]^{6-}$). La especie $[Co(H_2L)]^{8-}$ posee un comportamiento intermedio y es difícil caracterizarla en este sentido. Sin embargo, su espectro parece ser intenso y se distingue la existencia de tres bandas fusionadas. Es viable, por tanto, que este complejo contenga al cobalto en un entorno tetraédrico relativamente distorsionado o que las dos geometrías coexistan en equilibrio a ese pH. Estos resultados concuerdan en parte con el análisis cualitativo reportado por Bebot-Brigaud [7], en donde, a diferencia de los resultados obtenidos aquí, se caracteriza al entorno del metal en la especie $[Co(H_3L)]^{7-}$ como tetraédrico. Asimismo, los autores asocian este cambio en la geometría de coordinación con la aparición de especies complejas monodentadas a bajos pH y bidentadas a pH más altos. Esta afirmación se basa en resultados de estudios por RMN de ^{31}P del sistema InsP_6-Zn, los cuales son sólo cualitativos, mediante una mera inspección de las curvas de desplazamiento químico en función del pH. Dado los resultados potenciométricos, espectroscópicos (UV-visible y RMN) y teóricos obtenidos en la presente tesis, se considera más factible un modelo polidentado de coordinación.

3.4.2. Estudio termodinámico y estructural por RMN de ^{31}P

Con este sistema se comienza el análisis de aquellos metales que, por su paramagnetismo, pueden afectar de forma significativa la relajación nuclear de los átomos de fósforo en el ligando. En este sentido, el aumento en el ancho de las señales será en algunos casos extremo, con la consecuente pérdida de información estructural. De la misma forma, los corrimientos hiperfinos sobre los desplazamientos químicos no serán despreciables. Los espectros de RMN de ^{31}P en función del pH, obtenidos para relación molar Co:fitato 1:2 se muestran en la figura 7.18A. En términos generales, el ensanchamiento de las señales es severo, y los máximos de algunas de ellas comienzan a resolverse sólo por encima de pH = 11. Esto provoca una pérdida significativa de información química, ya que son asignables solo 5 espectros, de los 24 registrados. De hecho, en el caso del fosfato en C2, sólo en 4 espectros en el rango básico es posible una asignación directa, debido a que la señal se ensancha y fusiona con las otras tres. El esquema de asignación debe realizarse, entonces, desde medio básico, por comparación con las señales del ligando. Haciendo un ajuste restringido del sistema, en el rango pH 11 - 12,5, se obtienen los resultados resumidos en la figura 7.19A.

La curva teórica reproduce de forma satisfactoria la tendencia de los desplazamientos químicos en función del pH. En base a estos resultados, el modelo de especies que mejor explica este comportamiento se detalla en la tabla 7.1. Dado que el ajuste se realizó a pH > 11, el conjunto de complejos detectados corresponden a especies donde el ligando aparece en un alto grado de deprotonación. Por RMN se detecta la especie $[CoL]^{10-}$, predominante sólo por encima de pH = 12 (ver diagrama en la figura 7.20). La protonación de la misma da lugar a $[Co(HL)]^{9-}$, cuyo rango de existencia puede estimarse, a grandes rasgos, entre pH 9 y 12, por la conjunción de los datos potenciométricos y espectroscópicos.

Desafortunadamente, el ensanchamiento de las bandas evita poder sacar conclusiones sobre un posible cambio conformacional de los complejos. Más aún, dados los resultados obtenidos a través de los diversos métodos aplicados, es posible que ese cambio conformacional tenga alguna relación tanto con el cambio en el entorno de coordinación detectado por espectroscopía UV-visible, como con el comportamiento dual de las señales en el RMN.

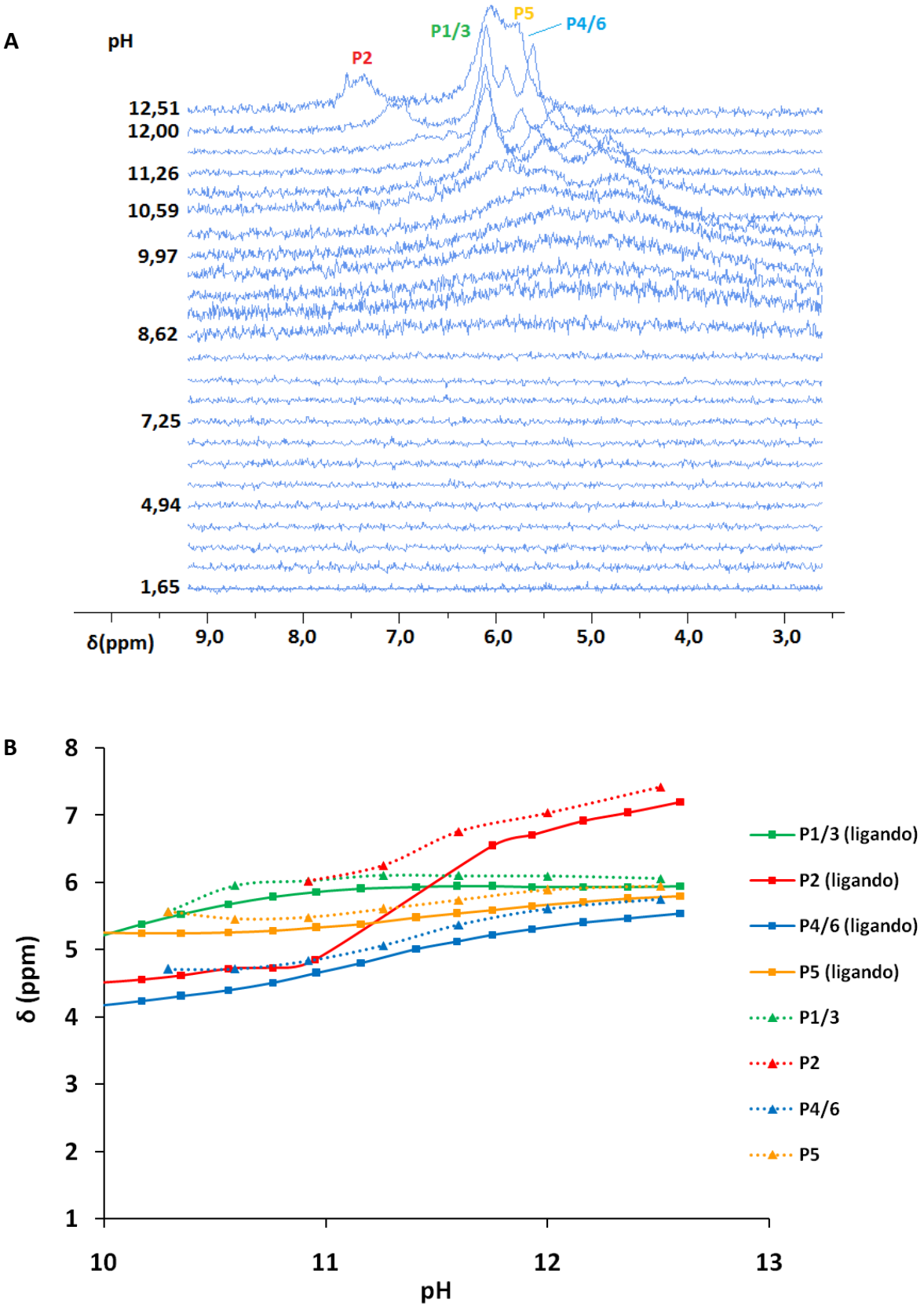


Figura 7.18. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Co^{2+} en función del pH, a 37,0 ˚C e *I* = 0,15 M ([L] = 10,04 mM, [Co^{2+}] = 4,98 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Co^{2+} (líneas discontinuas).

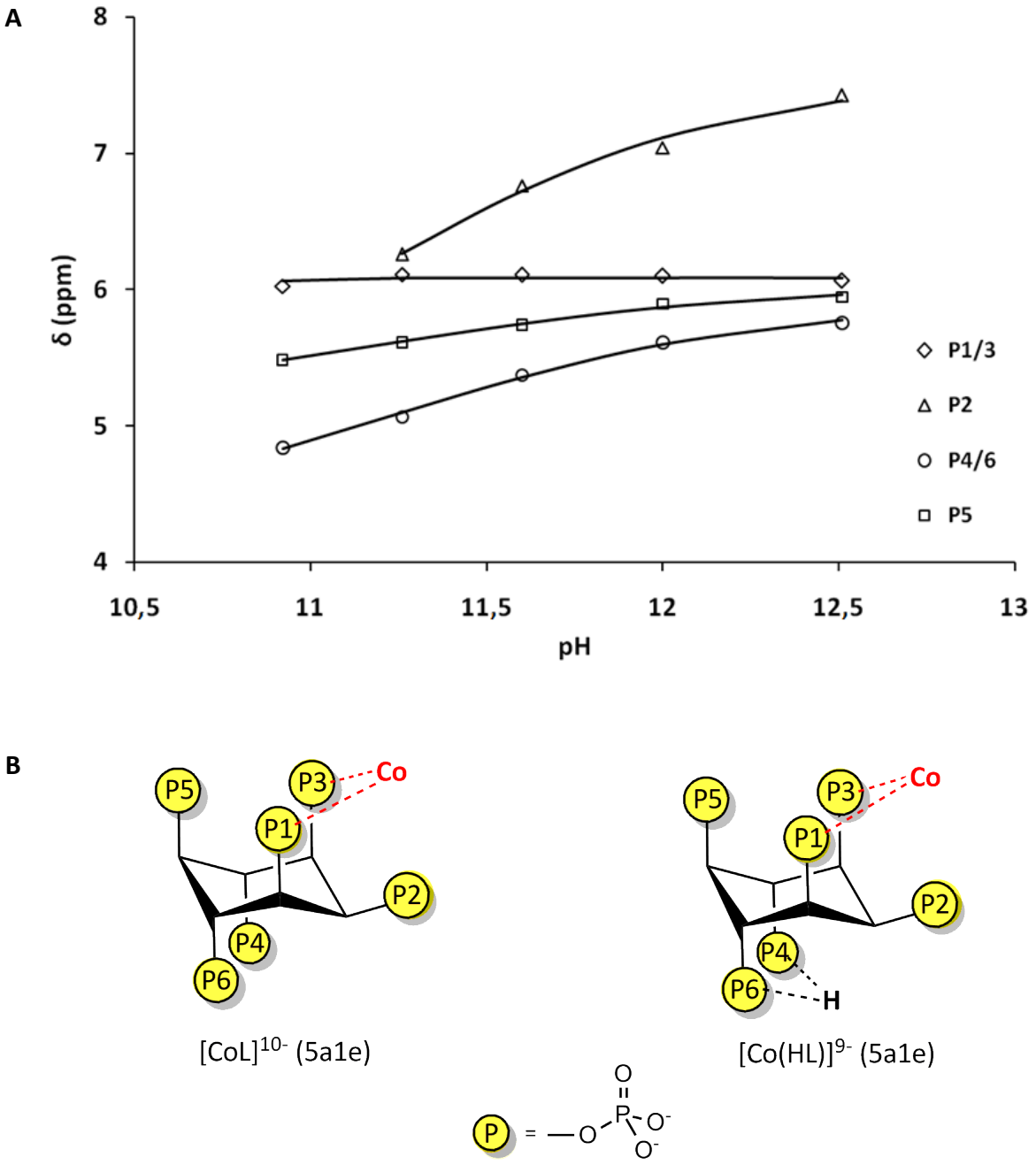


Figura 7.19. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema InsP_6-Co^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Co^{2+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

En este sentido, los complejos $[Co(H_4L)]^{6-}$ y $[Co(H_3L)]^{7-}$, donde el cobalto se encuentra en un entorno octaédrico, permanecen en solución hasta pH = 10; de hecho, el último es predominante hasta pH cercano a 9. Por comparación con lo observado en el resto de los sistemas, es probable que la conformación

del ligando sea en estos casos 1a5e. En estas condiciones, los espectros de RMN revelan una relajación nuclear casi instantánea, con pérdida total o casi total de las señales en el espectro (figura 7.18A). Las características del entorno de coordinación para ambos compuestos parecen ser tales que maximizan el efecto paramagnético del ion metálico sobre los núcleos de fósforo. Por encima de pH = 9, se hacen predominantes los complejos $[Co(H_2L)]^{8-}$, $[Co(HL)]^{9-}$ y $[CoL]^{10-}$, los que según los espectros visibles obtenidos poseen al cobalto rodeado de 4 átomos donores, en un entorno tetraédrico. La resolución de las señales en el RMN comienza a mejorar a partir de este punto, hasta alcanzar, a pH = 11, una definición que permite la asignación de las mismas (figura 7.18A). Este tipo de entorno de coordinación permitiría, aparentemente, favorecer la relajación electrónica del ion metálico, disminuyendo en parte los efectos de la densidad de espín sobre los tiempos de relajación nuclear. Dado este cambio radical de entorno que sufre el ion cobalto, el que opera además en un rango de pH relativamente estrecho, una hipótesis que se puede manejar implica un cambio conformacional del ligando entre un conjunto de especies y el otro, que se relacione, en cierta medida, con un rearreglo sustancial del poliedro de coordinación, modulando el comportamiento espectroscópico del sistema.

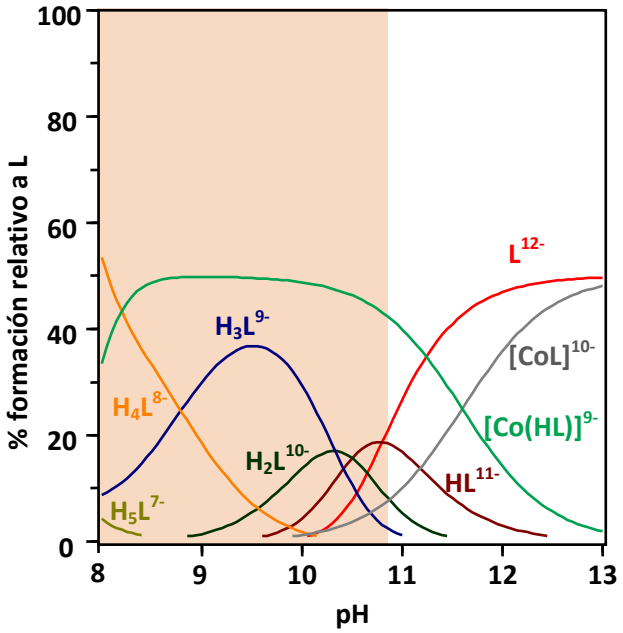


Figura 7.20. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Co^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C (([L] = 10,04 mM, $[Co^{2+}]$ = 4,98 mM). Se resalta la zona de pH no utilizada para el ajuste de las constantes de formación espectroscópicas por RMN.

Como resultado adicional derivado del ajuste realizado, en la tabla 7.7 se resumen los desplazamientos químicos individuales y su variación con los procesos de protonación y complejación. El análisis de estos valores es sumamente complejo, en primer término por los diversos procesos de complejación, deprotonación y desblindaje sufridos por cada grupo fosfato. Asimismo, se deben tener en cuenta los efectos del corrimiento hiperfino sobre los desplazamientos químicos, dado el carácter paramagnético del ion cobalto(II). Este fenómeno es muy difícil de predecir en el caso de núcleos de heteroátomos. Ha sido reportado que el corrimiento hiperfino de contacto que opera sobre las señales de ^{31}P debido a la unión de un ion Co^{2+} a ligandos con grupos dadores P-O es hacia campos bajos [16]. Esto último influiría, en efecto, en el hecho de que los $\Delta\delta_{compl}$ sean en este caso todos positivos, como también se advierte del corrimiento de las curvas de δ *vs*. pH de la figura 7.18B.

Tabla 7.7. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ (a partir de la especie del ligando correspondiente) para el sistema InsP_6-Co^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CoL]^{10-}$	6,225	7,789	6,239	6,242
$[Co(HL)]^{9-}$	6,244	5,537	4,434	5,386
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CoL]^{10-}$	---	---	---	---
$[Co(HL)]^{9-}$	0,019	-2,252	-1,805	-0,856
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[CoL]^{10-}$	0,273	0,485	0,703	0,448
$[Co(HL)]^{9-}$	0,378	1,927	0,095	0,360

Atendiendo a estas consideraciones, si se observan en conjunto los valores de δ individuales, el valor para la señal de P1/3 varía muy poco de un complejo al otro. Considerando para ambos complejos el estado conformacional 5a1e y teniendo en cuenta el modelo estructural aplicado para Zn^{2+} y Ca^{2+}, es posible

que el metal esté asociado a P1/3 con participación a la distancia de P2 y P5 (figura 7.19B). Esto permitiría que el protón que ingresa en el proceso $[CoL]^{10-}$ → $[Co(HL)]^{9-}$ afecte mayoritariamente las señales del resto de los fosfatos (menores valores de $\Delta\delta_{prot}$ para P2, P4/6 y P5).

Es factible que el microestado mayoritario del complejo $[Co(HL)]^{9-}$ contenga al grupo P4/6 protonado, mientras que P2 podría interaccionar en parte con ambos grupos por debajo del anillo (figura 7.19B). Esto explicaría el gran valor de $\Delta\delta_{comp}$ observado para P2, el cual en el proceso HL^{11-} → $[Co(HL)]^{9-}$ pierde el protón sobre él, siendo transferido a P4/6. Este mismo mecanismo daría cuenta del pequeño valor de este parámetro para P4/6; la ganancia de un protón compensa en parte los efectos debidos al desblindaje y corrimiento hiperfino.

Para finalizar el análisis, en la figura 7.21A se muestra el comportamiento de las señales, en medio básico (pH = 12,4), a medida que se aumenta la concentración de Co^{2+}, hasta alcanzar una relación ligando-metal de 1:1. Como era de esperarse según los valores de $\Delta\delta_{compl}$, todas las señales se ven afectadas hacia campos bajos y no se observa entrecruzamiento de señales. El ancho de las mismas aumenta progresivamente, en concordancia con un aumento en la concentración de las especies paramagnéticas complejas. Haciendo uso de las constantes de equilibrio ajustadas por RMN (tabla 7.1) y los desplazamientos químicos individuales de los complejos (tabla 7.7) es posible predecir el movimiento que deberían exhibir las señales en estas condiciones. En la figura 7.21B se muestran los resultados. El ajuste del modelo teórico obtenido es bueno y reproduce la tendencia general de las señales en función de la concentración de cobalto. Los residuales, aunque menores a 0,1 ppm, son más altos sobre todo a relaciones cercanas a 1:1 ligando:metal, donde la asignación es más dificultosa por la pérdida de resolución de los espectros. La concordancia obtenida entre valores teóricos y experimentales brinda una prueba empírica independiente de la bondad del modelo de especies 1:1, el cual fue ajustado con relativamente pocos puntos en medio básico.

Resta establecer qué ocurre en presencia de exceso de Co^{2+}. Sin embargo, el aumento de la concentración de metal por encima de relaciones molares L:Co^{2+} 1:1 provoca que el fitato precipite. En la figura 7.22 se comparan los espectros del filtrado de una suspensión de fitato de cobalto con el correspondiente al último punto de la corrida de pH variable (pH = 12,51, figura 7.18A).

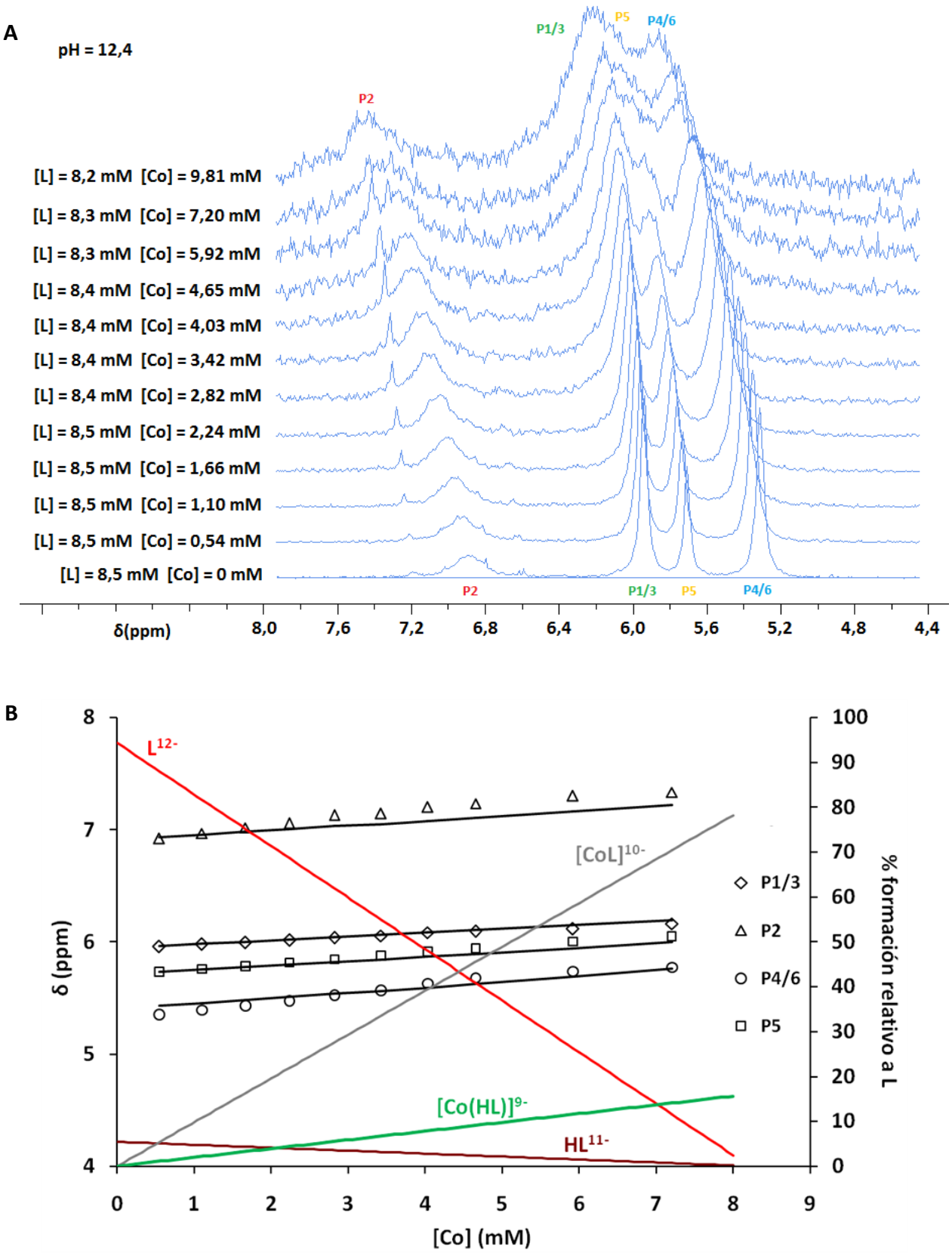


Figura 7.21.(A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Co^{2+} en función de la concentración de metal y ligando, a pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (B) Ajuste de los datos de (A), en donde la curva continua en negro corresponde al modelo teórico y superpuesto se muestra el diagrama de distribución de especies en base al modelo ajustado.

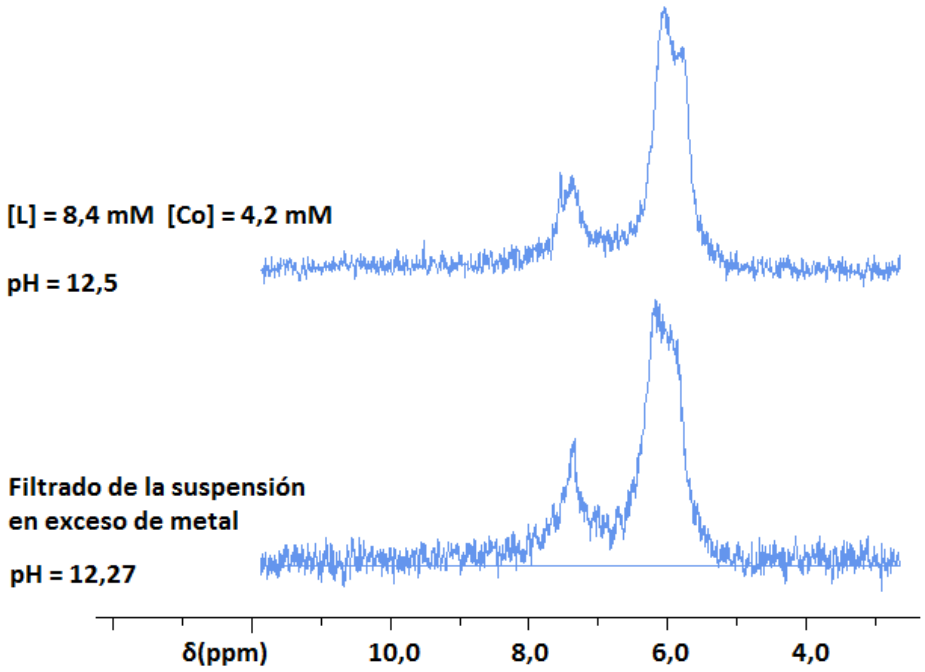


Figura 7.22. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Co^{2+} de una solución 2:1 fitato-cobalto y del filtrado de una suspensión de fitato de cobalto (en medio básico, NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

En línea con los resultados potenciométricos y con el ajuste de la figura 7.21B, no se detecta en este sistema la formación de ninguna especie polimetálica. La similitud entre ambos espectros es significativa, tanto en desplazamiento químico como en intensidad de las señales, lo que estaría de acuerdo con la formación de especies 1:1 que den lugar, por interacción entre ellas, a la formación del sólido correspondiente, en condiciones de exceso de ion metálico.

3.5. Sistema InsP_6-Ni^{2+}

3.5.1. Estudio espectroscópico UV-visible

La figura 7.23A muestra los espectros UV-visible, en función del pH, para una solución 9,97 mM de fitato y 4,96 mM de Ni^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Las absorbancias registradas son bajas y el perfil espectral ruidoso, debido a las concentraciones máximas alcanzadas por las especies complejas, limitadas por la concentración de metal utilizada en los experimentos.

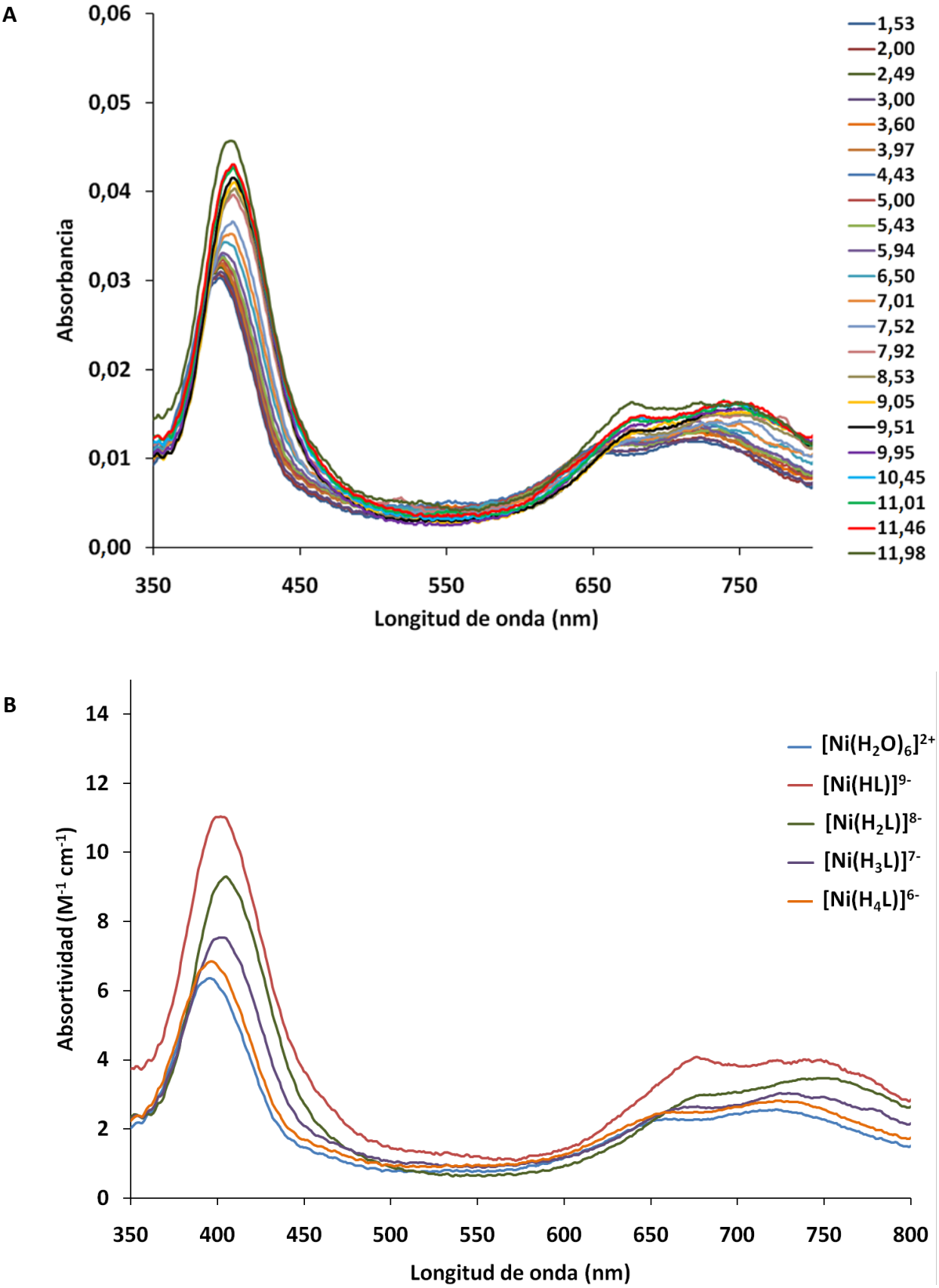


Figura 7.23. Espectros UV-visible para el sistema InsP_6-Ni^{2+} en función del pH ([L] = 9,97 mM, [Ni^{2+}] = 4,96 mM), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Se detallan a la derecha los valores de pH ajustados en cada caso. (B) Espectros UV-visible individuales de las especies.

Según se reporta en la bibliografía especializada, la distribución de las bandas es característica de los complejos de Ni^{2+} que presentan una geometría octaédrica del entorno de coordinación[15]. Se esperan en el rango UV-visible dos transiciones permitidas por espín, existiendo una tercera hacia la región del infrarrojo cercano[14]. Las dos primeras son las que se aprecian en la figura 7.23A y están asociadas a los procesos $^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$ y $^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$, los que involucran energías relacionadas con longitudes de onda en el entorno de 400 y 714 nm respectivamente. En particular, el ensanchamiento de la banda central es característico de los complejos octaédricos de Ni^{2+}, y es causado principalmente por el acoplamiento espín-órbita que mezcla los estados $^3T_{1g}(F)$ y ^1E_g, muy cercanos en energía.

El ajuste de estos espectros en función del pH es satisfactorio, lo que da lugar a un pequeño valor de σ (0,0015). Éste da como resultados los valores de constantes de formación detallados en la tabla 7.1. Los espectros individuales ajustados para las especies, mostrados en la figura 7.23B, brindan algunos datos estructurales de interés. En apariencia, los mismos no cambian de forma significativa con la coordinación metálica. Asimismo, tampoco varían entre las diversas especies complejas, siendo en todos los casos la geometría del entorno de coordinación octaédrica. Afinando el análisis, a medida que el ligando se protona el espectro de las especies se acerca progresivamente al correspondiente al ion $[Ni(H_2O)_6]^{2+}$, lo que estaría indicando una leve disminución en la intensidad de la interacción ligando-metal con la carga de la especie del ligando que reacciona (hecho que verifica la evaluación realizada de las constantes de estabilidad potenciométricas en el capítulo 5). Desde un punto de vista estructural es esperable un enlace fitato-metal con un carácter electrostático importante, en concordancia con la alta carga de las formas del ligando disponibles en la solución. En esta misma línea de razonamiento, es probable que la protonación de los grupos fosfato permita, de hecho, un aumento en la participación de moléculas de agua de la solución en el enlace al metal, volviendo el entorno del ion níquel progresivamente más similar al que posee en el complejo hexaacuo.

3.5.2. Estudio termodinámico y estructural por RMN de ^{31}P

Para finalizar con el estudio por RMN de los sistemas fitato-M^{2+}, se analiza el comportamiento químico del ligando en presencia de níquel, para una solución con relación molar 2:1 InsP_6:metal. Los espectros para diferentes valores de pH se muestran en la figura 7.24A. De la misma forma que en presencia del ion Co^{2+}, las señales se ensanchan a medida que disminuye el pH. Sin embargo, en este caso en particular el efecto paramagnético sobre la relajación nuclear es menos acentuado. De hecho, la asignación de las bandas por comparación con las correspondientes al ligando en ausencia del metal es posible desde medio básico hasta pH ≈ 9,7. Por debajo de este valor, el ensanchamiento de las señales y su fusión imposibilitan cualquier intento de identificación de las mismas.

En la figura 7.24B se comparan las curvas de desplazamiento químico en función del pH en presencia y ausencia de níquel. A diferencia de lo observado para un sistema similar pero diamagnético, InsP_6-Zn^{2+}, todos los valores de δ sufren un corrimiento hacia campos menores. Parece factible, entonces, que este efecto tenga que ver con los corrimientos hiperfinos de contacto y dipolar que sufren los núcleos de fósforo al acercarse al ion niquel(II). La señal más afectada es la correspondiente al fosfato en C2. Es probable que, además del corrimiento hiperfino mencionado, el metal se asocie a él mayoritariamente, desplazando protones y provocando un aumento en el efecto de disminución del campo observado. El mismo está sobreevaluado en la figura 7.24B, debido a que en la zona en donde ocurre el salto del desplazamiento químico de la señal la asignación es bastante dudosa, ya que se ensancha y se fusiona con las demás. Con estos datos de δ en función del pH se realiza un ajuste en el rango de pH 9,7 - 12,5. Atendiendo a lo mencionado, los puntos correspondientes al salto de la señal de P2 no fueron tenidos en cuenta en el cálculo. Los resultados se detallan en la figura 7.25A y en la tabla 7.1. El ajuste de las señales es bastante bueno, dejando residuales por debajo de 0,05 ppm. Según se advierte en la figura 7.26, al igual que ocurría con el ion Co^{2+}, la deprotonación de $[Ni(HL)]^{9-}$ da lugar a $[NiL]^{10-}$, cuya predominancia está restringida por encima de pH = 10.

Por otra parte, el ensanchamiento de las señales provoca una pérdida de resolución que dificulta el análisis de las características morfológicas espectrales relacionadas con el cambio conformacional de los complejos

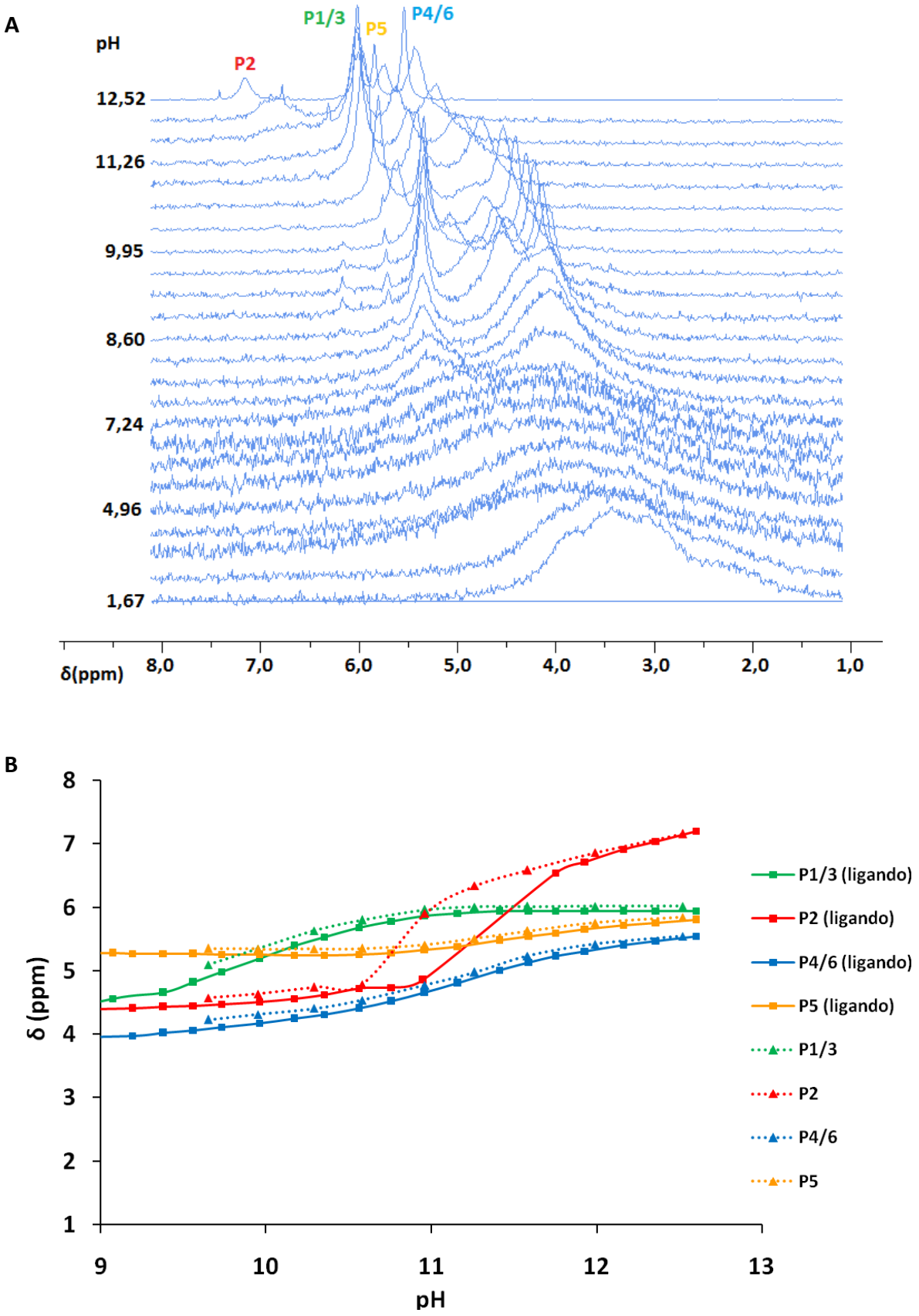
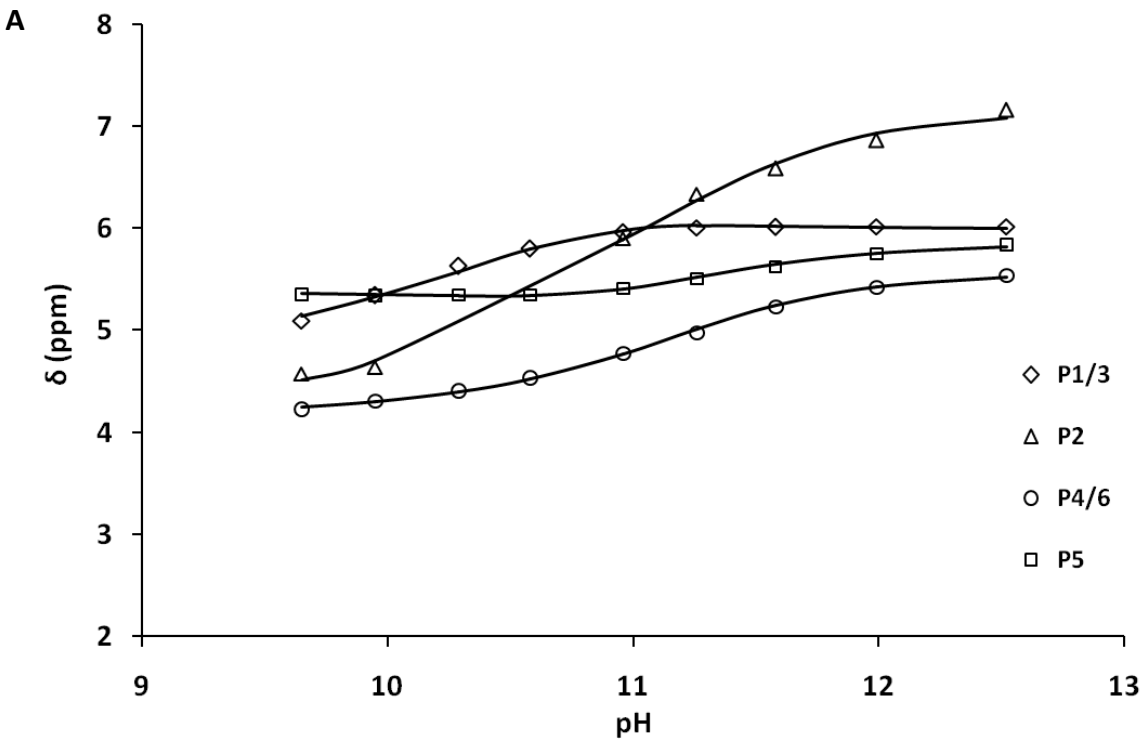


Figura 7.24. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Ni^{2+} en función del pH a 37,0 ˚C e *I* = 0,15 M ([L] = 10,04 mM, [Ni^{2+}] = 4,99 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Ni^{2+} (líneas discontinuas)



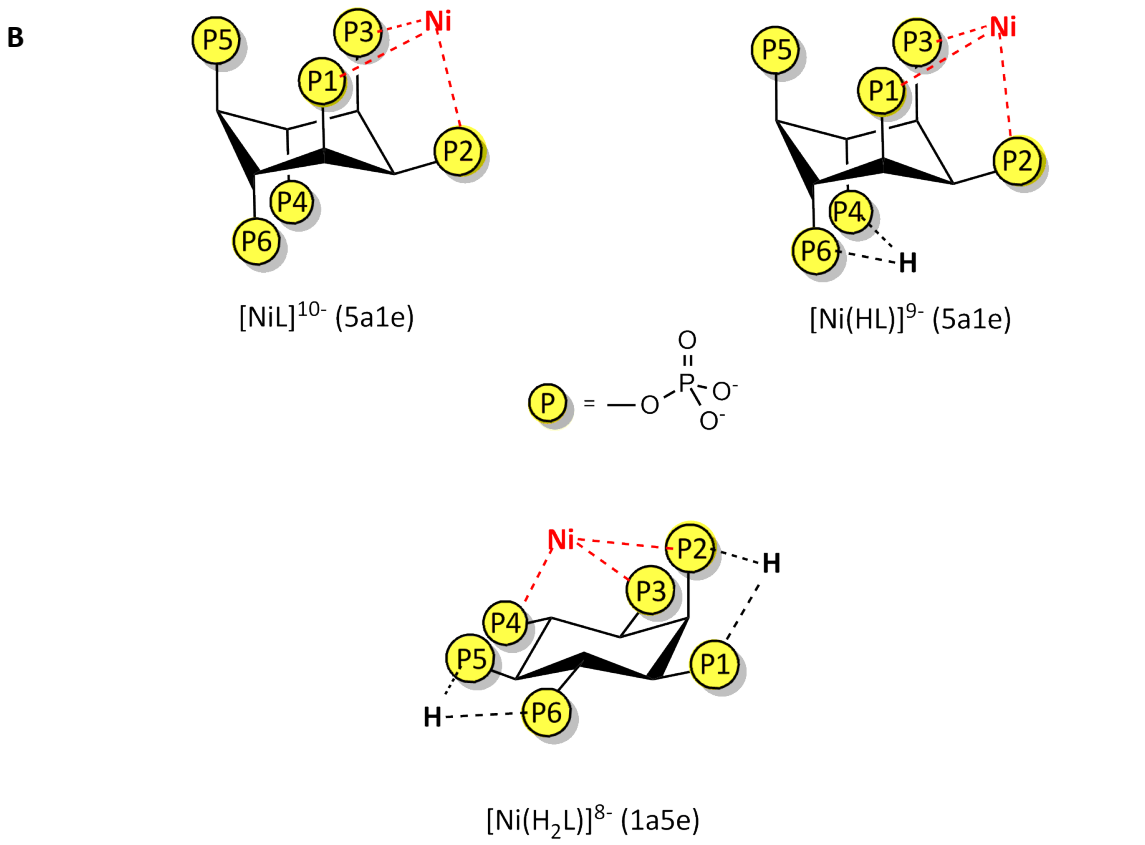


Figura 7.25. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema InsP_6-Ni^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Ni^{2+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

en solución. Al igual que ocurría con los sistemas diamagnéticos, es probable que dicha transición conformacional ocurra, en un rango de pH por encima de la neutralidad. En este caso no se detecta por espectroscopía UV-visible un cambio sustancial de la geometría del entorno de coordinación del ion metálico, ni pérdida total de las señales del RMN en el rango básico (figura 7.24A). Esto sugiere que la transición entre ambos estados conformacionales, de existir, no generaría, como aparentemente ocurre con el ion Co^{2+}, una alteración sustancial en la geometría del poliedro de coordinación del Ni^{2+}.

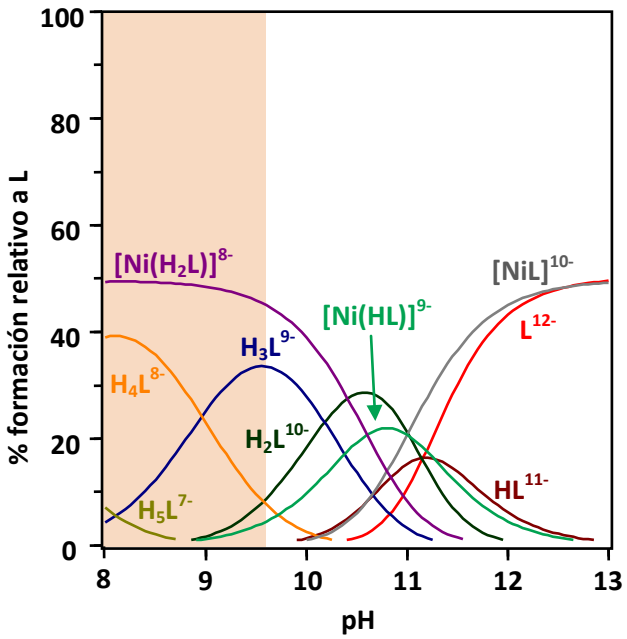


Figura 7.26. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Ni^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C (([L] = 10,04 mM, [Ni^{2+}] = 4,99 mM). Se resalta la zona de pH no utilizada para el ajuste de las constantes de formación espectroscópicas.

Para un entendimiento completo del sistema es necesario encontrar la causa del comportamiento de las señales en medio neutro-ácido, donde el ruido espectral y el ancho de banda aumentan dramáticamente. Una posible explicación se deriva del análisis de la distribución de especies relativa al metal, determinada a partir de los resultados potenciométricos (figura 7.27). Como se observa en el diagrama, por debajo de pH = 7 el ligando se protona lo suficiente como para perder afinidad por el ion metálico, liberándolo progresivamente a la solución. En estas condiciones, el ion metálico sería capaz de aumentar la

velocidad de relajación nuclear por dos mecanismos distintos [16]. El primero involucra el intercambio químico del metal entre el ligando y la solución, el cual según la figura 7.27, se establece en el rango de pH 5 - 7. Este intercambio genera una alteración de la densidad de espín que los núcleos de fósforo experimentan, estimulando su relajación. Por otra parte el segundo mecanismo, denominado relajación de esfera externa, sería en este sistema particularmente importante a pH más bajos. Involucra la interacción a distancia entre el ion metálico libre y el ligando, la que se da a través de choques aleatorios que son regulados por la difusión de los componentes. A través de estos encuentros, la energía de interacción núcleo-electrón se ve afectada, favoreciendo la relajación nuclear, y con ello el aumento del ruido espectral y el ancho de las señales.

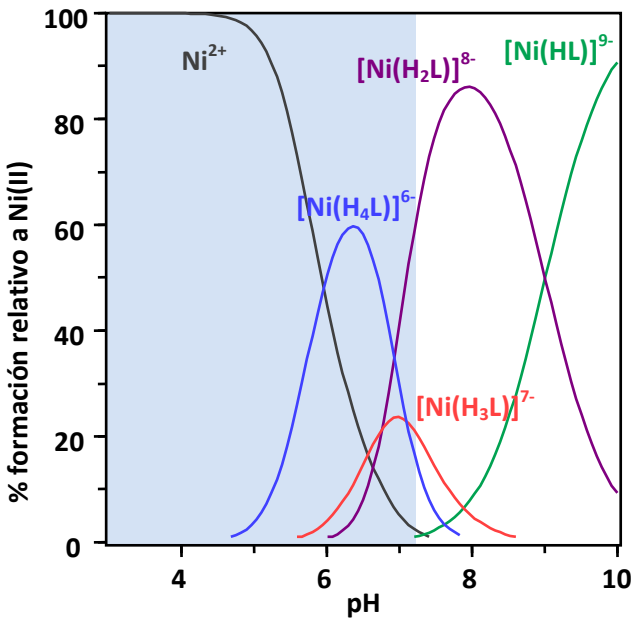


Figura 7.27. Diagrama de distribución de especies relativo a metal para el sistema InsP_6-Ni^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C (([L] = 10,04 mM, [Ni^{2+}] = 4,99 mM). Se resalta en celeste la zona donde el ensanchamiento de las señales y la pérdida de resolución de los espectros de RMN es sustancial.

El ajuste de las señales en función del pH da como resultados, además del modelo de especies, los desplazamientos químicos individuales que se resumen, junto con los valores de Δδ derivados, en la tabla 7.8. De la misma forma que se estableció para el sistema con cobalto, el análisis de los valores se

realizará solo en términos generales, debido a los múltiples factores que los afectan.

Tabla 7.8. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ (a partir de la especie del ligando correspondiente) para el sistema InsP_6-Ni^{2+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[NiL]^{10-}$	6,038	7,006	5,585	5,900
$[Ni(HL)]^{9-}$	6,552	8,023	4,450	5,125
$[Ni(H_2L)]^{8-}$	5,256	4,184	4,412	5,497
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[NiL]^{10-}$	---	---	---	---
$[Ni(HL)]^{9-}$	0,513	1,017	-1,135	-0,775
$[Ni(H_2L)]^{8-}$	-1,295	-3,840	-0,037	0,372
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[NiL]^{10-}$	0,086	-0,298	0,048	0,105
$[Ni(HL)]^{9-}$	0,686	4,413	0,110	0,098
$[Ni(H_2L)]^{8-}$	-0,771	-0,701	-0,139	0,199

Como se esperaba, el fosfato más involucrado en la coordinación del metal en $[NiL]^{10-}$ es P2 ($\Delta\delta_{compl} < 0$). Suponiendo una conformación 5a1e del ligando en la especie compleja, por comparación con los otros sistemas fitato-M(II), es posible que P1/3 participe en cierta medida en la estabilización del aducto, a través de la formación de una “caja negativa” en C1-C2-C3 (figura 7.25B). Según los valores de $\Delta\delta_{prot}$, la protonación de esta especie para dar el complejo $[Ni(HL)]^{9-}$ ocurre preferencialmente a nivel de P4/6, y en menor medida P5, ambos grupos no asociados directamente al metal. Esto debe afectar a la distancia a los fosfatos en posición 1-2-3, cuyas señales se ven moderadamente resentidas (figura 7.25B). Asimismo, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ asociados al proceso $HL^{11-} \rightarrow [Ni(HL)]^{9-}$ muestran un valor muy grande para P2 y pequeño para P4/6 y P5. Esto podría explicarse por una transferencia protónica entre estos grupos,

debido a que la microespecie mayoritaria con n = 1 posee el fosfato en C2 protonado, mientras que en la especie compleja éste se ha trasladado a P4/6 ó P5. La señal de P2 ve aumentado su desplazamiento químico, mientras que los efectos de desblindaje, corrimiento hiperfino y protonación sobre P4/6 y P5 se verían parcialmente contrarrestados. La segunda protonación de las especies complejas genera una alteración de los desplazamientos químicos de P2 y P1/3 hacia campos altos, por lo que es posible que sean estos dos grupos los que compartan el protón entrante. Por otra parte, los valores de variación en los desplazamientos químicos debidos al proceso $H_2L^{10-} \rightarrow [Ni(H_2L)]^{8-}$ muestran a los fosfatos en C1/3 y C2 como los más afectados por la complejación. Sin embargo, P4/6 también se ve afectado en cierta medida. Este patrón en los valores de Δδ, que ya se presentó en el sistema fitato-Zn^{2+}, encuentra explicación en un posible cambio conformacional del ligando en los complejos, haciendo que el ion metálico pueda asociarse a P2 y P1/3 con cierta participación de P4/6 en el enlace (figura 7.25B). Dado que la señal de P5 no se ve afectada en gran medida por la complejación, es probable que conserve el protón que poseía en la microespecie mayoritaria con n = 2 ($H_2L(25)^{10-}$), y lo comparta por enlaces de hidrógeno con P4/6. El segundo protón podría unirse a P2 (muy bajo valor de $\Delta\delta_{compl}$), y ser compartido en cierta medida con el fosfato en P1/3 que no esté directamente unido al metal.

Dado que el cálculo de las constantes de formación de las especies complejas así como sus desplazamientos químicos individuales fue realizado en un rango de pH más pequeño que el total registrado, es necesario evaluar el desempeño del modelo para describir el comportamiento del sistema en otras condiciones experimentales, de forma de analizar su fiabilidad. Siguiendo la estrategia utilizada para el sistema fitato-cobalto(II), en la figura 7.28A se muestran los espectros para el sistema fitato-níquel, a pH = 12,3, para concentraciones crecientes de ion metálico. Todas las señales se ven afectadas, tanto en su desplazamiento químico como en su resolución. Los valores de δ de las mismas aumentan y, como ocurrió con el ion cobalto, no existe entrecruzamiento en el rango de condiciones estudiado. En la figura 7.28B se muestran los desplazamientos químicos experimentales de las señales de la figura 7.28A y el comportamiento de los mismos predicho para estas condiciones (curva continua en negro) determinado mediante el uso del modelo ajustado de especies (tabla 7.1) y sus desplazamientos químicos calculados (tabla 7.8).

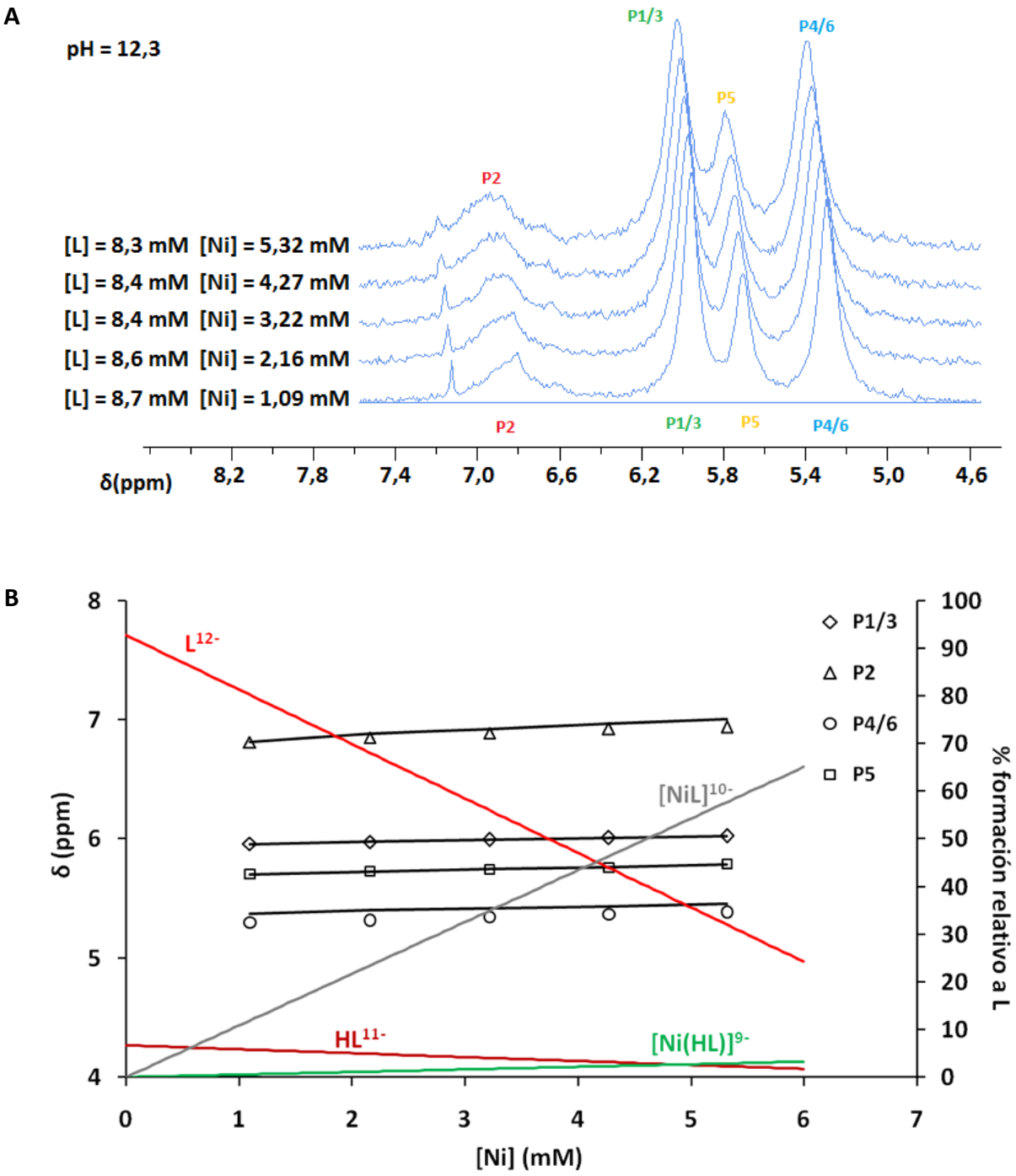


Figura 7.28.(A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Ni^{2+} en función de la concentración de metal y ligando, a pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (B) Ajuste de los datos de (A), en donde la curva continua en negro corresponde al modelo teórico y superpuesto se muestra el diagrama de distribución de especies en base al modelo ajustado.

El ajuste es muy bueno, por lo que el modelo se comporta de forma satisfactoria en la predicción de la interacción ligando-metal para valores altos de pH. Más aún, no se necesita la formación de ninguna otra especie más allá

de las 1:1 ya revisadas, $[NiL]^{10-}$ y $[Ni(HL)]^{9-}$, para reproducir los valores medidos de δ. En este sentido el ion níquel y el ion cobalto se comportan frente al fitato de forma similar, no detectándose la presencia de complejos polimetálicos con el aumento en la concentración de metal. Este aspecto difiere del comportamiento que presenta el ion cinc. Para este último, en condiciones de baja concentración de ion metálico (relación 2:1 ligando:metal) existen especies de estequiometria 2:1 y 3:1 metal:ligando que explican el entrecruzamiento de señales en las corridas de metal variable.

Finalmente, queda por establecer cuál es la conducta del fitato en presencia de exceso de ion metálico. De la misma manera que con el ion cobalto, el aumento de la concentración de ion metálico por encima de relaciones molares ligando:metal 1:1 motiva la precipitación de la fase sólida correspondiente. Es por esto que el análisis hasta el momento sea mantenido por debajo de este punto, de forma de asegurar que todas las especies del sistema se encuentran en solución. En la figura 7.29 se muestran juntos los espectros del filtrado de una suspensión de fitato de níquel y el correspondiente al último punto tomado en la corrida de pH variable (pH = 12,52, figura 7.24A).

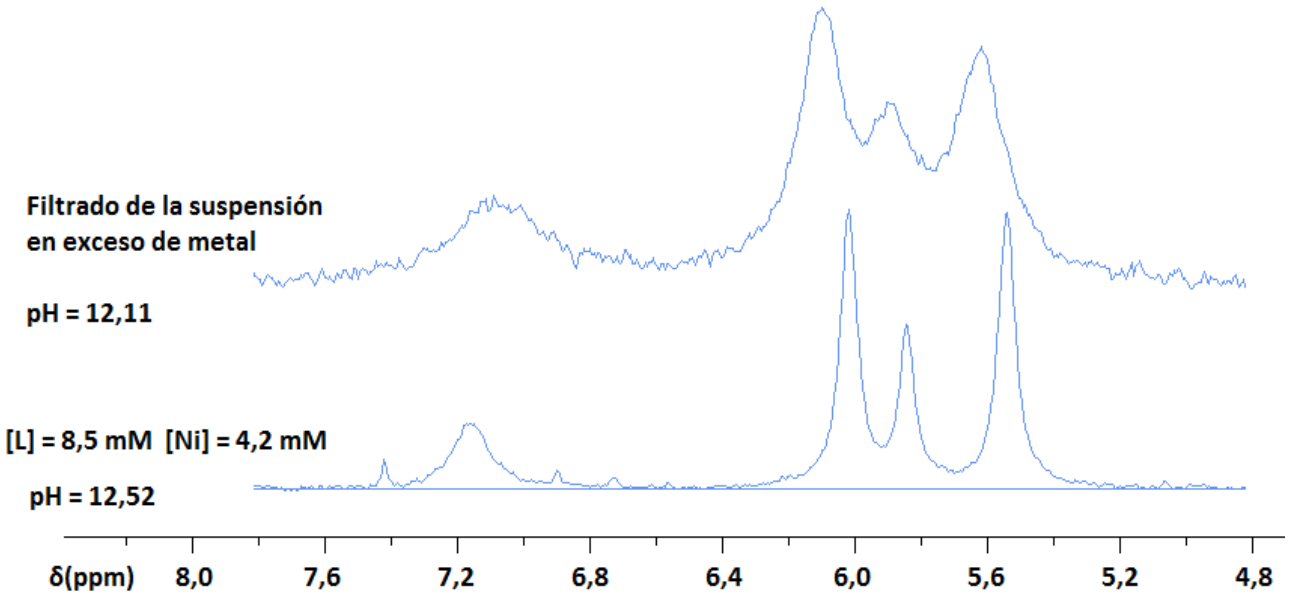


Figura 7.29. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Ni^{2+} de una solución 2:1 fitato-níquel y del filtrado de una suspensión de fitato de níquel (en medio básico, NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Las señales poseen desplazamientos químicos similares e integran en ambos casos en un patrón 1:2:1:2. No se detecta en este sistema la formación de ninguna especie más allá de los complejos de estequiometria 1:1 metal:ligando, en concordancia con lo discutido en el párrafo anterior y con los resultados derivados de las medidas potenciométricas. En conclusión, es probable que, al igual que se propuso en presencia de cobalto, en condiciones de leve exceso de ion metálico la formación y el incremento de la concentración de las especies 1:1 den lugar, por interacción y agregado, a la formación del fitato de níquel.

3.6. Sistema InsP_6-Cu^{2+}

La figura 7.30A muestra los espectros UV-visible, en función del pH, para una solución 10,1 mM de fitato y 2,58 mM de cobre, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Se detecta en este sistema cierto ruido espectral, debido a que las absorbancias obtenidas son pequeñas en todos los casos. Este fenómeno deriva de los bajos valores de concentración de las especies complejas, limitadas por la concentración total de cobre utilizada.

Los espectros visibles registrados para este sistema (figura 7.30A) condicen con un entorno octaédrico distorsionado tetragonalmente, similar al encontrado para el complejo hexaacuo [15]. En particular, el perfil obtenido consta de una banda ancha a partir de 600 nm, la que se extiende por encima del máximo del rango de medida (900 nm). La longitud de onda asociada a la diferencia de energía entre los niveles t_{2g}-e_g en complejos octaédricos regulares de cobre ronda los 769 – 555 nm, menor al máximo de la banda en los espectros medidos en presencia de fitato 725 – 800 nm. Este fenómeno es indicativo de una distorsión tetragonal en el entorno del ion metálico, con dos posiciones axiales más largas que el resto. Un aspecto interesante, que no había surgido en los sistemas fitato-Co^{2+}/Ni^{2+}, es que la absorbancia de los primeros espectros, registrados en el rango de pH 1,5 – 7,0, aumenta de forma sustancial, lo cual sugiere un cambio importante del entorno de coordinación del ion cobre debido a la coordinación al ligando. Según el diagrama de especies derivado de los resultados potenciométricos (figura 7.31), en este rango la especie predominante es el complejo neutro $[Cu_5(H_2L)]$.

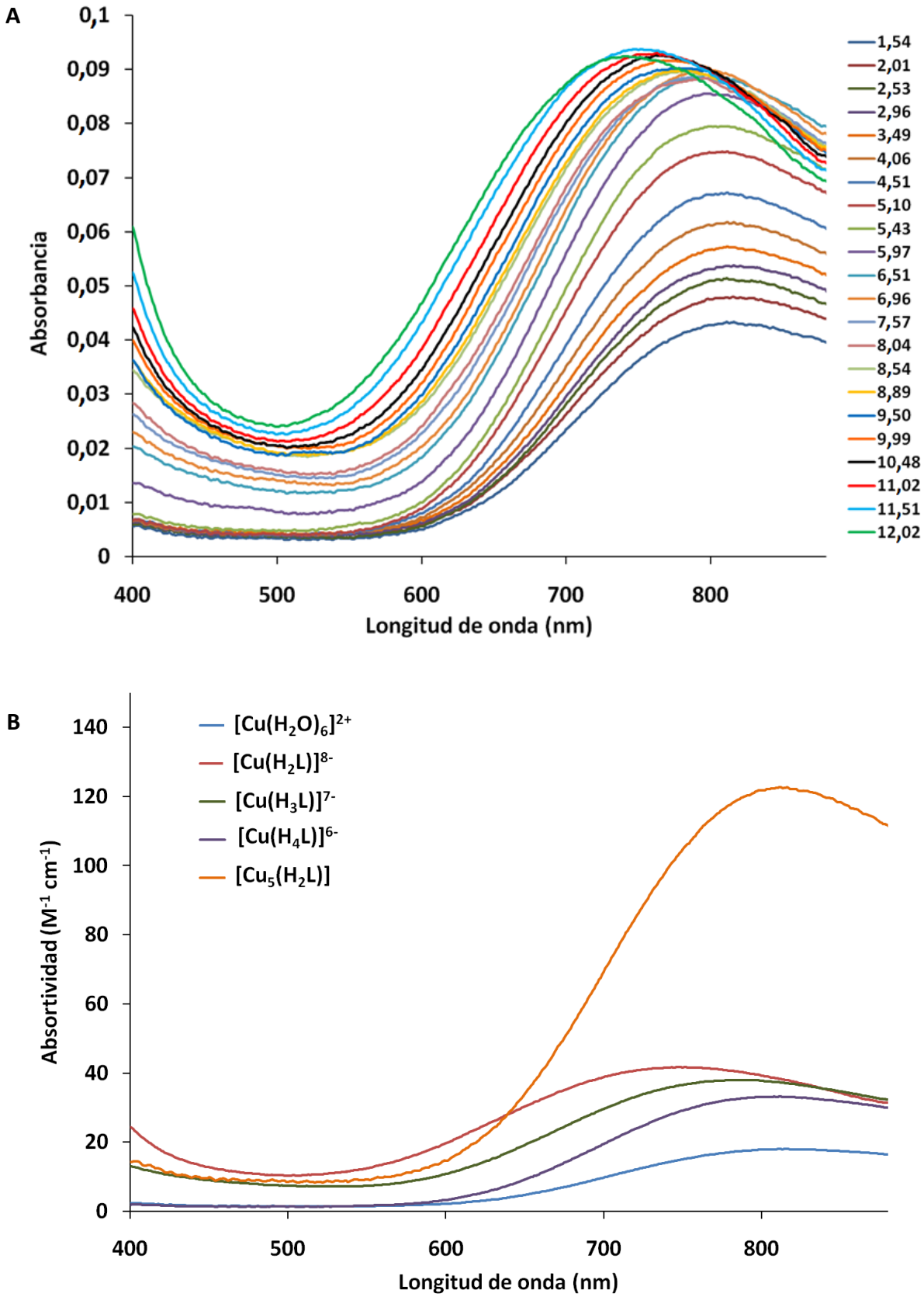


Figura 7.30. (A) Espectros UV-visible para el sistema InsP_6-Cu^{2+} en función del pH ([L] = 10,1 mM, [Cu^{2+}] = 2,58 mM), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Se detallan a la derecha los valores de pH ajustados en cada caso. (B) Espectros UV-visible individuales de las especies.

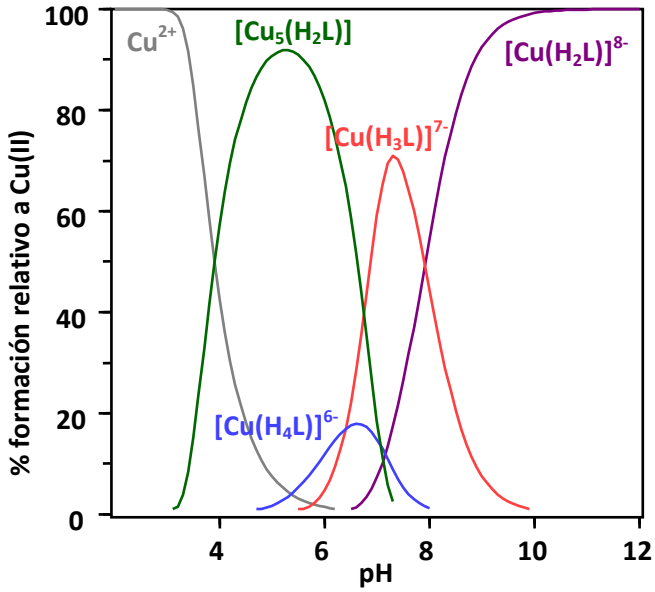


Figura 7.31. Diagrama de distribución de especies relativo a metal para el sistema InsP_6-Cu^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 10,1 mM, [Cu^{2+}] = 2,58 mM).

A partir de este punto, las absorbancias se mantienen aproximadamente constantes, pero ahora disminuye la longitud de onda del máximo de la banda. Parece posible, por tanto, que la naturaleza de la interacción fitato-cobre cambie, para dar especies estructuralmente diferentes, predominantes en el rango de pH 7 – 12. En total concordancia, estas corresponden, según la figura 7.31, a los complejos 1:1 fitato-cobre.

El ajuste de los espectros en función del pH da lugar al modelo de especies resumido en la tabla 7.1. Sus espectros individuales, mostrados en la figura 7.30B, son compatibles con complejos octaédricos, donde el entorno de coordinación sufre cierta distorsión tetragonal. Como era de esperar, el espectro del complejo pentametálico es bastante distinto a los correspondientes a las especies 1:1. El cambio en la estequiometria conlleva, aparentemente, un cambio no menor en el entorno del ion cobre. Es de destacar que estos resultados brindan una prueba experimental adicional sobre una diferencia importante en el patrón de reactividad química del fitato frente a los iones Co^{2+}, Ni^{2+} y Cu^{2+}. Para los dos primeros no se detecta la presencia de ninguna especie polimetálica, tanto en los experimentos espectroscópicos (UV-visible y RMN) como potenciométricos. Sin embargo, para el Cu^{2+} por espectroscopía visible sí se determina la presencia de un complejo neutro de

estequiometria 5:1 en presencia del ion cobre, en línea con los resultados potenciométricos.

Por último, un análisis más detallado de la figura 7.30B muestra dos aspectos estructurales interesantes relacionados con el grado de protonación de los grupos fosfato en los complejos. Primeramente, la protonación del ligando provoca una leve disminución en la intensidad de la interacción metal ligando, haciendo que los espectros de las especies de estequiometría 1:1 se acerquen al del ion $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$. Este efecto surgía también de los resultados espectroscópicos del sistema con Ni^{2+}, y es compatible con una disminución en la atracción electrostática metal-fitato causada por la reducción en la carga de las especies correspondientes del ligando. En segundo lugar, la deprotonación de los grupos fosfato provoca un movimiento del máximo de la banda hacia menores longitudes de onda. Esto ha sido asociado con un aumento en la diferencia energética de los niveles dx^2-y^2 y dz^2, causada por un incremento en la distorsión tetragonal del entorno metálico [15]. Una posibilidad es que las posiciones de coordinación ecuatoriales del cobre estén, en los complejos más cargados, ocupadas en su mayoría por los grupos fosfato del ligando, mientras que las posiciones axiales, más largas, contengan aguas de coordinación. De esta manera, la deprotonación del fitato provocaría un acercamiento al centro metálico de los átomos de oxígeno donores en posición ecuatorial, motivando un aumento progresivo de los enlaces axiales Cu^{2+}-H_2O.

3.7. Sistema InsP_6-Fe^{3+}

El estudio del comportamiento de este sistema en función del pH a través de espectroscopía de RMN de ^{31}P arroja los resultados que se detallan en la figura 7.32A. Un análisis general evidencia que las señales se mantienen resueltas en el rango básico y neutro, hasta pH entre 5 y 6. Hacia medio ácido, sin embargo, las mismas se ensanchan hasta fundirse unas con otras, a medida que aumenta progresivamente el ruido espectral. Este fenómeno imposibilita la asignación de las señales mediante la comparación con el ligando en medio ácido y posterior seguimiento de las mismas al aumentar el pH. Por lo tanto, como estrategia alternativa, el esquema de asignación se realiza por comparación con el ligando desde medio básico, registrando el desplazamiento químico de las señales a medida que disminuye el pH.

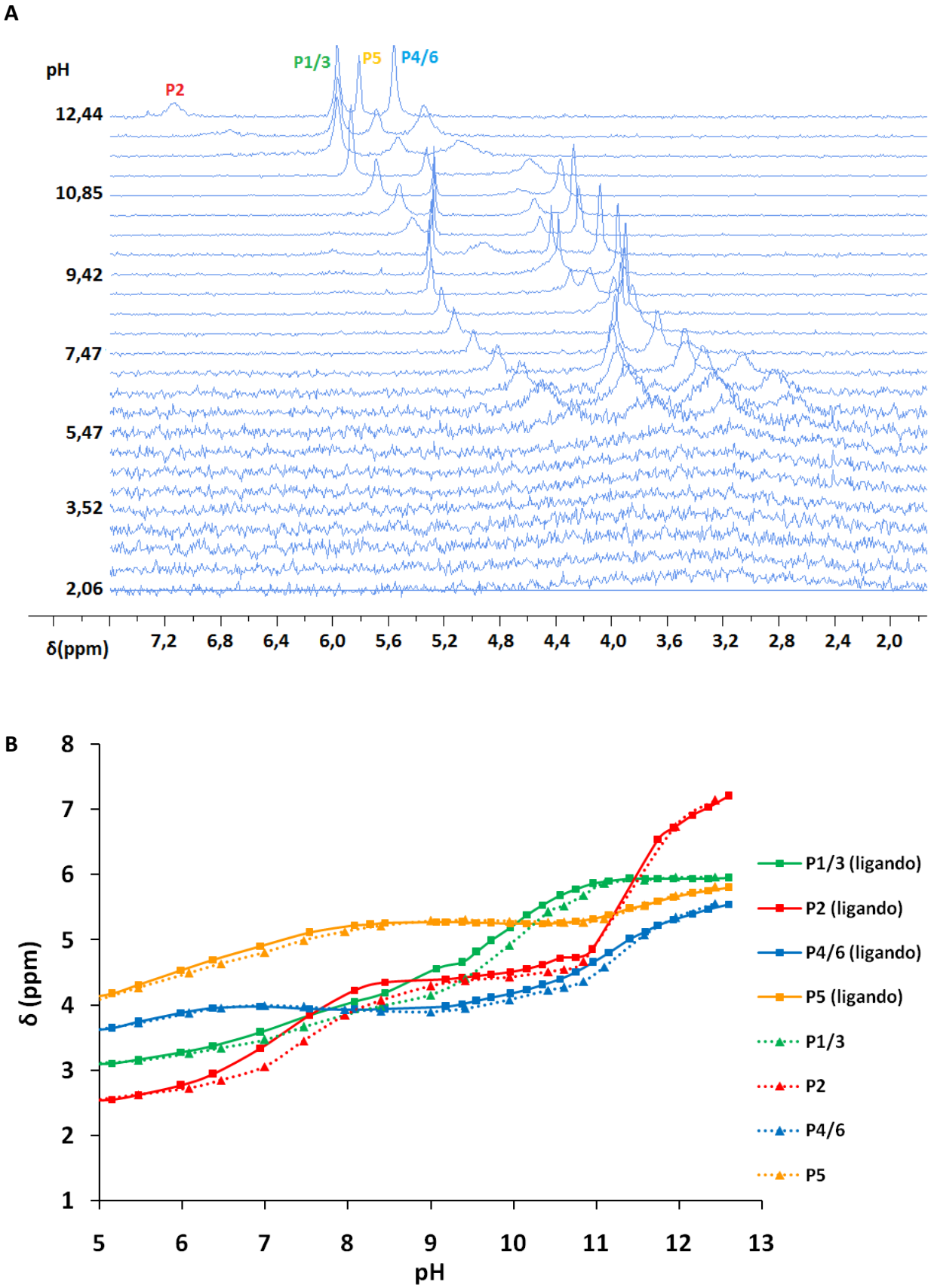


Figura 7.32. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Fe^{3+} en función del pH a 37,0 ˚C e I = 0,15 M ([L] = 2,10 mM, [Fe^{3+}] = 0,96 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH para el sistema InsP_6-H^+ (líneas continuas) e InsP_6-Fe^{3+} (líneas discontinuas).

A partir de la identificación de las señales, en la figura 7.32B se muestran superpuestas las curvas de δ en función del pH para el fitato en presencia y ausencia de hierro. Las curvas se separan entre sí en el rango de pH comprendido entre 5,0 y 11,5, lo que permite el estudio de los complejos formados. A pH por debajo de dicho intervalo se hace impracticable cualquier asignación. Por encima, las señales coinciden y se observa que la solución se torna de color amarrillo intenso. Parece razonable proponer, dadas las características del metal en consideración y los resultados espectroscópicos presentados en el capítulo 5, el establecimiento de procesos de hidrólisis que operen en el rango básico, disminuyendo por encima de pH = 11,5 la capacidad secuestrante del ligando. Verificando esta afirmación, en la figura 7.33 se detallan los espectros de RMN de ^{31}P en función de la concentración de hierro, a pH = 12,4.

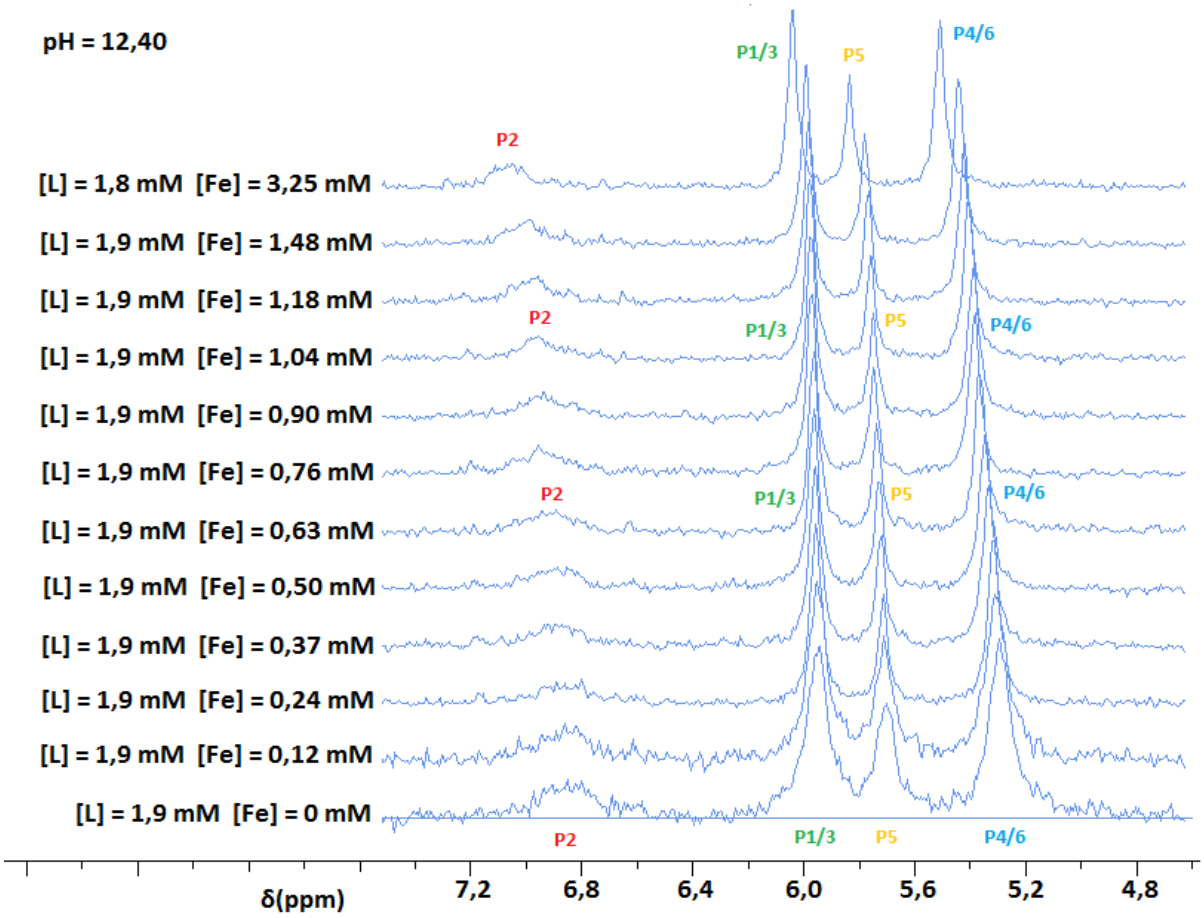


Figura 7.33. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema InsP_6-Fe^{3+} en función de la concentración de metal y ligando, a pH = 12,4, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Las señales se desplazan en conjunto levemente hacia campos bajos, acompañando el pequeño cambio que sufre el sistema por el agregado de metal y base. Dado que el ancho de las señales no se ve afectado, es factible que el mecanismo de relajación de esfera externa esté disminuido en estas condiciones, posiblemente porque el metal está rodeado de iones OH^-, dando hidroxoaniones que por su carga negativa se repelen con las especies aniónicas del ligando libre. Asimismo, no ocurre movimiento relativo de las bandas, que genere el entrecruzamiento característico de los procesos de coordinación metálica. En suma, en medio básico por encima de pH = 11,5, el metal quedaría involucrado en su totalidad en procesos de hidrólisis complejos, donde se formarán especies neutras y aniónicas hidroxiladas de hierro, mientras que el ligando sería liberado al medio.

Con la información recabada hasta aquí se realiza el ajuste del comportamiento de las señales en función del pH. Los resultados del mismo se resumen en la tabla 7.9. El modelo general de especies muestra 5 complejos fitato-hierro(III) de estequiometria 1:1 (metal:ligando) en diverso grado de protonación.

Tabla 7.9. Logaritmo de las constantes globales de formación ajustadas para el sistema InsP_6-Fe^{3+} en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Metal	Equilibrio	log *K*	σ
Fe(III)	$Fe^{3+} + HL^{11-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{8-}$	23,1(1)	0,027
	$Fe^{3+} + H_2L^{10-} \leftrightarrow [Fe(H_2L)]^{7-}$	22,4(1)	
	$Fe^{3+} + H_3L^{9-} \leftrightarrow [Fe(H_3L)]^{6-}$	20,9(2)	
	$Fe^{3+} + H_4L^{8-} \leftrightarrow [Fe(H_4L)]^{5-}$	19,9(2)	
	$Fe^{3+} + H_5L^{7-} \leftrightarrow [Fe(H_5L)]^{4-}$	18,8(2)	

El conjunto de constantes obtenidas describen satisfactoriamente el movimiento de las señales con el pH. En las condiciones aplicadas, el ajuste del modelo a los valores experimentales da residuales bastante pequeños (figura 7.34A). La figura 7.35 muestra el diagrama de distribución de especies teniendo en cuenta los datos de la tabla 7.9. Los complejos detectados se suceden desde pH = 5 a pH = 11,5, de acuerdo con el apartamiento de las señales del ligando en presencia del metal (figura 7.32B).

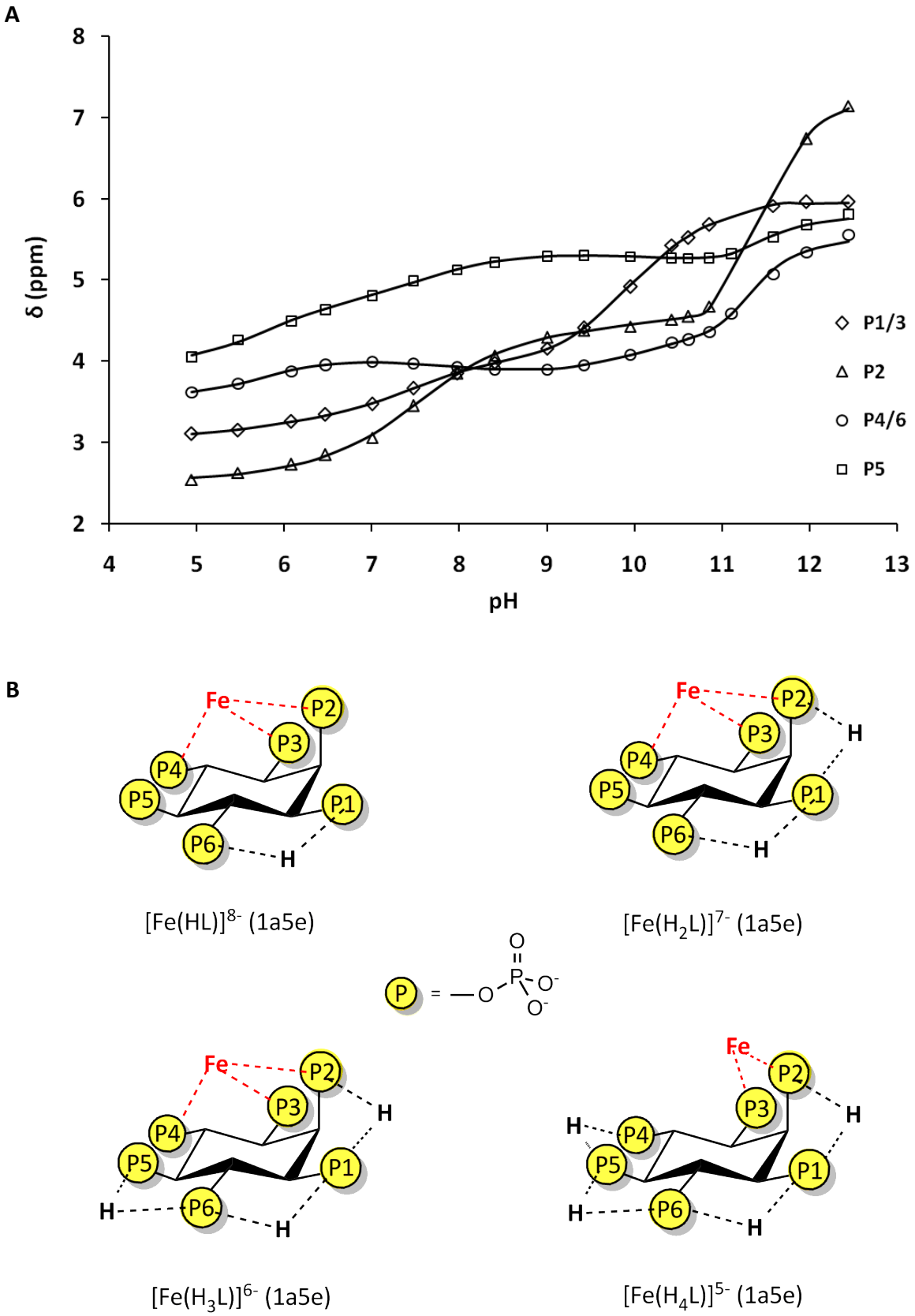


Figura 7.34. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema InsP_6-Fe^{3+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Fe^{3+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

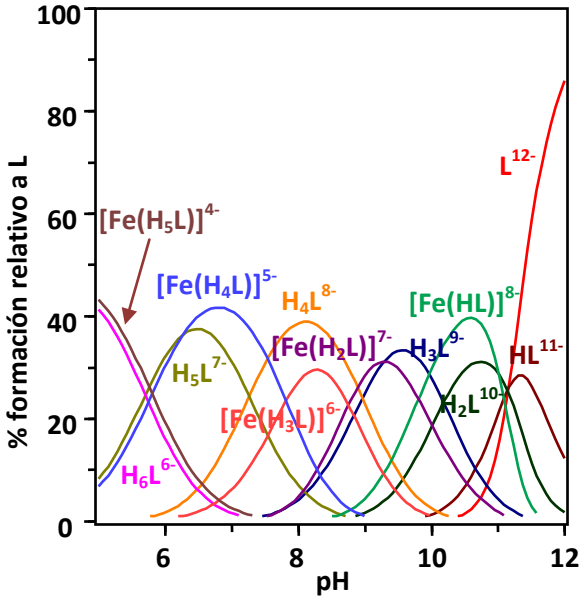


Figura 7.35. Diagrama de distribución de especies para el sistema InsP_6-Fe^{3+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 2,0 mM, [Fe^{3+}] = 1,0 mM).

A partir de los datos de RMN y su ajuste es posible sacar algunas conclusiones generales sobre las características estructurales básicas de algunas de las especies complejas del sistema. Como indica la figura 7.32B, las curvas que se ven más afectadas en presencia del metal dan cuenta de aquellos grupos fosfatos más involucrados en la coordinación metálica, los que parecen ser P2 y P1/3, y en cierta medida P4/6. Esto se encuentra de acuerdo con lo discutido por Sala et al. a través de la variación en los tiempos de relajación de los grupos fosfato [9]. En contraposición a lo observado para el resto de los sistemas estudiados, no se registra ruido espectral sustancial que pueda relacionarse con algún cambio conformacional en el rango de pH de existencia de las especies complejas (figura 7.32A).

Este fenómeno podría implicar que todos los complejos 1:1 fitato-hierro comparten una misma conformación, 1a5e, la cual se mantendría hasta pH = 11, donde los espectros comienzan a mostrar características del cambio conformacional por la transición hacia las especies HL^{11-} y L^{12-}. De todas formas, la especie $[Fe(HL)]^{8-}$ predomina en el límite del rango analizado, por lo que no debe ser descartada la posibilidad de que exista en el mismo estado conformacional que la especie del ligando de la cual deriva, 5a1e.

Los desplazamientos químicos para cada especie y su variación con los procesos de protonación y complejación se detallan en la tabla 7.10. La formación del primer complejo detectado desde medio básico, $[Fe(HL)]^{8-}$, se asocia con un $\Delta\delta_{comp}$ positivo para P2, lo que estaría indicando un desplazamiento completo del protón que se encontraba sobre él hacia un sitio bien alejado sobre el ligando (la microespecie mayoritaria del ligando con n = 1 es HL^{11-}(2)). Dado que este indicador es negativo para P1/3 y P4/6, es posible, suponiendo una conformación 1a5e, que el metal se ubique entre P2 y P1/3, con cierta participación de P4/6, y el protón sobre P2 se desplace hacia el espacio entre los grupos fosfato P1/3 y P4/6 no involucrados en la coordinación (figura 7.34B). No obstante, si la conformación a considerar es 5a1e, los valores obtenidos son coherentes con la asociación del Fe^{3+} a la caja preformada P1-P2-P3, mientras que P4 y P6 comparte el único protón. En todo caso, P5 parece sólo afectarse en parte por la presencia a distancia del catión metálico.

Tabla 7.10. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ (a partir de la especie del ligando correspondiente) para el sistema InsP_6-Fe^{3+} (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Fe(HL)]^{8-}$	5,610	4,391	4,103	5,251
$[Fe(H_2L)]^{7-}$	3,385	4,353	3,766	5,426
$[Fe(H_3L)]^{6-}$	4,005	3,904	3,890	5,234
$[Fe(H_4L)]^{5-}$	3,253	2,610	4,034	4,658
$[Fe(H_5L)]^{4-}$	3,097	2,577	3,564	3,912
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Fe(HL)]^{8-}$	---	---	---	---
$[Fe(H_2L)]^{7-}$	-2,225	-0,038	-0,336	0,175
$[Fe(H_3L)]^{6-}$	0,620	-0,449	0,123	-0,192
$[Fe(H_4L)]^{5-}$	-0,752	-1,294	0,145	-0,576
$[Fe(H_5L)]^{4-}$	-0,156	-0,034	-0,471	-0,746
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)			
Especies	P1/3	P2	P4/6	P5
$[Fe(HL)]^{8-}$	-0,256	0,781	-0,237	0,224

$[Fe(H_2L)]^{7-}$	-2,642	-0,532	-0,785	0,128
$[Fe(H_3L)]^{6-}$	-0,738	-0,459	-0,078	-0,014
$[Fe(H_4L)]^{5-}$	-0,821	-1,784	0,127	-0,636
$[Fe(H_5L)]^{4-}$	-0,260	-0,257	-0,492	-0,850

El proceso $[Fe(HL)]^{8-} \rightarrow [Fe(H_2L)]^{7-}$ conlleva un valor muy negativo de $\Delta\delta_{prot}$ para P1/3, por lo que es esperable que sea éste el grupo que se protone. Suponiendo una conformación 1a5e, el metal se ubicaría entre P2, P1 y P6, mientras que P3 compartiría entonces ambos protones con P2 y P4, cuyos $\Delta\delta_{prot}$ son también menores a cero (figura 7.34B). De acuerdo con esto, los fosfatos más afectados por la complejación del hierro por parte de la especie H_2L^{10-} son aquellos asociados al ion metálico y los protones: P2, P1/3 y P4/6. De hecho, el valor muy negativo asociado a P1/3 encuentra una explicación razonable en el hecho de que en las dos microespecies mayoritarias del ligando con n = 2 ni P1 ni P3 se encuentran protonados (H_2L^{10-}(25) y H_2L^{10-}(46)), mientras que en el complejo $[Fe(H_2L)]^{7-}$ ambos se unen al Fe^{3+} y comparten dos protones con grupos adyacentes. P5, sin embargo, parece seguir recibiendo los efectos de desblindaje a larga distancia.

De la misma forma que en la especie anterior, los valores de $\Delta\delta_{comp}$ marcan que para la especie $[Fe(H_3L)]^{6-}$ el hierro continuaría asociado a P2, P1 y P6 (figura 7.34B). Es interesante notar que la complejación afecta mayoritariamente a P1/3, el que se encontraba deprotonado en la microespecie mayoritaria H_3L^{9-} (246). Más aún, en este último microestado, P4 y P6 se encontraban ambos protonados, y el ingreso del hierro desplazaría uno de los protones de P4/6, haciendo que los efectos del campo se neutralicen en parte. En efecto, este fenómeno daría cuenta del pequeño valor de $\Delta\delta_{comp}$ para estos grupos. El protón que ingresa en el proceso $[Fe(H_2L)]^{7-} \rightarrow [Fe(H_3L)]^{6-}$ se asociaría a P2, según el valor negativo del $\Delta\delta_{prot}$ correspondiente. Esto generaría un rearreglo de los protones existentes, de forma que ahora se compartirían los tres protones entre P2-P3, P3-P4 y P4-P5. De esta manera, P5 posee ahora un $\Delta\delta_{prot} < 0$, debido a que se encontraría asociado a un protón que compartiría con P4.

Finalmente, el cuarto protón debería llenar el hueco libre entre los fosfatos P5 y P6 (figura 7.34B). En línea con esto, el $\Delta\delta_{prot}$ es negativo para P5. Sin embargo, P6 se ve poco afectado, lo que podría implicar tanto que la

compartición del protón entrante sea relativamente dificultosa por los requerimientos espaciales debidos a la coordinación P6-Fe^{3+} o que el H^+ que ingresa cause una disminución en la participación de P6 en el enlace metal-ligando. P1/3 y P2 sí se ven alterados en el proceso de protonación de $[Fe(H_3L)]^{6-}$, lo cual sería consistente con un rearreglo de los protones y el catión metálico sobre el ligando. Los datos de $\Delta\delta_{comp}$ apuntan a P2 y P1/3 como los fosfatos más afectados, por lo que el ion metálico seguiría asociado a estos grupos. No obstante, P4/6 posee un valor de $\Delta\delta_{comp} > 0$, lo que en parte podría explicarse por un desplazamiento de protones desde la microespecie predominante (H_4L^{8-}(1346)) y/o un rol menos importante en la unión fitato-metal. $\Delta\delta_{comp}$ para P5 es menor que cero, ya que la formación de $[Fe(H_4L)]^{5-}$ involucra su protonación desde las dos microespecies predominantes con n = 4 (H_4L^{8-}(1346) y H_4L^{8-}(1234/1236)). Un análisis similar para $[Fe(H_5L)]^{4-}$ se vuelve muy complejo; a partir de $[Fe(H_4L)]^{5-}$ el protón que ingresa lo hace sobre algún grupo ionizable ya protonado o unido al metal, generando rearreglos internos de las cargas positivas sobre los grupos negativos del ligando que afectan a todas las señales.

Para completar el análisis del comportamiento químico del fitato en presencia de hierro(III) es necesario el estudio de la formación de complejos polinucleares en condiciones de exceso de ion metálico. Siguiendo los resultados potenciométricos, las características de la especiación química de este sistema marcan la formación de un complejo neutro de estequiometria $[Fe_4L]$, similar a la de la fase sólida (ver capítulo siguiente), que se establece en condiciones de exceso de metal. Según los datos potenciométricos, esta especie tiene existencia en el rango ácido, formándose por debajo de pH = 6, donde, por comparación con la figura 7.32A, comienza el ensanchamiento de las bandas y el aumento del ruido espectral. Este comportamiento es característico de la formación en el sistema de una especie paramagnética, que disminuya los tiempos de relajación de los complejos 1:1 predominantes [16].

Es bastante lógico proponer, entonces, la generación de la especie tetrametálica como responsable principal del ensanchamiento y colapso de las bandas en medio ácido. En línea con esto, en la figura 7.36A se resumen los resultados de la medida de espectros de RMN de ^{31}P en medio ácido (pH = 1,8, constante) y concentración variable de hierro.

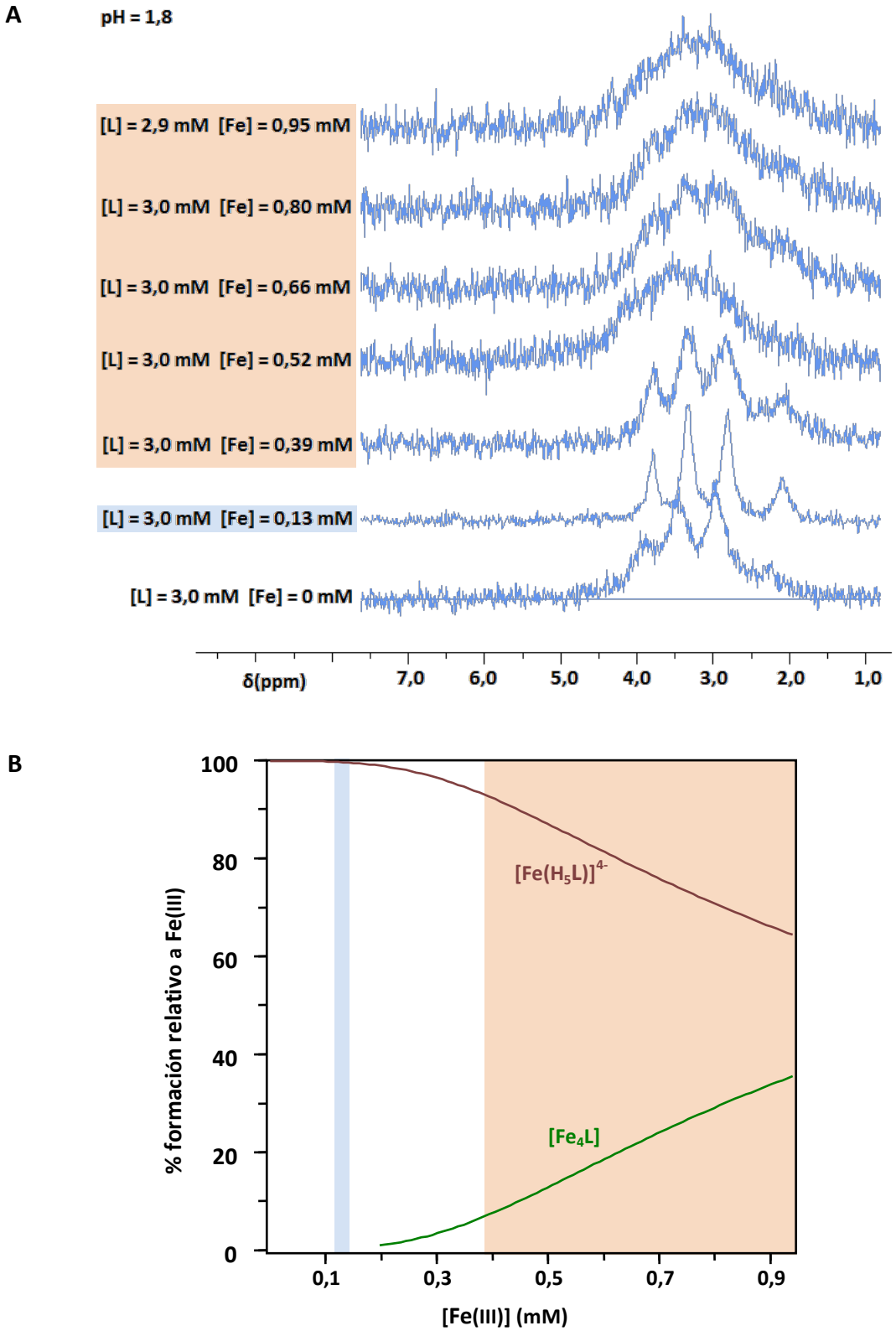


Figura 7.36. Comportamiento del sistema InsP_6-Fe^{3+} en función de la concentración de metal, a pH = 1,8, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (A) Espectros de RMN de ^{31}P, (B) Distribución de especies correspondiente a partir del modelo potenciométrico. Se resaltan las zonas de predominancia del complejo 1:1 (celeste) y la aparición de la especie tetrametálica (rosado).

Para pequeñas relaciones metal:ligando, el agregado de Fe^{3+} mejora la resolución de las señales y disminuye el ruido, por formación del complejo $[Fe(H_5L)]^{4-}$ (ver zona celeste en la figuras 7.36A y B). Sin embargo, por encima de cierto punto, marcado en rosado en la figura 7.36, el aumento en la concentración de metal causa el efecto contrario, y las bandas se funden en una sola bastante ancha. Este proceso corresponde, según el diagrama de distribución de especies asociado, a la formación del complejo polinuclear, el cual distorsiona las señales mediante la aceleración de los procesos de relajación de los átomos de fósforo de los grupos ionizables.

Es interesante analizar el comportamiento singular de este sistema en cuanto a los efectos paramagnéticos del hierro(III) sobre los espectros del ligando. Según la bibliografía especializada[16], la técnica de RMN en presencia de iones paramagnéticos se aplica de forma fructífera, en general, a sistemas en donde el tiempo de correlación es bastante bajo. Éste parámetro se encuentra relacionado con tres procesos que motivan la relajación nuclear: la relajación electrónica, la rotación molecular y el intercambio químico del centro paramagnético con el ligando de interés. En nuestro sistema, considerando las geometrías relativamente rígidas de las especies complejas, dadas por el mecanismo cooperativo de coordinación de varios fosfatos con el Fe(III), así como la alta hidratación debida a la gran carga negativa que poseen, es poco probable que el término debido a la rotación molecular, que en general es pequeño [16], tenga relevancia. Por otra parte, es razonable pensar en que el intercambio del ion metálico con la solución es mínimo, ya que no se detecta ion metálico libre en las condiciones de los experimentos. Es factible, por ende, que el tiempo de correlación esté determinado principalmente por la relajación electrónica debida al ion metálico.

Dada la estructura de los grupos donores del fitato (grupos con átomos de oxígeno cargados negativamente), es razonable considerar que el desdoblamiento del campo cristalino es suficientemente bajo como para que se favorezca el estado de alto espín [14]. El ion Fe^{3+} de alto espín posee un electrón desapareado en cada uno de los cinco orbitales d, por lo que cada uno contribuye a la densidad de espín total. El estado fundamental es un sextuplete (S = 5/2), asociado a un término electrónico no degenerado. No existen estados excitados con la misma multiplicidad de espín y de energía cercana al basal, por

lo que los procesos de relajación electrónica de tipo Orbach están disminuidos. En este sistema, el principal mecanismo para la relajación de los espines se restringe al desdoblamiento a campo cero (*ZFS*, por sus siglas en inglés) del estado basal por acoplamiento espín-órbita con un estado cuarteto excitado, y la modulación del mismo mediante la deformación del poliedro de coordinación por choque con las moléculas circundantes [16]. Cuanto mayor son estos efectos, mayor es la velocidad de relajación electrónica y menores son los efectos paramagnéticos sobre las señales en el RMN. Bajo estas circunstancias, las expectativas de la aplicación de la técnica de RMN, sobre todo en el modo alta resolución, a sistemas conteniendo hierro(III) de alto espín son bajas, excepto en los casos donde el efecto de ZFS y su modulación no son nada despreciables.

De vuelta en el sistema fitato-hierro(III), como se mencionó anteriormente, las señales se resuelven bien en el rango de pH donde los complejos 1:1 son predominantes. De hecho, como se discutió para la figura 7.36, la formación de la especie $[Fe(H_5L)]^{4-}$ genera un aumento en la resolución de las bandas del ligando. Deben existir, por tanto, ciertas características estructurales en estas especies que permiten que los efectos del paramagnetismo del hierro no afecten a la relajación de los átomos de fósforo. Es probable que los complejos formados retengan al hierro de forma que éste no esté apartándose y uniéndose al ligando, lo que aceleraría la relajación nuclear por cambio en la energía de interacción electrón-núcleo. Esto está de acuerdo con las altas constantes de formación ajustadas. Asimismo, el ion metálico debe sufrir, según lo discutido arriba, desdoblamiento a campo cero, el cual debe variar de forma sustancial, acelerando la relajación electrónica. Esto podría implicar que el poliedro de coordinación sea relativamente fluxional, variando su geometría de acuerdo a los movimientos y choques aleatorios dados por la dinámica de la solución. Al margen de toda esta evidencia, no deben descartarse otros factores que puedan mejorar los procesos de relajación del sistema de espines, como la deslocalización de los electrones desapareados del hierro hacia los grupos ionizables del ligando. La especie tetrametálica, $[Fe_4L]$, se comporta de forma inversa, provocando la relajación casi instantánea de los núcleos de ^{31}P y el aumento dramático del ancho de la señales. En este caso los efectos paramagnéticos son, seguramente, muy grandes, dado que la velocidad de relajación nuclear es proporcional a *S(S+1)*, que es sustancialmente mayor al

correspondiente a los complejos 1:1, por contar con 4 centros paramagnéticos por molécula de fitato.

4. Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados del análisis químico-estructural en solución de los sistemas fitato-M(II)/M(III), en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura. Para todos los sistemas, los espectros de RMN de ^{31}P muestran la presencia de cuatro señales bien resueltas en medio ácido, correspondientes a los cuatro grupos fosfato simétricamente equivalentes: P5, P4/6, P1/3 y P2. Las mismas se desplazan a campos mayores con la protonación de las especies y, a diferencia de lo observado para los iones alcalinos, las curvas de δ = f(pH) varían tanto por encima como por debajo de las del ligando. Esto denota una interacción metal-ligando más intensa, que provoca un desplazamiento significativo de los protones. El ajuste matemático de este comportamiento arrojó como resultado las estequiometrías de las especies complejas y sus constantes de formación. Tanto en condiciones equimolares como de exceso de ligando, es posible el ajuste de un modelo teórico de especies que, en general para todos los sistemas, es similar al potenciométrico.

En presencia de un exceso de metal, el ion magnesio provoca la formación lenta de una especie de concentración pequeña pero detectable. Es probable que esta nueva especie sea la misma que aquella que coexiste con el sólido bajo condiciones de exceso del metal: [$Mg_5(H_2L)$]. Por el contrario, para el ion calcio no se detecta especie alguna en presencia del sólido, en total acuerdo con los datos potenciométricos. En este sistema, los valores de δ varían de forma compleja con el aumento de la concentración de metal en medio básico. El ajuste de este comportamiento requiere la inclusión de otras especies, cuyas estequiometrias van desde 2:1 hasta 4:1 metal:ligando. Este fenómeno se observa también para el ion cinc, en donde se predice la formación de complejos 2:1 y 3:1 metal-ligando. Ambas se concentran en solución hasta la precipitación de la fase sólida, cuya remoción anula las señales del RMN. Es posible que la solubilidad de fitato de cinc sólido sea tan baja que no se detecten especies coexistiendo con el mismo. Por otra parte, en exceso de cobalto o níquel, el fitato forma especies de estequiometría 1:1, y no se

detecta ninguna especie adicional en equilibrio con el sólido, en concordancia con los resultados derivados de las medidas potenciométricas.

Los valores de las constantes de equilibrio ajustadas permiten reproducir de forma satisfactoria la variación en el desplazamiento químico de las señales con el pH, y por tanto deconvolucionar cada espectro de RMN. Los desplazamientos químicos individuales y su variación con los procesos de protonación y complejación permitieron adquirir información estructural de las especies complejas solubles. En términos generales, la unión metal-ligando es de tipo cooperativa, entre al menos dos grupos fosfatos cercanos en el espacio, de acuerdo con el esquema de coordinación encontrado en algunos sistemas biológicos. La interacción con el confórmero 1a5e es preferencial a los grupos en C1, C2 y C6, en medio ácido a moderadamente básico, mientras que frente a la variante 5a1e, el metal se acerca por encima del anillo, e interacciona en cierto grado con los fosfatos P1/3, P2 y P5. En el caso de las especies polimetálicas detectadas para Ca^{2+} y Zn^{2+}, los primeros dos iones parecen situarse preferentemente por arriba de anillo de inositol, mientras que el tercero se ubicaría por debajo. Los valores de Δδ permitieron, asimismo, identificar la transición conformacional del ligando en presencia de los distintos iones metálicos, la cual se verifica por el ensanchamiento de las señales y el aumento del ruido espectral. En conclusión, este proceso opera, en general, entre los mismos estados de protonación del ligando que en ausencia del metal (HL^{11-} y H_2L^{10-}), por lo que el catión afecta el rango de pH de cambio conformacional mediante la variación en el rango de predominancia de los complejos en esos mismos estados de protonación.

La espectroscopía UV-visible ha resultado útil en especial para la derivación de aspectos estructurales complementarios a los anteriores. El ion cobalto experimenta un cambio en la geometría del entorno de coordinación, de octaédrica a tetraédrica, a pH entre 9 y 11, donde se observa además un aumento en el ancho de banda y ruido espectral en el RMN. Es posible, por tanto, que estos fenómenos estén interconectados y que tengan relación con un posible cambio conformacional del ligando en las especies complejas. En el caso del ion Ni^{2+}, se detecta en los espectros electrónicos visibles el establecimiento de un entorno octaédrico en todos los complejos. Es probable que la protonación de los grupos fosfato permita un aumento en la

participación de moléculas de agua de la solución, volviendo el entorno del ion níquel progresivamente más similar al que posee en el complejo hexaacuo. Por su parte, para el ion cobre la absorbancia registrada de los primeros espectros aumenta de forma sustancial con el pH, debido a la formación del complejo $[Cu_5(H_2L)]$. A partir de este punto, las absorbancias se mantienen aproximadamente constantes, con una disminución continua de la longitud de onda del máximo de la banda, lo que se asocia a la aparición de complejos del tipo 1:1. El perfil espectral es coherente con un entorno octaédrico distorsionado tetragonalmente, donde las posiciones ecuatoriales de coordinación del cobre estén, en los complejos más cargados, ocupadas en su mayoría por los grupos fosfato del ligando, mientras que las posiciones axiales, más largas, se ocupan con aguas de coordinación. A medida que los grupos ionizables se protonan, es posible que disminuya la fuerza de la interacción metal-ligando, y con ella la distorsión tetragonal asociada.

Finalmente, los efectos paramagnéticos del hierro(III) permitieron sacar conclusiones adicionales. Se verifica la formación del complejo $[Fe_4L]$, detectado potenciométricamente, en donde los átomos de hierro se encuentran bien separados en la estructura, lo que la convierte en una especie altamente paramagnética. Asimismo, es probable que los complejos 1:1 formados retengan al hierro de forma de que éste no esté apartándose y uniéndose al ligando, de acuerdo con la alta estabilidad determinada para estas especies. El poliedro de coordinación en estos casos parece ser relativamente fluxional, por lo que es esperable que el desdoblamiento a campo cero esté modulado de forma significativa por los choques en el seno de la solución.

5. Referencias bibliográficas

1. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *27*, 17-30.
2. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *28*, 39-55.
3. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *30*, 101-119.
4. Emsley, J.; Niazi, S. B. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements* **1981,** *10*, 401-407.
5. Champagne, E. T.; Fisher, M. S. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 217-223.
6. Champagne, E. T.; Fisher, M. S.; Hinojosa, O. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 199-215.
7. Bebot-Brigaud, A.; Dange, G.; Fauconnier, N.; Gérard, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999,** *75*, 71-78.
8. Egbewatt, A. N.; Dill, K. *Inorganica Chimica Acta* **1987,** *136*, L37-L39.
9. Sala, M.; Makuc, D.; Kolar, J.; Plavec, J.; Pihlar, B. *Carbohydrate Research* **2011,** *346*, 488-494.
10. Liu, X.; Millero, F. J. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1999,** *63*, 3487-3497.

11. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.
12. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
13. Byung-Chul, O.; Myung, H. K.; Won-Chan, C.; Sung-Chun, P.; Suk-Chul, B.; Tae-Kwan, O. *Biochemistry* **2006,** *45*, 9531-9539.
14. Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Química Inorgánica Avanzada;* Cuarta ed.; Editorial Limusa: México, 1990.
15. Lever, A. B. P. *Inorganic electronic spectroscopy;* second ed.; Elsevier Science Publishers: 1984.
16. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G. *Solution NMR of Paramagnetic Molecules. Applications to Metallobiomolecules and Models;* Primera ed.; Elsevier: Amsterdam, 2001; Vol. 2.

Capítulo 8

Estudios del InsP_6 al estado sólido

En este capítulo se presenta la caracterización química y estructural de los complejos sólidos del fitato presentes en condiciones de exceso de ion metálico. Se discuten, asimismo, los resultados del estudio químico de la composición de los sólidos mixtos con iones mono y divalentes, como modelos de fases sólidas de reserva análogas a las fitinas. Se procede, con esta información, a la determinación de la solubilidad de algunos de los complejos en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura. A partir de estos datos, más aquellos obtenidos para las especies solubles en los capítulos anteriores, se finaliza la exposición con una visión completa de la reactividad química del InsP_6 en presencia de iones multivalentes, considerando de forma explícita los procesos de precipitación operativos.

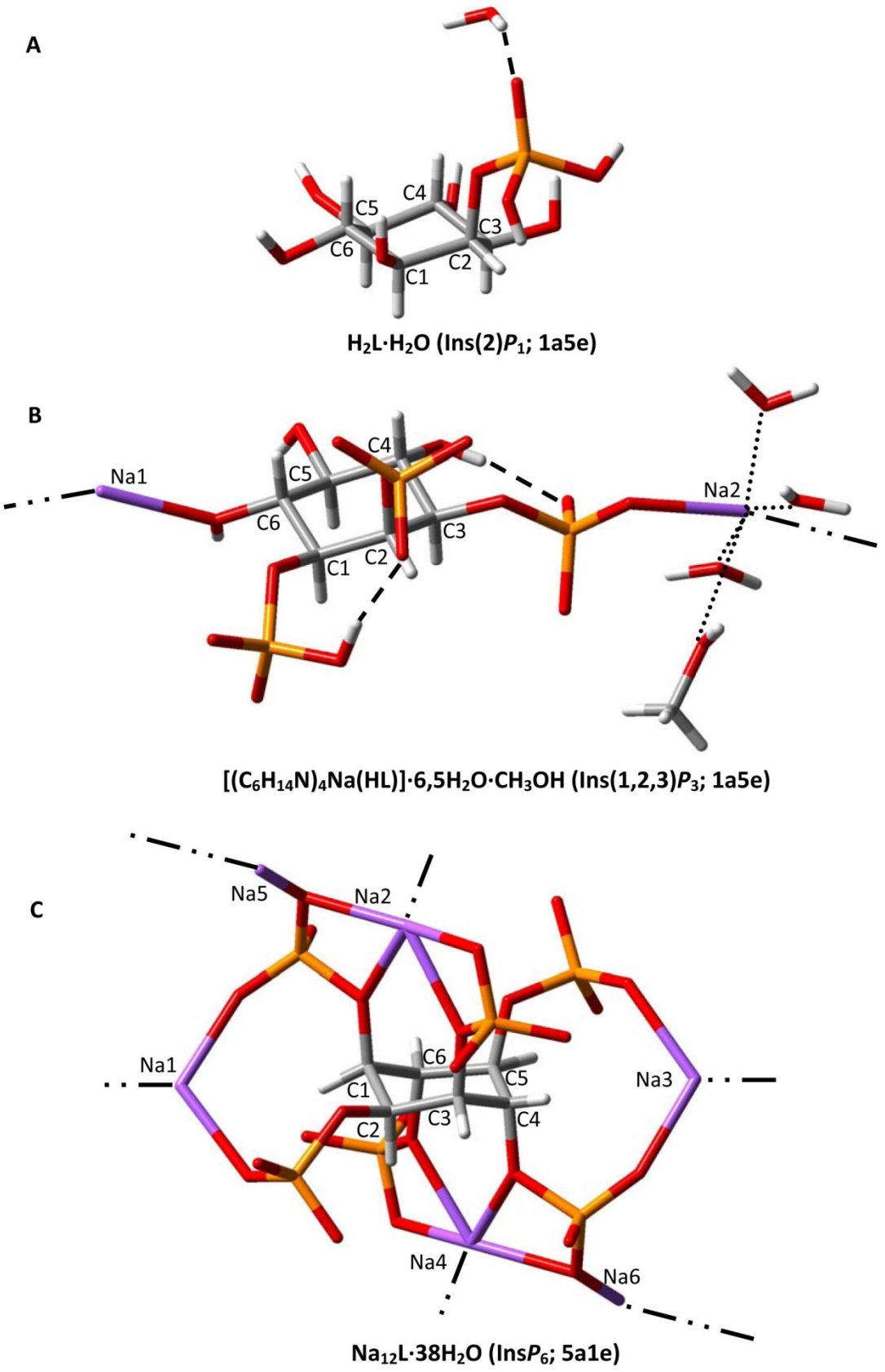
1. Introducción

En presencia de exceso de ligando, el patrón de reactividad química del fitato se ve caracterizado por la formación de complejos solubles, cuya naturaleza, estructura y predominancia relativa en un medio no interactuante fueron el tema central de análisis de algunos de los capítulos precedentes. Adicionalmente, a medida que se incrementa la relación metal:InsP_6 comienzan a operar procesos de precipitación dependientes del pH que afectan dramáticamente la distribución de los complejos solubles, mediante la captación, en una fase distinta a la del medio acuoso, del ligando y el catión metálico. De acuerdo con lo presentado en el capítulo 2, varios de los primeros reportes[1-10] han establecido que los procesos involucrados son bastante complejos, con relaciones estequiométricas de las fases sólidas dependientes en muchos casos del tiempo de precipitación[1] y fenómenos de cooperativismo y competencia entre los iones que coexisten en solución[3]. No en vano, una parte de los autores en el tema[11,12] asumen la generación de fases no

estequiométricas, en un intento por brindar una explicación a las grandes inconsistencias derivadas de los estudios fisicoquímicos.

Al margen de estos obstáculos, otros trabajos de investigación han logrado la caracterización química de algunos de los complejos metálicos sólidos, en especial con Ca^{2+} [13-16], el catión más estudiado en este sentido. En términos generales, las fases resultantes están presentes en un alto grado de hidratación, son extremadamente amorfas y difíciles de purificar por su baja solubilidad. Algunos investigadores[14,16] han coincidido en la formación de especies sólidas protonadas a bajos valores de pH, y se han llegado a reportar relaciones metal:ligando tan bajas como 1:1 con Mn(II), Co(II) y Ni(II) [17,18]. En medio básico y a altas relaciones metal:ligando se han sintetizado y caracterizado especies polinucleares del tipo $Ca_6L(s)$[16,19], $Mg_5H_2L\cdot 22H_2O(s)$ y $Ca_5H_2L\cdot 16H_2O(s)$[20,21], y $[Co(H_2L)]\cdot nH_2O(s)$, con n = 19 - 22 [22]. Otras características del medio en el que se realiza la síntesis, como el solvente o la presencia de otros iones, constituyen factores cruciales a la hora del establecimiento de la estequiometría de las fases sólidas. De esta manera, en agua:metanol 1:20 (v:v) se obtiene, en medio neutro, compuestos del tipo $Na_3M_5L(OH)\cdot 9H_2O(s)$ con M = Mn(II) y Zn(II)[23], mientras que la presencia de grandes cantidades de Cl^- motiva la formación de fases $[M_6(H_iL)Cl_i]\cdot nH_2O(s)$, con (*i*:*n*) = (4:2) para Mn(II), Co(II) y Ni(II), (2:2,5) para Cu(II), (2:1) para Zn(II) y (6:6) para Sn(II)[24]. Más aún, se han reportado compuestos del tipo $Ca_5M_2L\cdot xH_2O(s)$ con M = Na^+ o K^+ [16,25] y $Mg_5Na_2L(s)$[26], en presencia de exceso de ion alcalino en medio básico. Estos últimos difieren en su composición, sin embargo, con otros complejos mixtos sintetizados entre el fitato e iones alcalinos y alcalinotérreos, como el $Ca_2Na_8L\cdot 3H_2O(s)$[27].

Desde un punto de vista meramente estructural, de la inmensa variedad de compuestos del fitato y sus congéneres de menor grado de fosforilación, sólo existen tres estructuras cristalinas reportadas en la base de datos cristalográfica de Cambridge (figura 8.1). El inositol fosfato Ins(2)$P_1\cdot H_2O(s)$[28], que cristaliza en el grupo espacial $P2_1/c$, se encuentra completamente protonado y monohidratado. Cada celda unidad alberga cuatro moléculas de ligando, las cuales se empaquetan de forma de separar espacialmente sus grupos ionizables.



$H_2L{\cdot}H_2O$ (Ins(2)P_1; 1a5e)

$[(C_6H_{14}N)_4Na(HL)]{\cdot}6{,}5H_2O{\cdot}CH_3OH$ (Ins(1,2,3)P_3; 1a5e)

$Na_{12}L{\cdot}38H_2O$ (InsP_6; 5a1e)

Figura 8.1. Estructuras cristalinas reportadas para los inositol fosfatos. Se representan con líneas punteadas los enlaces metal-agua/metanol y con líneas discontinuas los enlaces de hidrógeno. Las líneas mixtas representan la continuidad de los enlaces en el cristal.

Por su parte, el miembro trisfosforilado Ins(1,2,3)P_3 forma un sólido cristalino en presencia de cationes sodio y ciclohexaamonio de fórmula $[(C_6H_{14}N)_4Na(HL)]\cdot 6{,}5H_2O\cdot CH_3OH(s)$[29]. La disposición espacial es tal que se forman cadenas alternadas de ligando e iones Na^+, cuya carga negativa es neutralizada por los cationes $(C_6H_{14}N)^+$. Finalmente, la sal dodecasódica ($Na_{12}L\cdot 38H_2O$) es la única del InsP_6 que ha logrado ser caracterizada en este sentido [30,31]. Como se observa en la figura 8.1C, el ligando se une directamente a seis iones alcalinos, mientras que comparte otros doce con moléculas de fitato vecinas. Estos ejemplos concuerdan con la asignación conformacional de los Ins*P* en solución, discutida en el capítulo 6 y reportada por primera vez por Barrientos y Murthy[32]. Aquellos miembros con menor grado de fosforilación dan prioridad a la conformación 1a5e, mientras que lo contrario ocurre para los InsP_5 e InsP_6 a altos valores de pH. Por lo demás, aún hoy en día poco se sabe de los parámetros estructurales de las fases sólidas de los inositol fosfatos.

Algunos reportes han profundizado en el tema intentando generar modelos estructurales a través de técnicas indirectas. Para el InsP_6, los resultados son variables. Rodrigues-Filho *et al*.[23] analizaron los compuestos $Na_3M_5L(OH)\cdot 9H_2O(s)$ con M = Mn(II) y Zn(II) y $Na_4MnZn_4L(NO_3)_2\cdot 8H_2O(s)$, a través de técnicas como RMN de ^{23}Na, ^{13}C y ^{31}P, EPR y XPS. La complejación de ambos iones de transición fue verificada experimentalmente, siendo la conformación del ligando 1a5e. Se detectaron en los complejos un único entorno para el ion cinc(II) y dos para el ion manganeso(II). Estas características permitieron la generación de un posible modelo estructural, consistente en la formación de cadenas que se interconectan entre sí para dar lugar a una red tridimensional. Por otra parte, Mali y sus colaboradores[33] reportaron el estudio estructural del complejo fitato-Fe(III) mediante EXAFS, XANES y RMN de ^{31}P. Los autores, basados en los resultados se inclinan por un modelo de enlace P-O-Fe de gran carácter covalente, en el cual el metal se ve rodeado octaédricamente por seis átomos de oxígeno. De esta manera, se generan conexiones del tipo -P-O-Fe-O-P-, en donde cada grupo fosfato se une a dos átomos de hierro y cada átomo de hierro se asocia a tres grupos fosfato, siendo compartido por dos moléculas de ligando. Este esquema de coordinación constituye el soporte del arreglo tridimensional de los componentes del sólido.

Por último, incluso considerando la gran importancia que estas fases sólidas tienen a nivel nutricional, tecnológico y ambiental[11,34-36], los procesos de precipitación involucrados han sido muy poco estudiados. Crea *et al*., trabajando en fuerza iónica cercana a cero y a 25 °C reportaron valores de logaritmo de constante de producto de solubilidad (log K_{ps}) de -58,3 y -75,7 para Ca_6L y Ca_5Na_2L respectivamente. Estos valores son bastante menores que aquellos obtenidos previamente en KCl 0,2 M a la misma temperatura para el complejo $Ca_5K_2L{\cdot}xH_2O$ (log K_{ps} = -22), y cercanos al reportado en el caso del sólido $Zn_4K_3(HL){\cdot}xH_2O$ (log K_{ps} = -60,4)[25,37]. Recientemente, las K_{ps} de los sólidos $Mg_5H_2L{\cdot}22H_2O$(s) y $Ca_5H_2L{\cdot}16H_2O$(s) han sido determinadas en medio similar al fisiológico, permitiendo una descripción completa de la química del fitato frente a ambos iones en sistemas biológicos[20,21].

En el contexto planteado, se presentan en este capítulo los resultados del estudio fisicoquímico y estructural de los procesos de precipitación del InsP_6, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas, y sus consecuencias en la modulación de la especiación química del ligando en presencia de exceso de iones metálicos.

2. Parte experimental

2.1. Síntesis y medidas de solubilidad de las fases sólidas

Todos los fitatos sólidos se sintetizaron mediante la misma estrategia general y de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 4. Se parte de 30 mL de una solución 0,01 M de fitato, a la cual se le ajusta el pH entre 10 y 11 (7 en el caso de iones M^{3+}) utilizando una solución de LiOH 1 M. Se agrega, con agitación, 1,5 mmol de ion metálico disueltos en la mínima cantidad de agua destilada. En algunos casos, para evitar la hidrólisis es necesario adicionar a la solución del metal unas gotas de HCl 0,3 M. Se forma una fase sólida inmediatamente, la cual se separa por centrifugación y es lavada 3 veces con 10 mL de agua destilada y 2 veces con 5 mL de etanol absoluto. Se deja secar el sólido por varios días.

Las medidas de solubilidad de los fitatos de magnesio, calcio, estroncio, bario, cinc y hierro(III) fueron ejecutadas a I = 0,15 M y T = 37,0 °C de acuerdo a las condiciones presentadas en el capítulo 4. Para cada medida se utilizaron entre 50 y 200 mg de cada complejo, y se agregaron alícuotas conocidas de una

solución 0,1 M de HCl, de forma de alcanzar distintos puntos de equilibrio correspondientes a cantidades medibles de metal en solución. Las suspensiones fueron filtradas a través de filtros de membrana de 0,2 µm de diámetro de poro (Sigma-Aldrich), manteniendo en todo momento el sistema termostatizado a la temperatura de trabajo.

2.2. Análisis de metal en presencia de fitato

En el capítulo 4 se exhibieron las características generales de los procedimientos de cuantificación de iones metálicos utilizados en esta tesis. En pos de una mejora en la calidad de los resultados, en algunos casos se consideró adecuada la aplicación de técnicas analíticas alternativas, optimizadas de forma individual para cada sistema. En esta sección se presentan en detalle los procedimientos experimentales adaptados a la determinación de algunos metales en presencia de fitato.

2.2.1. Dosificación de Ba^{2+} en muestras de fitato de bario

Se pesa ≈ 50 mg del fitato y se disuelven en 0,2 mL de HCl 2 M. Se agrega 5 mL de agua y se trasvasa cuantitativamente la solución a un tubo previamente pesado. Se adiciona 5 mL de H_2SO_4 0,06 M, se centrifuga la suspensión y se lava el precipitado obtenido con dos porciones de 5 mL de agua desionizada. Se centrifuga nuevamente y se seca el sólido en estufa a 120 °C por 24 horas. Se pesa el tubo y se determina el contenido de bario del fitato a partir de la masa obtenida de $BaSO_4$.

2.2.2. Dosificación de Ba^{2+} en las medidas de K_{ps} del fitato de bario

En un tubo previamente pesado, se colocan 10,00 mL del sobrenadante y 0,1 mL de H_2SO_4 2 M. Se homogeiniza la suspensión, se centrifuga y se lava el precipitado obtenido con una porción de 5 mL de agua desionizada. Se centrifuga nuevamente y se seca el sólido en estufa a 120 °C por 24 horas. Se pesa el tubo y se determina el contenido de bario en el sobrenadante a partir de la masa obtenida de $BaSO_4$.

2.2.3. Dosificación de Ca^{2+} en muestras de fitato de calcio

Se pesa ≈ 30 mg del fitato y se disuelven en 1 mL de HCl 2 M. Se agrega 5 mL de una solución de ácido oxálico 0,054 M y se trasvasa cuantitativamente la solución a un tubo previamente pesado. Se agrega gota a gota una solución de NH_3 7 M hasta que el pH de la solución se encuentre entre 1,5 y 3 (aproximadamente 0,4 mL), lo que permite el máximo porcentaje de recuperación del metal y evita la precipitación simultánea del fitato de calcio. Se centrifuga la suspensión y se lava el sólido obtenido con dos porciones de 5 mL de agua desionizada. Se centrifuga nuevamente y se seca en estufa a 70 °C por 24 horas. Se pesa el tubo y se determina el contenido de calcio del fitato a partir de la masa obtenida de $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$.

2.2.4. Dosificación de Fe^{3+} en muestras de fitato de hierro(III)

Se pesa ≈ 20 mg del fitato y se disuelven en 25 mL de HCl 2 M. Se lleva la solución a ebullición en un sistema a reflujo por una hora. Se trasvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 100,00 mL y se enrasa con agua desionizada. Se hacen cuatro tomas de 5,00 mL de la solución y se disponen en matraces aforados de 50,00 mL. Desde una bureta se adicionan, a tres de ellos, 1,5, 2,5 y 3,5 mL de un patrón de hierro(III), el cual se prepara disolviendo 18,1 mg de $Fe(NO_3)_3{\cdot}9H_2O$ en 100,00 mL de HNO_3 0,2 M y se titula por una técnica complejométrica estándar[38]. Se agrega a todos los matraces 25,00 mL de solución de KSCN 0,62 M y se enrasa con HNO_3 0,2 M. Se mide la absorbancia de cada solución a 480 nm en las condiciones detalladas en el capítulo 4, y se determina la concentración del ion Fe^{3+} por extrapolación a cero en el eje de las ordenadas de la curva obtenida.

2.2.5. Dosificación de Fe^{3+} en las medidas de K_{ps} del fitato de hierro(III)

Se colocan 10,00 mL del sobrenadante en un matraz aforado de 100,00 mL y se enrasa con HNO_3 0,2 M. Se toman cuatro alícuotas de 20,00 mL de esta solución y se colocan en cuatro matraces aforados de 50,00 mL. Desde una bureta se adicionan, a tres de ellos, 0,5, 1 y 2 mL de un patrón de hierro(III), el cual se prepara y titula según el punto 2.2.4. Se agrega a todos los matraces 25,00 mL de solución de KSCN 0,62 M y se enrasa con HNO_3 0,2 M. Se mide la

absorbancia de cada solución a 480 nm en las condiciones detalladas en el capítulo 4, y se determina la concentración del ion Fe^{3+} por extrapolación a cero en el eje de las ordenadas de la curva obtenida.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización química de las fases sólidas

En la tabla 8.1 se resume la composición química de las fases sólidas del fitato con iones +2 y +3. La muy baja solubilidad de las sales (que impide una purificación eficiente por recristalización) y la alta hidratación de las mismas son responsables de los leves apartamientos observados entre valores teóricos y experimentales. Las fórmulas corresponden, en la mayoría de los casos, a complejos del tipo $M_5(H_2L)\cdot xH_2O$, de acuerdo con la relación metal:ligando 5:1 reportada por varios autores[8,9,13-15,20-22,25,39]. El estado de protonación del ligando en las especies (H_2L), sin embargo, es compatible sólo con algunos trabajos anteriores para magnesio, calcio[13-15,20,21] y cobalto[22].

Tabla 8.1. Resultados del análisis elemental, rendimientos y composición química de las fases sólidas del fitato con iones M^{2+} y M^{3+}.

Fórmula	Peso fórmula	% experimentales (calculados)				% Rend.
		C	H	Metal	H_2O	
$Sr_5(H_2L)\cdot 16H_2O$	1376,30	5,03 (5,24)	2,92 (2,93)	32,0 (31,8)	21,1 (20,9)	24
$Ba_5(H_2L)\cdot 16H_2O$	1624.92	4,69 (4,44)	2,23 (2,48)	43,2 (42,3)	17,9 (17,7)	67
$Mn_5(H_2L)\cdot 16H_2O$	1212,89	5,49 (5,94)	3,08 (3,32)	23,1 (22,7)	24,2 (23,8)	35
$Co_5(H_2L)\cdot 20H_2O$	1304,93	5,48 (5,52)	3,69 (3,71)	22,9 (22,6)	28,1 (27,6)	55
$Ni_5(H_2L)\cdot 22H_2O$	1339,76	5,12 (5,38)	3,92 (3,91)	22,9 (21,9)	30,1 (29,6)	54
$Cu_6L\cdot 14H_2O$	1281,37	5,36 (5,62)	2,89 (2,67)	29,6 (29,8)	19,8 (19,7)	38
$Zn_5(H_2L)\cdot 14H_2O$	1229,12	5,33 (5,86)	2,48 (2,95)	26,8 (26,6)	19,5 (20,5)	47
$Cd_5(H_2L)\cdot 14H_2O$	1464,23	4,49 (4,92)	2,42 (2,49)	39,6 (38,4)	17,5 (17,2)	49
$Fe_4L\cdot 22H_2O$	1267,67	5,77 (5,69)	3,90 (3,98)	17,0 (17,6)	30,2 (31,3)	86
$Al_3(H_3L)\cdot 20H_2O$	1092,21	6,86 (6,60)	4,46 (4,52)	7,4 (7,4)	32,2 (33,0)	94

En el caso del ion cobre, el contenido determinado de metal en las muestras analizadas es mayor al esperado para una estequiometría similar a las anteriores. De hecho, un buen ajuste de los valores de porcentaje de carbono, hidrógeno, metal y aguas de hidratación es posible a través del planteo de la fórmula $Cu_6L{\cdot}14H_2O$, de similar relación metal:ligando a la reportada en condiciones de exceso de ion cloruro ($[M_6(H_2L)Cl_2]{\cdot}2{,}5H_2O$)[24].

Los iones +3 estudiados constituyen también casos especiales en la tendencia general. El ion Fe^{3+} forma con el fitato, en condiciones de exceso de metal, la especie $Fe_4L{\cdot}22H_2O$, cuya relación metal a ligando concuerda con aquella reportada como máxima en la fase sólida[33]. En presencia del ion aluminio, por el contrario, el fitato da lugar a un complejo cuyo contenido de metal es significativamente menor al esperado para una relación 4:1 metal:ligando, similar a la reportada anteriormente por Evans y Martin[39]. El mejor ajuste de los valores experimentales se alcanza a través de una estequiometría del tipo $Al_3(H_3L){\cdot}20H_2O$, en donde cada ion fitato se une a tres cationes aluminio y tres protones.

El gran número de aguas de hidratación de los sólidos merece un comentario especial. Los perfiles termogravimétricos resultaron poco definidos para todas las muestras analizadas. Como se detalla para el fitato de magnesio en la figura 8.2A, no es posible asignar saltos y mesetas claras asociadas a procesos de pérdida de masa específicos e independientes. La importante caída de la curva que se extiende en un amplio rango de temperatura hasta los 250 °C, puede asignarse a la pérdida de las aguas de hidratación de los complejos, mientras que por encima de este punto se observa una leve baja en la masa debida, probablemente, a la descomposición del complejo. Dado que en general la disminución de masa comienza a valores de temperaturas tan bajos como 50 °C, es posible sugerir la presencia de moléculas de H_2O retenidas débilmente en el sólido. Luego de una brusca caída, la curva de la derivada primera (DTG) muestra un rápido retorno a cero a temperaturas que se encuentran en general por debajo de 100 °C. En esta zona se detecta, en todos los casos, una discontinuidad en las curvas de TGA, hasta donde es posible calcular la pérdida de moléculas de agua, y asignar tentativamente las mismas como aquellas que se mantienen más débilmente retenidas en la estructura. En la tabla 8.2 se resumen estas características para los análisis térmicos realizados.

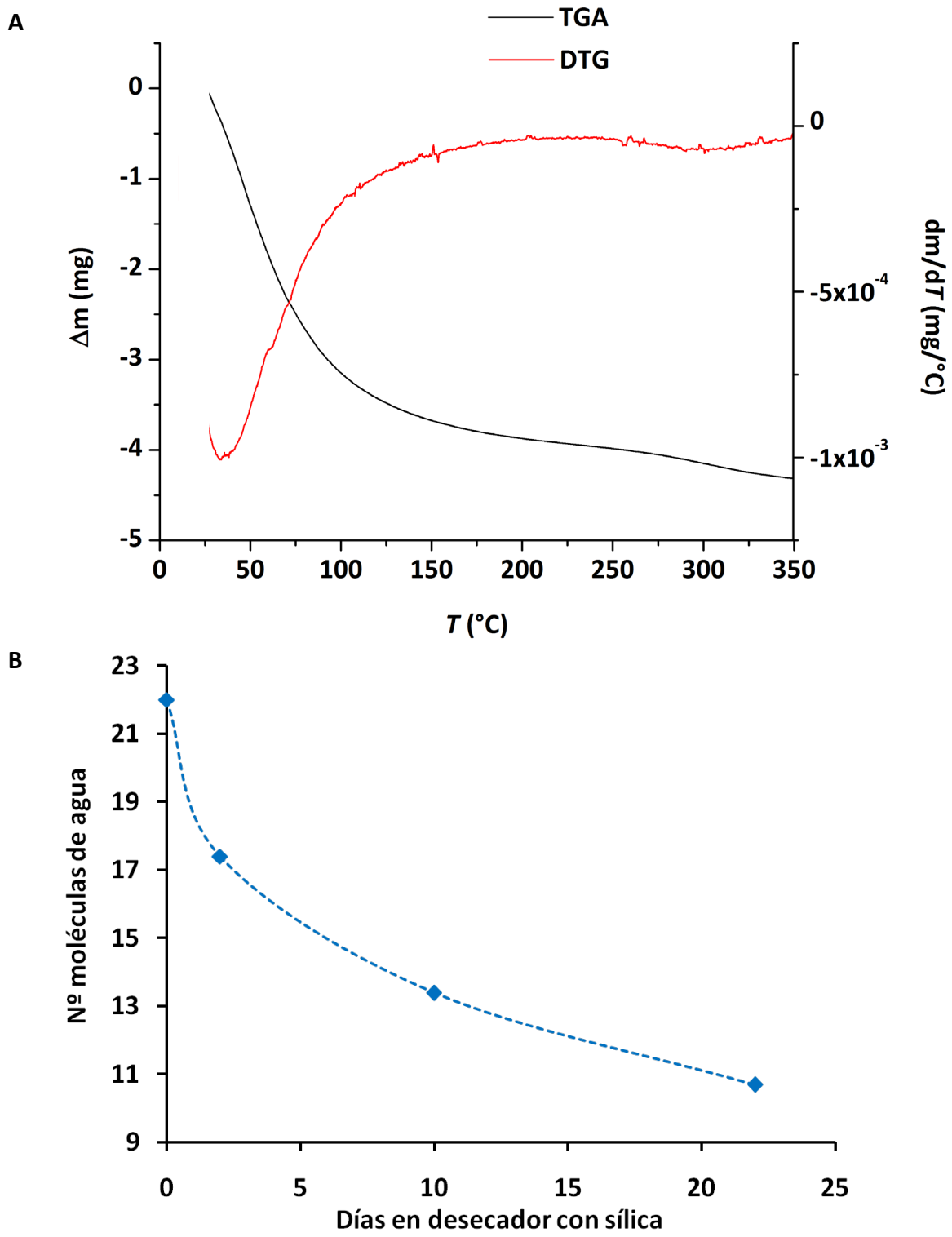


Figura 8.2. (A) Resultados del análisis termogravimétrico (TGA) para el fitato de magnesio. (B) Variación del número de moléculas de agua de hidratación para este mismo sólido estimada a partir del contenido de metal, luego de ser sometido a varios días en desecador con sílica gel. En (A) se muestra en rojo la derivada primera de la curva de TGA (DTG).

Tabla 8.2. Porcentaje de disminución de masa y número de moléculas de agua de hidratación perdidas y restantes en los experimentos termogravimétricos a las temperaturas indicadas, para las fases sólidas del fitato con iones M^{2+} y M^{3+}.

Metal	*T*(°C)	% masa perdida a *T*	Nº H_2O perdidas a *T*	Nº H_2O restantes	Nº H_2O totales
Mg	70-80	21,8	13,0	9,0	22
Ca	96	18,8	11,5	4,5	16
Sr	93	15,5	11,8	4,2	16
Ba	97	13,3	12,3	3,7	16
Mn	92	18,8	12,2	3,8	16
Co	92	22,1	15,2	4,8	20
Ni	98	19,5	14,3	7,7	22
Cu	97	13,6	10,1	3,9	14
Zn	98	12,3	10,1	3,9	14
Cd	99	12,7	10,1	3,9	14
Fe(III)	95	19,9	13,0	9,0	22
Al(III)	90	24,2	15,0	5,0	20

Entre 12 y 15 moléculas de agua se liberan con un aumento rápido de temperatura en el intervalo 50 - 100 °C. El resto, cuya remoción es más dificultosa, es factible que se encuentren asociadas al ion metálico. En detalle, por mol de ligando éstas son aproximadamente 4 para los fitatos de los iones Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} y Cd^{2+}, 8 del ion Ni^{2+}, 9 de los iones Mg^{2+} y Fe^{3+}, y 5 del ion Al^{3+}. Estos resultados sugieren que promedialmente no existirían más de dos moléculas de agua coordinadas a cada centro metálico. La gran diferencia observada entre la capacidad de retención de agua por parte de los sólidos de hierro(III) y aluminio(III) es compatible con el menor número de cationes por mol de ligando determinado en el último caso (tabla 8.1).

La presencia de aguas de cristalización asociadas de forma débil origina que el nivel de hidratación de los complejos, y por tanto su composición química, varíen significativamente con el nivel de humedad del medio. Como indica la figura 8.2B, este fenómeno es realmente notorio en el caso del fitato de magnesio, en donde el contenido de agua por molécula de ligando disminuye de 22 a 11 moléculas en poco más de 20 días de almacenamiento en un desecador con sílica. Resulta interesante notar que la curva obtenida tiende asintóticamente a un valor cercano a 9 moléculas de agua de hidratación,

aquellas que, según los datos de la tabla 8.2, se retienen más fuertemente por encontrarse coordinadas al metal.

3.2. Caracterización estructural de las fases sólidas

3.2.1. Espectroscopía infrarroja

La técnica de espectroscopía infrarroja resulta muy adecuada para la caracterización estructural de estos sistemas, permitiendo evidenciar algunos aspectos interesantes relacionados con la coordinación InsP_6-metal. En ausencia de ion metálico, las bandas registradas para la sal $K_2(H_{10}L)\cdot 2{,}5H_2O$ se muestran en la figura 8.3A. Dada la complejidad del perfil de señales obtenido, y sólo para facilitar el esquema de asignación, se muestra en azul el espectro teórico IR calculado para la especie $H_{12}L$ (1a5e), cuya geometría fue analizada en el capítulo 6. El acuerdo entre ambos espectros es muy bueno, lo que permite realizar la identificación tentativa de los picos más importantes.

Entre 3700 y 2500 cm^{-1} se registran varias bandas de intensidad media correspondientes a los modos normales de estiramiento O-H, lo que está de acuerdo con el espectro reportado para el $Ca(H_2PO_4)_2\cdot H_2O$[40]. En esta misma zona, se encuentran señales de baja intensidad asociadas al estiramiento del enlace C-H del anillo de inositol, las cuales son ubicuas en compuestos del tipo P-O-R en el rango 3030-2800 cm^{-1} [41]. A números de onda en el entorno de los 1600 cm^{-1} se observa una banda ancha con una estructura fina compleja. La misma no se predice en el espectro teórico del $H_{12}L$, por lo que es factible que las moléculas de agua de hidratación contribuyan a la misma. De hecho, el fosfato de calcio monohidratado también la presenta, y es asignada en ese caso a la deformación del ángulo de enlace H-O-H de la molécula de agua. Varios trabajos en el tema han investigado los factores que afectan la posición de esta señal[42]. Los resultados marcan que las características de complejación y de enlace de hidrógeno son los factores más importantes. En general, esta señal es ancha en compuestos donde existe variación estructural entre las distintas moléculas de agua de hidratación. Al margen de esto, en esta zona han sido asignadas, asimismo, bandas múltiples debidas a sobretonos de los modos normales δ(PO-H) y ρ(PO-H) [41], los cuales como se verá aparecen a menores números de onda.

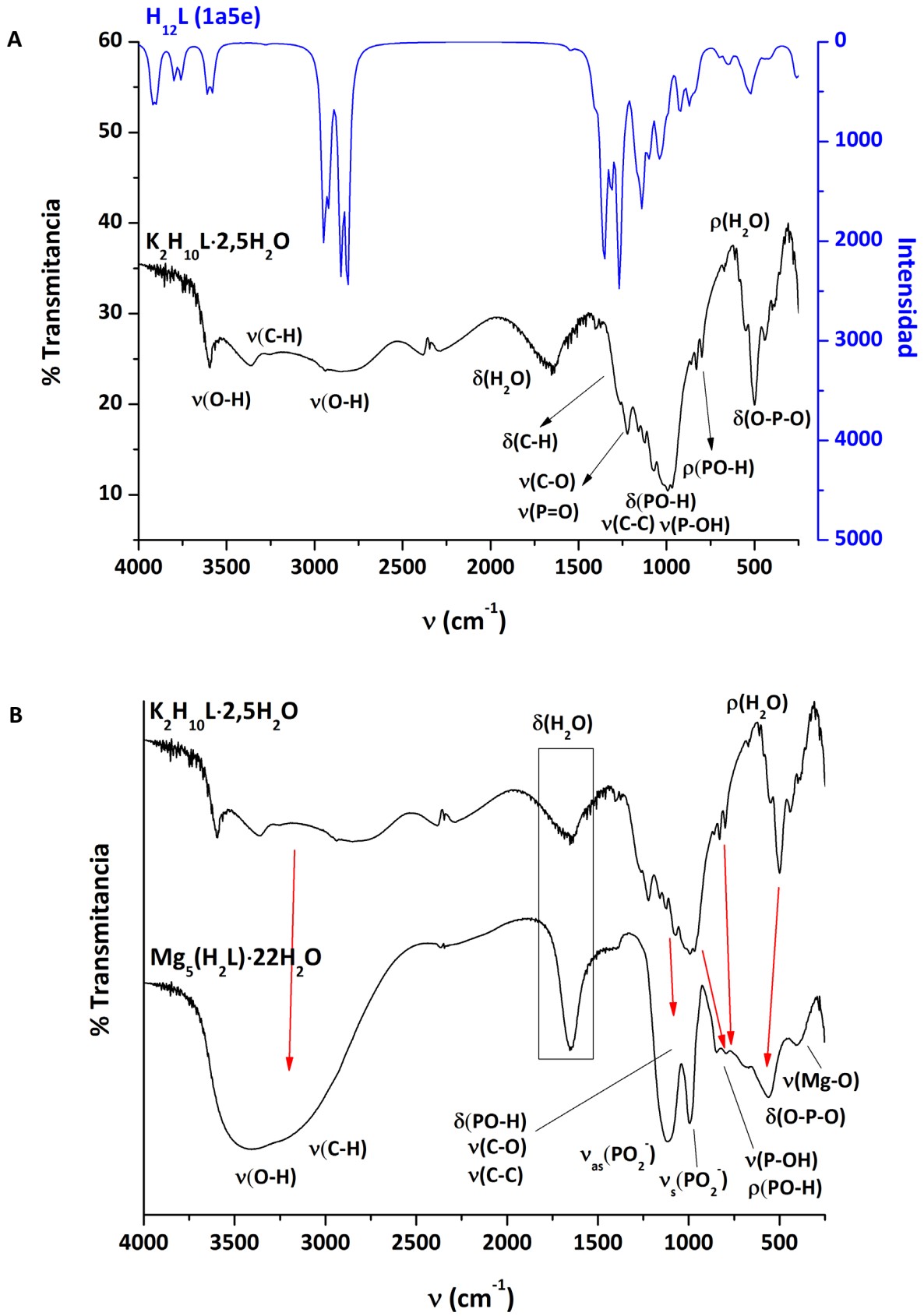


Figura 8.3. Espectro infrarrojo de la sal $K_2(H_{10}L)\cdot 2{,}5H_2O$ (A) y su alteración por formación del complejo $Mg_5(H_2L)\cdot 22H_2O$ (B). En (A) se muestra en azul el espectro teórico calculado del ligando en base a la geometría optimizada RHF/3-21+G* de la especie $H_{12}L$ (1a5e) (ancho de banda a la mitad de la altura de pico = 15 cm^{-1}).

Por debajo de 1400 cm^{-1} y hasta 700 cm^{-1} se registra una banda ancha y bastante intensa, la cual está dominada por las vibraciones asociadas a los grupos fosfato. El hombro por encima de 1250 cm^{-1} corresponde a la deformación de los enlaces C-C-H del anillo, en concordancia con lo reportado para el dihidrógenofosfato de la DL-metionina[43]. El pico correspondiente a 1250 cm^{-1} es asignado teóricamente al estiramiento P=O, y experimentalmente se lo ha detectado en el rango 1320-1140 cm^{-1} [40,41,43,44]. Por debajo de este número de onda es probable que se hallen los modos ν(C-OP), los cuales aparecen usualmente en la región 1100-900 cm^{-1} [41] y se predicen teóricamente apenas por encima de la misma. Los picos más intensos del espectro, cercanos a 1000 cm^{-1}, se asignan a vibraciones relativamente independientes del anillo (ν(C-C)) y los grupos fosfato (ν(P-OH) y δ(PO-H)). En la sal dihidrógenofosfato de la DL-metionina, ambos se han reportado entre 970 y 870 cm^{-1} [43], mientras que para el $Ca(H_2PO_4)_2{\cdot}H_2O$[40] éstos caen en la zona 975-864 cm^{-1}. Para el piridoxalfosfato, las señales correspondientes a ν(P-OH) son muy intensas y se ubican cercanas a 1040 cm^{-1} [44]. Hacia el final de esta banda, a 750 cm^{-1}, existen además dos picos de intensidad media, los que coinciden satisfactoriamente con los predichos por el modelo teórico. Los mismos se asocian a modos normales de deformación fuera del plano de los enlaces P-O-H (ρ(PO-H)), y se han observado cercanos a 784 cm^{-1} [43]. Por último, se registra un pico de alta intensidad aproximadamente a 500 cm^{-1}, el que es generado por la deformación de los enlaces O-P-O. En total acuerdo, el mismo ha sido asignado en compuestos similares en el rango 570-510 cm^{-1} [40,43,45]. Dado que en esta zona se ha descrito la aparición de los movimientos de balanceo de las moléculas de agua, es posible que las señales correspondientes aporten a la estructura fina y a la línea de base de esta banda[40].

La figura 8.3B muestra los espectros correspondientes a la sal de potasio del ligando y el fitato de magnesio (sintetizado de acuerdo a la referencias[20,21]). La inclusión del ion Mg^{2+} afecta sustancialmente el perfil espectral, tanto en intensidad como en la posición de las señales. Esto ocurre porque, respecto de la sal del ligando, en el complejo sólido el fitato no sólo se coordina al metal, sino que además se encuentra menos protonado y aumenta su grado de hidratación. En primer lugar, la inclusión de nuevas moléculas de agua provoca un aumento marcado en la intensidad de las bandas asociadas, ubicadas en las regiones 3750-2500 cm^{-1} (ν(O-H)), 1750-1500 cm^{-1} (δ(H-O-H)) y 750-500 cm^{-1}

(ρ(H_2O)). Por su parte, la banda de mayor intensidad asociada a los modos ν(P-OH) y δ(PO-H) se divide en tres. Dos de ellas, a 1120 y 990 cm^{-1}, corresponden, respectivamente, a los modos $\nu_{as}(PO_2^-)$ y $\nu_s(PO_2^-)$, los cuales han sido reportados anteriormente para el piridoxalfosfato[44]. Respecto de este último, ambas vibraciones se ven afectadas, sin embargo, por la asociación del metal a los oxígenos terminales. La tercera banda aparece cercana a 850 cm^{-1} y es probable que contenga los modos normales ν(P-OH), según se ha comprobado para algunos complejos de cobre[46]. Dada la ubicación que tienen en el espectro del ligando, en el rango comprendido entre estas tres bandas es factible que se hagan presentes, además, las vibraciones asociadas a δ(PO-H), ρ(PO-H), ν(C-O) y ν(C-C), afectadas en cierto grado por la presencia del metal. Finalmente, por debajo de 550 cm^{-1} se registran dos picos, asignados a δ(O-P-O) (también afectado por la coordinación) y al estiramiento de los enlaces metal-ligando, en concordancia con lo reportado en compuestos del fosfato con cobre y magnesio[46,47].

En la tabla 8.3 se resume la posición de las bandas más importantes asociadas a los grupos fosfatos para los fitatos caracterizados en este trabajo y los análogos de magnesio y calcio [20,21]. Todos presentan una pequeña diferencia entre la posición de las vibraciones $\nu_{as}(PO_2^-)$ y $\nu_s(PO_2^-)$, y bajos valores de frecuencia de δ(O-P-O), aspectos que han sido relacionados a un patrón de coordinación M-O-P, donde el grupo fosfato actúa de forma bidentada [23].

El perfil espectral general es similar en todos los casos. En la figura 8.4A se comparan los espectros IR de los complejos con metales alcalinotérreos. Según se advierte, las bandas correspondientes a los grupos fosfatos se mantienen incambiadas, excepto por pequeñas variaciones que se observan por debajo de 500 cm^{-1} donde, como se discutió anteriormente, se localizan las vibraciones metal-ligando. Es interesante notar que a medida que se intercambia el catión, de Mg^{2+} a Ba^{2+}, una banda aumenta su intensidad en la zona 1500-1370 cm^{-1}. Una búsqueda bibliográfica no reporta resultados consistentes respecto de modos normales asociados a los grupos ionizables. En el caso de la metionina, en este rango se registran señales debidas a la deformación de los grupos -CH_2- [43]. Dado que un aumento progresivo en el tamaño del ion afecta la tensión sufrida por el anillo de inositol (capítulo 6), es posible pensar en esta posibilidad como asignación tentativa.

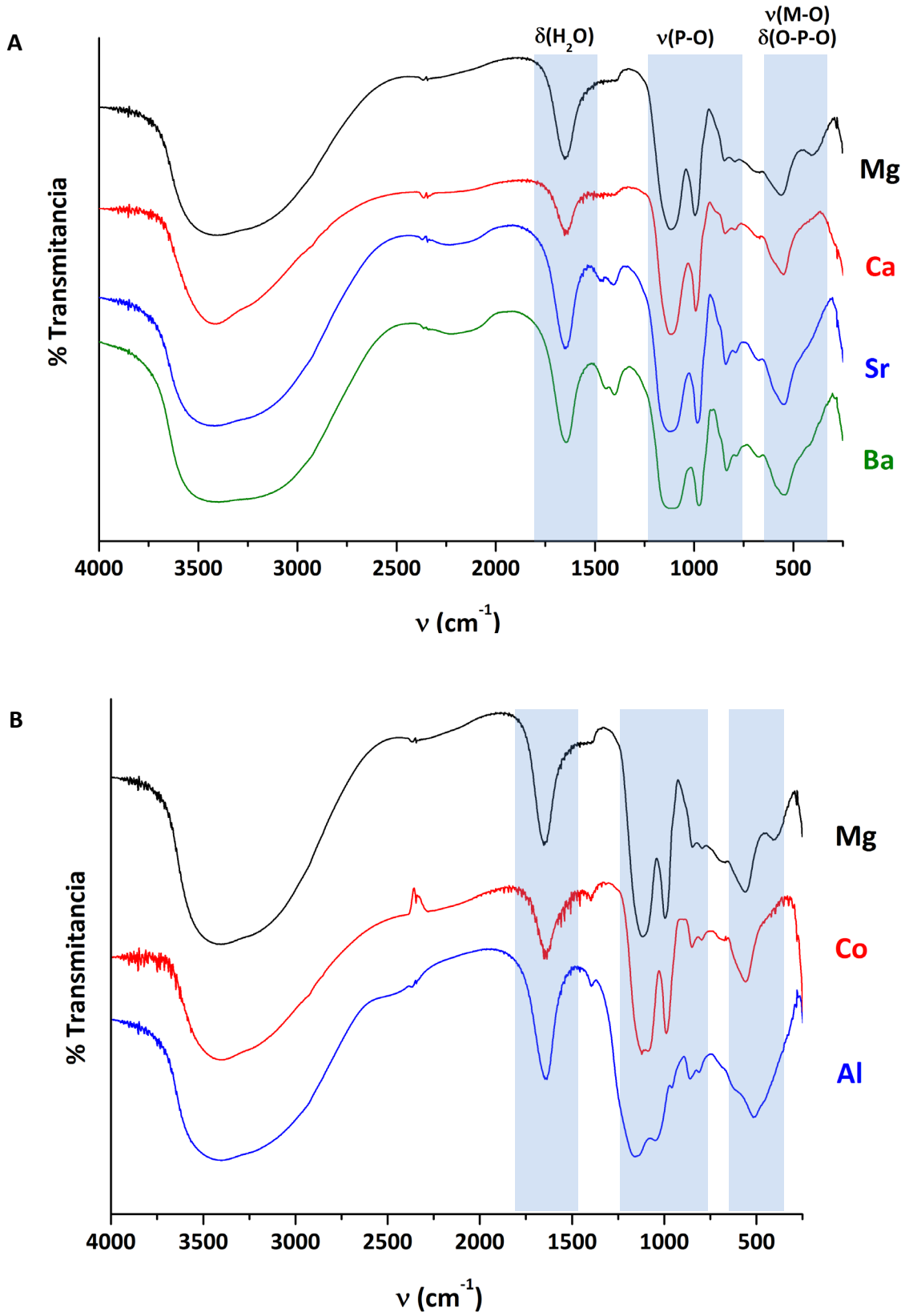


Figura 8.4. Espectros infrarrojos de los fitatos de Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} y Ba^{2+} (A) y Mg^{2+}, Co^{2+} y Al^{3+} (B).

Tabla 8.3. Bandas seleccionadas de los espectros infrarrojos asociadas a los grupos fosfatos para los fitatos de metales +2 y +3.

	Bandas del IR (cm^{-1})		
Metal	$\nu_{as}(PO_2^-)$	$\nu_s(PO_2^-)$	δ(O-P-O)
Mg	1118	995	555
Ca	1120	992	543
Sr	1122	983	547
Ba	1114	975	541
Mn	1106	992	547
Co	1121	989	558
Ni	1121	986	568
Cu	1122	993	549
Zn	1089	1003	537
Cd	1081	982	540
Fe(III)	1078	1007	502
Al(III)	1159	1050	516

Para los iones 3d no se observa un cambio significativo en los espectros infrarrojos, como se advierte de la comparación entre los fitatos de magnesio y cobalto en la figura 8.4B. No obstante, el aumento en una unidad en la carga del catión provoca un desplazamiento y fusión de las señales asociadas a los grupos fosfatos. Es posible que este fenómeno esté asociado con el aumento en la fuerza del enlace metal-ligando, en concordancia con un modelo de interacción metal-ligando esencialmente electrostático.

3.2.2. Espectroscopía Raman y de RMN de ^{13}C

La espectroscopía Raman ha probado ser una herramienta muy útil para el estudio de las preferencias conformacionales del fitato[48,49]. Las especies del ligando en la conformación 5a1e tienen en común una banda ubicada a 1300 cm^{-1}. Esta señal, la cual se encuentra presente tanto en solución como en la sal dodecasódica[48], ha sido asignada a la suma ν(C-C) + ν(C-O) + ρ(C-H) mediante el uso del método computacional PM3[49].

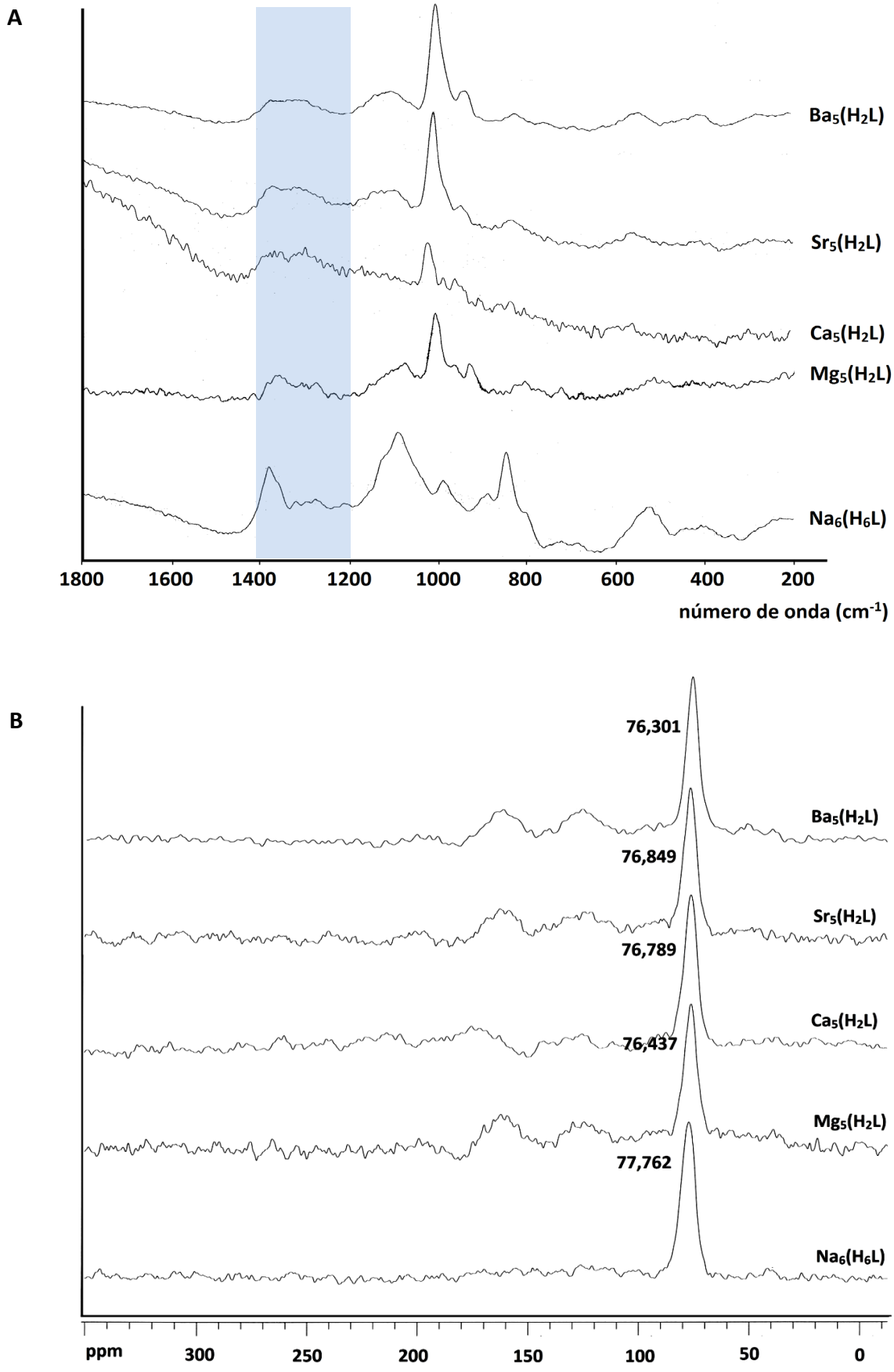


Figura 8.5. Espectros Raman (A) y RMN de ^{13}C (B) de los complejos $Na_6(H_6L)$ y $M_5(H_2L)$ con M = Mg, Ca, Sr y Ba. En (A) se destaca la zona en donde se encuentran las bandas asociadas a ambas conformaciones del ligando.

Por el contrario, la disposición 1a5e de los sustituyentes muestra un pico cercano a 1380 cm^{-1}; este patrón ha sido reportado en solución acuosa por debajo de pH = 9,5[48] y, como se observa en la figura 8.5A, también está presente en el sólido Na_6H_6L. En el caso de los fitatos de los metales alcalinotérreos, la intensidad de la banda a 1380 cm^{-1} decrece significativamente respecto de la sal hexasódica (figura 8.5A). No obstante, la señal no desaparece por completo, ni tampoco se define ningún pico de intensidad apreciable a 1300 cm^{-1}. En cambio, se observa la formación de una banda relativamente ancha y poco resuelta. En suma, estos datos no apoyan la idea de una única conformación del ligando; parece factible que el mismo se encuentre en una mezcla de ambos o, tal vez, en una conformación distorsionada intermedia.

La figura 8.5B muestra los espectros de RMN de ^{13}C al estado sólido para los mismos fitatos. Éstos exhiben una única señal intensa a 76 (Mg, Ba), 77 (Ca, Sr) ó 78 (Na_6H_6L) ppm, compatibles con las registradas en solución[48]. Desafortunadamente, mientras que en medio acuoso las bandas de los átomos de carbono que unen a los grupos fosfato axial y ecuatorial logran ser resueltas, no ocurre lo mismo en los sólidos. Por tanto, en este caso no es posible la extracción de información estructural a partir de esta técnica.

3.3. Síntesis y caracterización de fitatos mixtos InsP_6-K^+-M^{2+}

De forma de estudiar indirectamente la composición de las fitinas encontradas a nivel vegetal, se analizó la precipitación de complejos sólidos del fitato en presencia de mezclas de los iones +1 y +2 que más comúnmente componen estos sólidos de reserva: K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} y Zn^{2+}. En la tabla 8.4 se resumen los resultados de la caracterización química de las fases obtenidas. En general, el rendimiento de las síntesis disminuye apreciablemente con el contenido de ion alcalino, por lo que, en algunos casos, no fue posible la obtención de una cantidad suficiente como para realizar todos los análisis planificados.

En primer lugar, la tendencia general marca que al aumentar la relación molar M^+/M^{2+} utilizada, los sólidos presentan un mayor contenido de ion alcalino, mientras que disminuyen los porcentajes de metal divalente. Esto podría estar relacionado a la formación de fases estequiométricas mixtas, o simplemente

deberse a la generación de mezclas de sólidos de ambos tipos de iones. Por comparación con los valores teóricos de la composición elemental de las posibles variantes estequiométricas (tabla 8.5), ninguno de los compuestos obtenidos pudo ser asignado a una fórmula definida. Incluso si se consideran otros grados de hidratación (distintos de los encontrados para los fitatos correspondientes), el ajuste entre valores teóricos y experimentales no logra alcanzarse.

Tabla 8.4. Relaciones molares utilizadas y resultados del análisis elemental de las fases sólidas mixtas de fitato con K^+ y Mg^{2+}, Ca^{2+} o Zn^{2+}.

Metal	Relación molar			% experimentales			
	M(II)	K	L	C	H	M(II)	K
Mg	4	2	1	5,95	4,80	9,6	1,41
	3	4	1	5,93	4,28	9,1	2,49
	2	6	1	6,13	4,53	8,7	3,16
	2*	6*	1*	5,88	3,06	4,3	6,06
	1	8	1	6,62	4,32	8,6	3,96
	1	8	1	7,75	4,81	10,1	---
	1*	8*	1*	5,80	2,62	2,6	10,1
Ca	4	2	1	5,04	3,71	18,0	0,93
	3	4	1	5,93	3,33	16,3	1,84
	3	4	1	5,00	3,72	20,4	1,44
	2	6	1	5,82	3,64	14,8	3,54
	1	8	1	5,90	3,57	14,5	2,02
	1	8	1	5,80	3,58	15,4	----
Zn	4	2	1	5,56	2,61	24,8	3,16
	3	4	1	5,74	2,67	22,7	5,45
	3	4	1	5,38	2,47	23,9	5,78
	2	6	1	6,16	2,78	20,5	6,92
	1	8	1	6,35	2,89	18,5	7,34
	1	8	1	6,18	2,76	20,7	---

* Las filas con un asterisco corresponden a sólidos aislados luego de la evaporación controlada del sobrenadante de la síntesis correspondiente.

Tabla 8.5. Porcentajes elementales teóricos de complejos neutros del fitato con K^+ y Mg^{2+}, Ca^{2+} o Zn^{2+}.

Fórmula	% teóricos (M = Mg; x = 22)				% teóricos (M = Ca; x = 16)				% teóricos (M = Zn; x = 14)			
	C	H	Mg	K	C	H	Ca	K	C	H	Zn	K
$M_5(H_2L)\cdot xH_2O$	6,17	4,49	10,4	0	6,33	3,54	17,6	0	5,86	2,95	26,6	0
$M_5K(HL)\cdot xH_2O$	5,98	4,26	10,1	3,24	6,12	3,34	17,0	3,32	5,69	2,78	25,8	3,09
$M_5K_2L\cdot xH_2O$	5,79	4,05	9,77	6,29	5,93	3,15	16,5	6,44	5,52	2,63	25,1	5,99
$M_4K_2(H_2L)\cdot xH_2O$	5,90	4,29	7,96	6,40	6,12	3,43	13,6	6,65	5,80	2,92	21,1	6,30
$M_4K_3(HL)\cdot xH_2O$	5,72	4,08	7,72	9,31	5,93	3,24	13,2	9,66	5,63	2,76	20,4	9,16
$M_4K_4L\cdot xH_2O$	5,55	3,88	7,49	12,1	5,75	3,06	12,8	12,5	5,47	2,60	19,8	11,9
$M_3K_4(H_2L)\cdot xH_2O$	5,65	4,11	5,72	12,3	5,93	3,32	9,90	12,9	5,74	2,89	15,6	12,5
$M_3K_5(HL)\cdot xH_2O$	5,49	3,91	5,55	14,9	5,75	3,14	9,60	15,6	5,57	2,73	15,2	15,1
$M_3K_6L\cdot xH_2O$	5,33	3,73	5,39	17,4	5,58	2,97	9,31	18,2	5,41	2,57	14,7	17,6
$M_2K_6(H_2L)\cdot xH_2O$	5,42	3,94	3,66	17,7	5,75	3,22	6,40	18,7	5,69	2,86	10,3	18,5
$M_2K_7(HL)\cdot xH_2O$	5,27	3,76	3,55	20,0	5,58	3,04	6,21	21,2	5,52	2,70	10,0	21,0
$M_2K_8L\cdot xH_2O$	5,13	3,59	3,46	22,3	5,42	2,88	6,03	23,5	5,36	2,55	9,73	23,3
$MK_8(H_2L)\cdot xH_2O$	5,21	3,79	1,76	22,6	5,58	3,12	3,10	24,2	5,63	2,83	5,11	24,4
$MK_9(HL)\cdot xH_2O$	5,07	3,62	1,71	24,8	5,42	2,96	3,02	26,5	5,47	2,68	4,96	26,7
$MK_{10}L\cdot xH_2O$	4,94	3,45	1,67	26,8	5,27	2,80	2,93	28,6	5,31	2,53	4,82	28,8

En relación a lo antedicho, la repetición de las síntesis en las mismas condiciones lleva a la formación de sólidos con contenidos en C, H, metal y K significativamente distintos (tabla 8.4). Estos resultados, a diferencia de algunos reportes anteriores[16,25-27], sugieren el establecimiento de mezclas que, posiblemente, contengan al fitato del metal +2 impurificado con alguna sal simple del ion potasio. En concordancia con esto, si se aíslan los sobrenadantes de algunas de las síntesis y se dejan evaporar controladamente, se obtienen fases que difieren sustancialmente en su composición a los compuestos anteriores (marcadas con un asterisco en la tabla 8.4). En general, éstas poseen menor porcentaje de metal divalente, a la vez que la fracción en peso de ion alcalino se incrementa. En todos los casos, sin embargo, no es posible un ajuste a una estequiometría mixta del tipo de las presentadas en la tabla 8.5.

Otro aspecto interesante desde el punto de vista experimental son las características de las fases obtenidas en condiciones de evaporación a

sequedad. Éstas constituyen, en todos los casos, una mezcla que puede separarse a simple vista, de un sólido de aspecto muy similar a los fitatos correspondientes y cristales incoloros prismáticos o cúbicos. Si se disuelven estos últimos en unos mililitros de agua destilada y se agregan algunas gotas de una solución al 5 % (m/V) de $AgNO_3$, ocurre la precipitación abundante de un sólido blanco que se oscurece con la exposición a la luz (AgCl). Estos resultados sugieren que el sistema podría estar constituido, entonces, por una mezcla entre los fitatos del metal M^{2+}, tal vez impurificados con alguna sal de fitato con el ion potasio, y cristales incoloros de KCl.

La figuras 8.6 A y B muestran los espectros IR de algunos de los sólidos mixtos sintetizados. En el caso del sistema Mg-K-InsP_6 (y en el de los otros sistemas considerados), los resultados concuerdan exactamente con el espectro registrado para el fitato del ion M^{2+}. Si ocurre algún cambio estructural con el agregado de ion alcalino, éste es lo suficientemente pequeño como para no generar movimiento apreciable de las señales, incluso en la región sensible de la huella dactilar. Esto está en total acuerdo con un modelo que corresponda a una mezcla al estado sólido entre el fitato de magnesio y una sal del ion potasio. Para los sólidos aislados del sobrenadante de las síntesis las conclusiones son similares. Dado que el contenido de metal +2 disminuye sensiblemente, lo hace también la capacidad para retener moléculas de agua. En concordancia, respecto del espectro del fitato de magnesio, los únicos cambios observados se dan en la intensidad relativa de las bandas asociadas a las moléculas de H_2O.

De forma de simular las condiciones de formación de estos sólidos mixtos en los sistemas biológicos, se realizó por quintuplicado las síntesis de los fitatos de magnesio y calcio en $NaClO_4$ 0,15 M o en KCl 0,15 M. En la tabla 8.6 se detallan los porcentajes de metal +1 y +2 determinados para cada una de las fases obtenidas. En línea con lo discutido hasta el momento, el contenido de ambos iones alcalinos resultó encontrarse en todos los casos por debajo del valor teórico esperado para la formación de fases estequiométricas. Más aún, no se logró concordancia en las composiciones porcentuales dentro de un mismo sistema, lo que sugiere, nuevamente, la formación de mezclas de sales simples de sodio y potasio con los fitatos de magnesio y calcio.

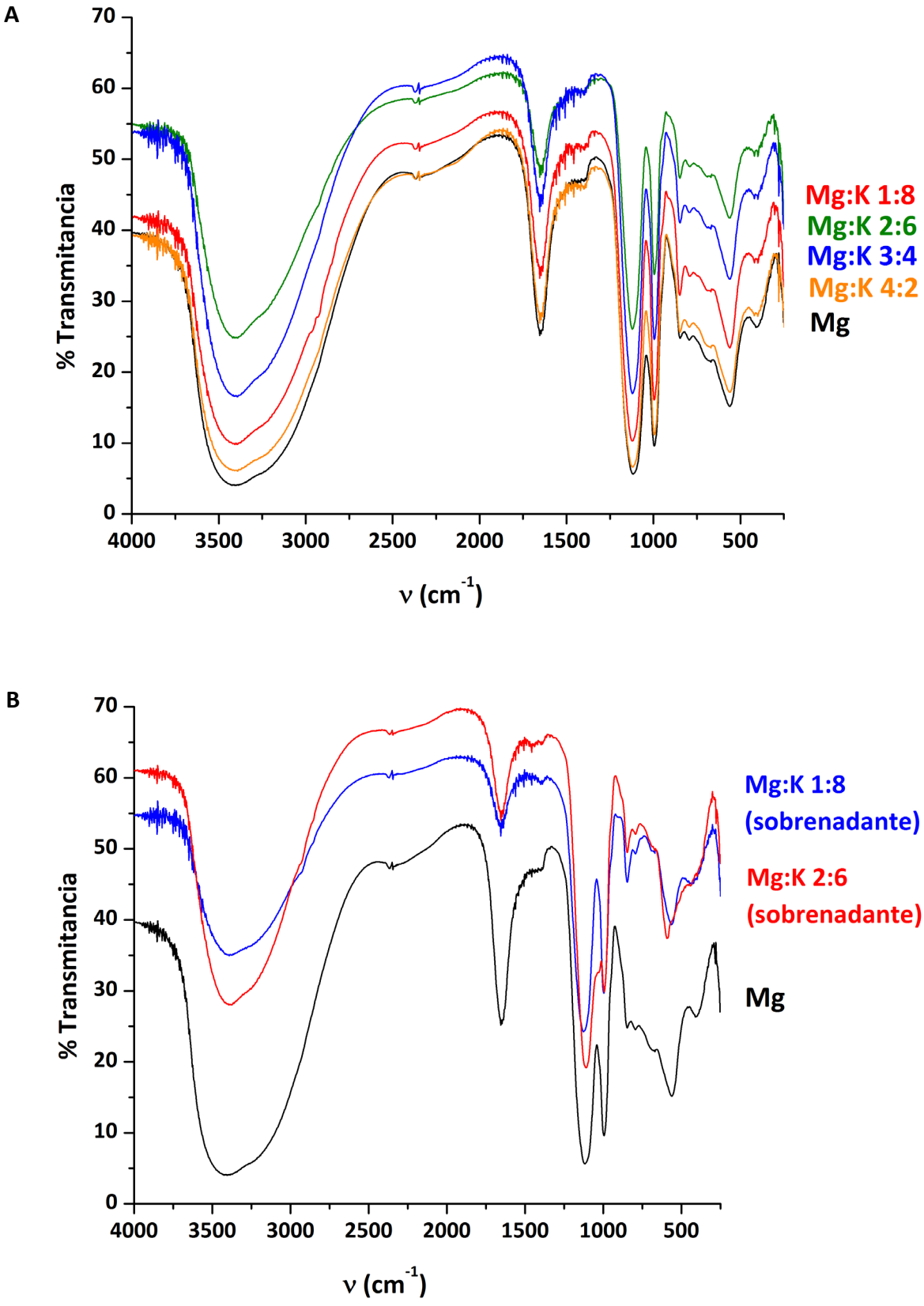


Figura 8.6. Espectros infrarrojos de los complejos mixtos Mg^{2+}-K^{+} del fitato. (A) precipitados obtenidos. (B) sólidos formados por evaporación lenta del sobrenadante de la síntesis. En ambos casos se muestra el espectro correspondiente al fitato de magnesio a modo de comparación.

Tabla 8.6. Resultados del análisis elemental de las fases sólidas mixtas de fitato con Na^+ o K^+ y Mg^{2+} o Ca^{2+}, sintetizadas en $NaClO_4$ 0,15 M o KCl 0,15 M.

	$NaClO_4$ 0,15 M		KCl 0,15 M	
Metal	% experimentales		% experimentales	
	M(II)	Na	M(II)	K
Mg	9,37	1,21	8,98	2,26
	10,2	0,65	9,51	2,41
	9,97	0,59	9,36	2,31
	10,3*	1,41*	9,32	2,60
	9,78	1,23	9,34	2,43
Ca	16,3	0,99	16,8	1,74
	16,9	0,58	16,9	1,84
	16,9	0,46	16,2	2,09
	16,8	0,90	16,8	2,07
	16,6	0,35	18,2	2,01

* El contenido de sodio baja a 0,04 % luego de purificada la fase sólida correspondiente.

Si se redisuelve una de estas fases en HCl (marcada con un asterisco en la tabla 8.6), y se reprecipita mediante un aumento de pH, el contenido de Na^+ en el sólido formado disminuye de 1,41 a 0,04 %. Esta baja de más de 30 veces en el nivel del ion +1 indica que el mismo no se encontraría formando parte de un complejo de composición fija y definida. En apariencia, los fitatos caracterizados de los metales +2 (tabla 8.1) serían más insolubles, y por tanto su formación, en las condiciones empleadas, estaría favorecida frente a una posible especie sólida mixta InsP_6-M^+-M^{2+}.

3.4. Determinación de la solubilidad de los fitatos sólidos

Con el objetivo de caracterizar desde un punto de vista termodinámico los procesos de precipitación, se determinaron las constantes de producto de solubilidad para algunos de los fitatos sintetizados. Se incluyeron en el análisis aquellos iones relevantes a nivel intra y extracelular (Mg^{2+} y Ca^{2+}), así como los más importantes a nivel nutricional (Zn^{2+} y Fe^{3+}). Adicionalmente, las medidas se realizaron en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y temperatura, en un medio no interactuante o en presencia de exceso de Na^+.

Tabla 8.7. Constantes de producto de solubilidad y concentraciones totales y en equilibrio de los componentes utilizadas en las corridas de solubilidad, para las fases sólidas del fitato con Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}.

	NMe_4Cl 0,15 M, 37,0 °C							$NaClO_4$ 0,15 M, 37,0 °C						
Metal	$[M]_{tot.}$ (mM)	$[L]_{tot.}$ (mM)	$[H]_{tot.}$ (mM)	$[M^{2+/3+}]_{libre}$ (mM)	$[H_2L/L]_{libre}$ (M)	log $K_{s,0}$	Promedio	$[M]_{tot.}$ (mM)	$[L]_{tot.}$ (mM)	$[H]_{tot.}$ (mM)	$[M^{2+/3+}]_{libre}$ (mM)	$[H_2L/L]_{libre}$ (M)	log $K_{s,0}$	Promedio
Mg	5,38	1,08	8,50	4,92	$5,9x10^{-25}$	-35,8	-36(1)	Reportado en la referencia[21]						-32,93(6)
	2,97	0,59	4,40	2,73	$1,4x10^{-23}$	-35,7								
	9,65	1,93	15,9	8,86	$3,6x10^{-26}$	-35,7								
	5,73	1,15	8,60	5,19	$1,3x10^{-24}$	-35,3								
	2,08	0,42	4,10	1,98	$4,9x10^{-25}$	-37,8								
	12,6	2,51	17,0	10,9	$2,2x10^{-24}$	-33,5								
Ca	1,31	0,26	3,10	1,31	$4,8x10^{-25}$	-38,7	-38,7(8)	Reportado en la referencia[21]						-39,3(4)
	1,33	0,27	3,10	1,33	$5,1x10^{-25}$	-38,7								
	2,00	0,40	4,70	2,00	$1,4x10^{-25}$	-38,4								
	1,98	0,40	4,60	1,98	$1,3x10^{-25}$	-38,4								
	2,94	0,59	7,50	2,94	$1,3x10^{-26}$	-38,5								
	1,10	0,22	3,70	1,10	$3,7x10^{-26}$	-40,2								
	6,12	1,22	14,4	6,12	$2,2x10^{-27}$	-37,7								
Sr	---	---	---	---	---	---	---	9,24	1,85	15,1	8,47	$2,6x10^{-26}$	-35,9	-35,6(4)
	---	---	---	---	---	---		9,70	1,94	15,3	8,79	$4,5x10^{-26}$	-35,6	
	---	---	---	---	---	---		10,7	2,14	15,7	9,44	$1,5x10^{-25}$	-35,0	
	---	---	---	---	---	---		16,1	3,22	26,9	15,0	$3,6x10^{-27}$	-35,6	
	---	---	---	---	---	---		15,6	3,12	26,7	14,7	$2,3x10^{-27}$	-35,8	

Ba	---	---	---	---	---	---	---	7,63	1,53	14,5	6,65	$1,7x10^{-28}$	-38,7	-38,3(4)
	---	---	---	---	---	---		8,01	1,60	14,6	6,93	$2,3x10^{-28}$	-38,4	
	---	---	---	---	---	---		8,06	1,61	14,6	6,96	$2,4x10^{-28}$	-38,4	
	---	---	---	---	---	---		15,6	3,12	26,7	13,5	$6,0x10^{-29}$	-37,6	
	---	---	---	---	---	---		13,3	2,66	25,8	11,9	$2,1x10^{-29}$	-38,3	
	---	---	---	---	---	---		13,2	2,64	25,7	11,9	$2,0x10^{-29}$	-38,3	
Zn	0,53	0,11	3,46	0,53	$6,7x10^{-27}$	-42,6	-42,8(9)	7,33	1,47	14,3	6,01	$1,1x10^{-29}$	-40,1	-39,9(3)
	0,52	0,11	3,45	0,52	$6,5x10^{-27}$	-42,6		7,33	1,47	14,3	6,01	$1,1x10^{-29}$	-40,1	
	0,46	0,09	3,42	0,46	$5,2x10^{-27}$	-43,0		7,88	1,58	14,6	6,43	$1,4x10^{-29}$	-39,8	
	0,46	0,09	3,42	0,46	$5,2x10^{-27}$	-43,0		14,4	2,88	26,2	11,9	$1,9x10^{-30}$	-39,3	
	0,29	0,06	2,56	0,29	$1,2x10^{-26}$	-43,6		11,5	2,30	25,0	9,80	$7,2x10^{-31}$	-40,2	
	0,23	0,05	2,54	0,23	$8,1x10^{-27}$	-44,2		11,8	2,36	25,2	10,0	$8,0x10^{-31}$	-40,1	
	0,34	0,07	2,09	0,34	$5,0x10^{-26}$	-42,6		---	---	---	---	---	---	
	0,29	0,06	2,07	0,29	$3,8x10^{-26}$	-43,2		---	---	---	---	---	---	
	0,49	0,10	2,64	0,49	$3,0x10^{-26}$	-42,1		---	---	---	---	---	---	
	0,28	0,06	2,55	0,28	$1,1x10^{-26}$	-43,8		---	---	---	---	---	---	
	0,72	0,14	3,20	0,72	$2,5x10^{-26}$	-41,3		---	---	---	---	---	---	
	0,65	0,13	3,17	0,65	$2,0x10^{-26}$	-41,6		---	---	---	---	---	---	
Fe(III)	0,0434	0,0109	12,1	0,00075	$4,3x10^{-51}$	-74,9	-74,7(2)	0,0358	0,0090	11,0	0,0285	$7,2x10^{-48}$	-65,32	-65,4(4)
	0,0441	0,0110	12,1	0,00075	$4,3x10^{-51}$	-74,9		0,0469	0,0117	11,0	0,0373	$9,6x10^{-48}$	-64,73	
	0,0509	0,0127	12,1	0,00077	$4,4x10^{-51}$	-74,8		0,0336	0,0084	11,0	0,0267	$6,8x10^{-48}$	-65,46	
	0,0442	0,0111	12,1	0,00075	$4,3x10^{-51}$	-74,9		0,0823	0,0206	19,6	0,0728	$9,1x10^{-49}$	-65,59	
	0,0725	0,0181	17,1	0,00138	$6,2x10^{-52}$	-74,6		0,0801	0,0200	19,6	0,0709	$8,9x10^{-49}$	-65,65	
	0,0751	0,0188	17,1	0,00138	$6,3x10^{-52}$	-74,6		0,0801	0,0200	19,6	0,0709	$8,9x10^{-49}$	-65,65	
	0,135	0,0337	21,7	0,00223	$1,7x10^{-52}$	-74,4		---	---	---	---	---	---	
	0,147	0,0369	21,7	0,00228	$1,7x10^{-52}$	-74,3		---	---	---	---	---	---	

Dadas las estequiometrías ajustadas, las solubilidades de los sólidos considerados están gobernadas por constantes de producto de solubilidad de la forma $K_{s,0} = [M^{2+}]^5 [H_2L^{10-}]$ para los iones +2 y $K_{s,0} = [M^{3+}]^4 [L^{12-}]$ para el Fe^{3+}. El cálculo de estos valores requiere la determinación de la concentración de las especies solubles correspondientes en equilibrio con el sólido. Éstas pueden ser calculadas a través del uso de un programa adecuado para el tratamiento de los datos, ingresando, además de las constantes de equilibrio para las especies solubles ajustadas anteriormente, los valores medidos de concentración total de los componentes del sistema. En la tabla 8.7 se resumen los resultados obtenidos. Todos los valores de $K_{s,0}$ son muy pequeños, por lo que las fases resultan muy poco solubles en las condiciones empleadas. Si se comparan los logaritmos dentro de un mismo medio, las $K_{s,0}$ de los complejos disminuye en el orden Mg > Sr > Ba > Ca > Zn > Fe(III) en $NaClO_4$ y Mg > Ca > Zn > Fe(III) en NMe_4Cl. En ambos casos, el ion magnesio y el ion hierro(III) parecen formar los sólidos de menor y mayor solubilidad respectivamente.

Los valores de $K_{s,0}$ obtenidos fueron validados por una técnica independiente. Se calculó, a partir de ellos, el pH teórico de formación de las distintas fases sólidas (pH_{teo}) en ciertas condiciones experimentales. Luego, los valores de pH_{teo} fueron comparados con el pH de precipitación determinado experimentalmente en las mismas condiciones (pH_{exp}), a través del monitoreo de la absorbancia a 350 nm de soluciones de metal y ligando a distintos valores de pH. Un resultado típico se muestra para el magnesio en las figuras 8.7A y B, junto con la distribución de especies predicha a partir del conjunto de constantes de equilibrio en solución y el valor calculado de $K_{s,0}$.

Como se advierte, la absorbancia se incrementa rápidamente con el agregado de base. Sin embargo, se ha observado para la mayoría de los sistemas un "quiebre" de la curva A *vs*. pH (figura 8.7B). Más aún, este fenómeno, que se repite en el entorno de 0,005 unidades de absorbancia, no se registra entre los resultados del análisis espectroscópico en ausencia de metal (capítulo 6). En el rango de pH en el que esto ocurre, se predice teóricamente para el magnesio el comienzo de la formación del sólido correspondiente (figura 8.7A). Como criterio único para el análisis integral de los sistemas, se tomó entonces el valor A = 0,005 como límite por encima del cual comienzan a operar los procesos de nucleación, que derivan en las partículas que componen los precipitados del

fitato. Estas fases son apreciables a simple vista a valores de pH mayores que los determinados por esta vía.

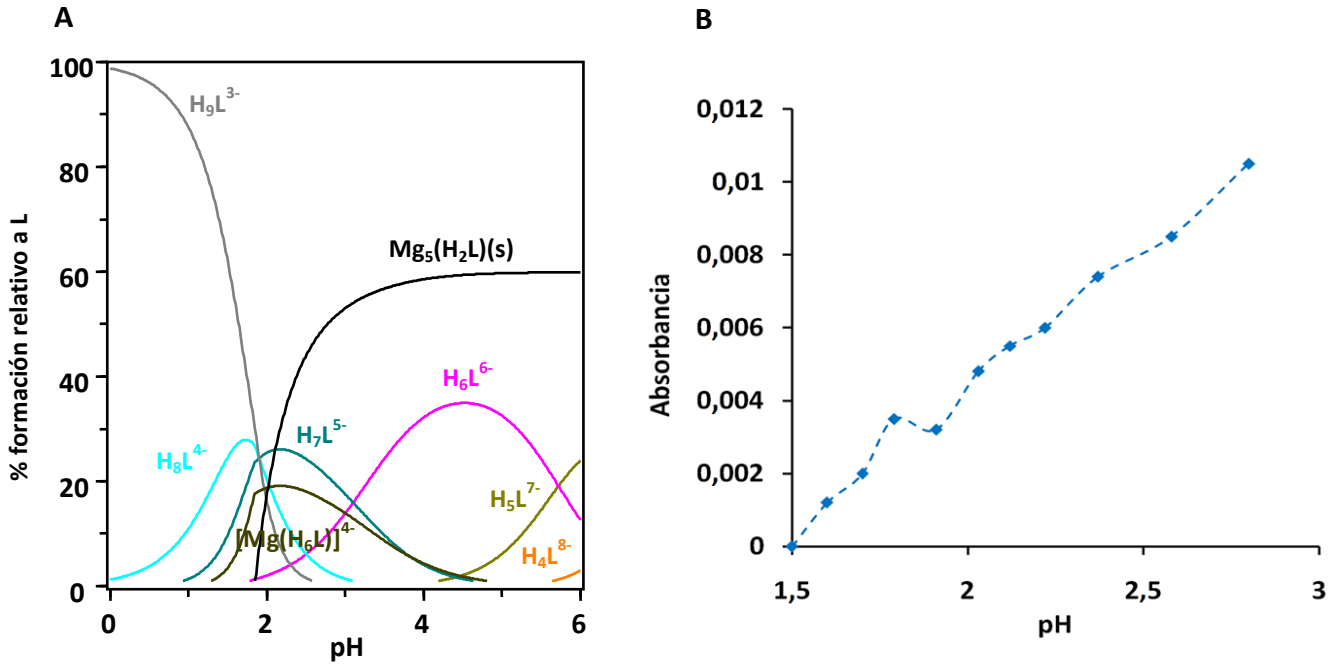


Figura 8.7. (A) Distribución de especies para el sistema InsP_6-Mg, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 10 mM, $[Mg^{2+}]$ = 30 mM). (B) Variación de la absorbancia con el pH, a 350 nm, para las mismas condiciones (referencia: NMe_4Cl 0,15 M). En (A) las aguas de hidratación de la fase sólida se omiten por claridad.

Tabla 8.8. Valores de pH de precipitación experimentales y calculados para algunos de los fitatos sólidos.

	NMe_4Cl 0,15 M, 37,0 °C					$NaClO_4$ 0,15 M, 37,0 °C			
Metal	[M] (mM)	[L] (mM)	pH $_{exp}$ [a]	pH $_{teo}$ [b]		[M] (mM)	[L] (mM)	pH $_{exp}$ [a]	pH $_{teo}$ [b]
Mg	30	10	2,1	1,9		---	---	---	---
Ca	20	10	2,0	1,5		---	---	---	---
Sr	---	---	---	---		20	10	2,1	2,5
Ba	---	---	---	---		20	10	1,8	2,0
Zn	50	10	1,9	0,7		20	10	1,9	1,8
Fe(III)	0,35	0,33	0,1	0,3		0,51	0,48	0,25	1,2

[a] pH al cual la absorbancia medida a 350 nm supera el valor 0,005. [b] pH al cual se predice la formación del fitato correspondiente.

En la tabla 8.8 se detallan, junto con las condiciones empleadas, los valores de pH experimental y teórico para los complejos incluidos en el análisis. El ajuste entre ambos parámetros es satisfactorio, y el apartamiento no supera 1,2 unidades en la escala de pH. Esto da cuenta de la eficiencia de los valores de $K_{s,0}$ obtenidos en la predicción del comportamiento químico del sistema en condiciones cercanas a la saturación.

3.5. Descripción completa del comportamiento del fitato frente a iones +2 y +3 en un medio no interactuante

A partir de la información de la sección anterior y de las constantes de equilibrio de las especies solubles descritas a lo largo de los capítulos precedentes, es posible dar una visión global y cuantitativa del patrón de reactividad química del fitato frente a los iones Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}.

En la figura 8.8 se muestran gráficos en tres dimensiones que representan, para el sistema InsP_6-Mg^{2+}, la variación en el nivel de los complejos solubles y la especie sólida con la concentración de metal y ligando. A pH = 7,5 y para concentraciones fijas de fitato, un aumento de la concentración de metal provoca inicialmente la formación de los complejos 1:1 (figura 8.8A). Con un aumento ulterior, éstos se descomponen progresivamente para dar lugar a la fase sólida, la cual domina la especiación química del sistema desde concentraciones muy bajas de metal (figura 8.8B). Como resultado, en medio neutro el metal y el ligando se predicen, termodinámicamente, formando parte en gran proporción al estado sólido. Si por otra parte se fija la concentración de metal, un incremento en la concentración de InsP_6 produce un aumento significativo en la precipitación del complejo sólido, llegando a un máximo para relaciones metal:ligando 5:1. A partir de este punto, el sólido se redisuelve sólo levemente, lo que provoca una modesta suba en la concentración de los complejos solubles.

Al disminuir el pH, los resultados cambian sensiblemente. Dado que el sólido contiene al ligando en un estado de protonación bajo (H_2L^{10-}), el aumento en la concentración hidrogeniónica provoca la protonación del fitato, disminuyendo apreciablemente el nivel de esta forma, y restringiendo las condiciones de

formación del sólido en favor de los complejos solubles de mayor grado de protonación (figuras 8.8C y D).

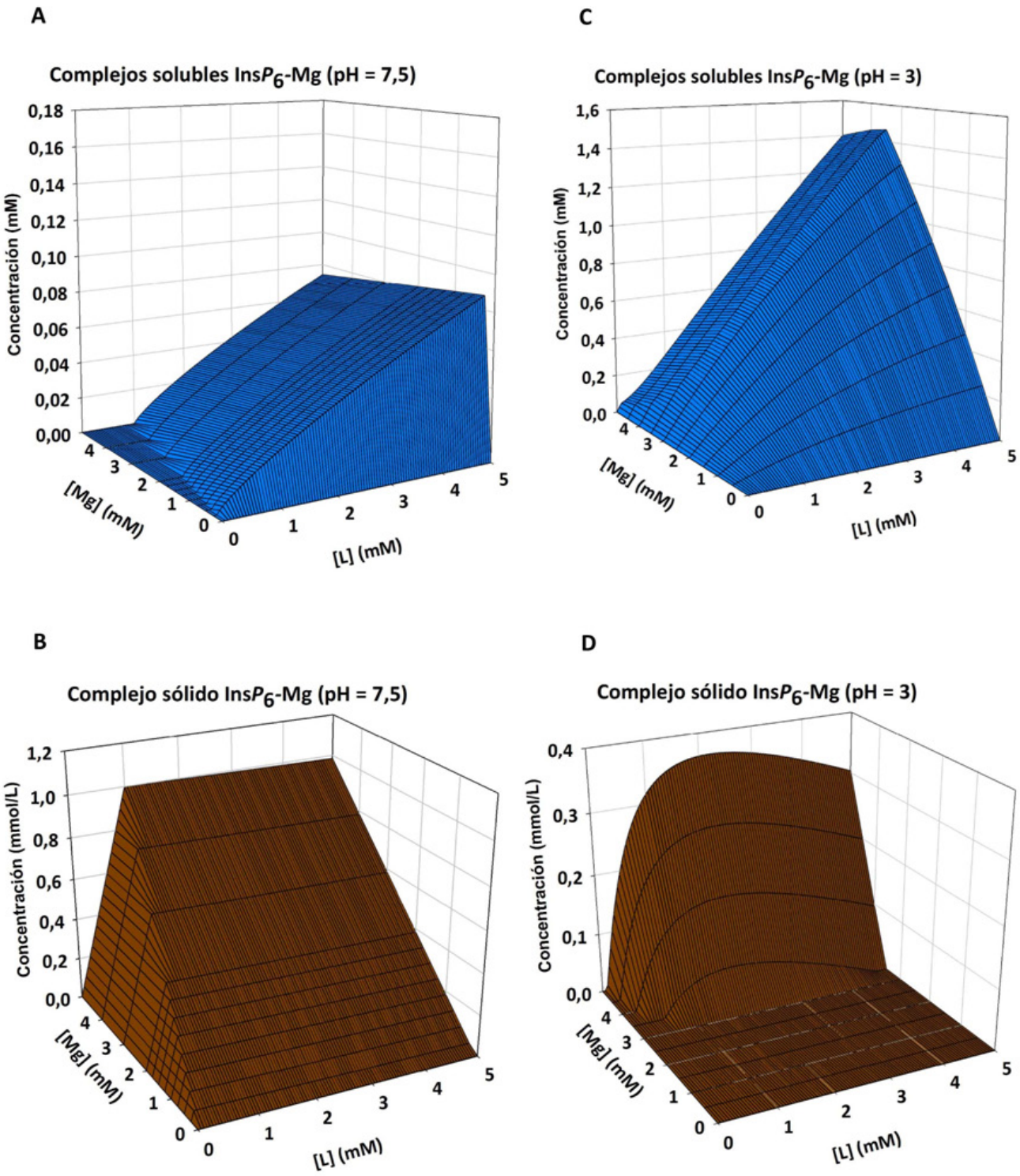


Figura 8.8 Comportamiento del InsP_6 frente al ion Mg^{2+}. Los gráficos muestran la concentración calculada para los complejos solubles (A y C) y el fitato de magnesio sólido (B y D) a pH 7,5 (A y B) y 3 (C y D). Las predicciones son válidas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

Para concentraciones fijas de ligando a pH = 3, la formación de los complejos 1:1 se ve favorecida en todo el rango de concentraciones de metal ensayado, llegando a un máximo para relaciones molares metal:ligando cercanas a 1:1 (figura 8.8C). Por encima de [Mg] = 3 mM, la formación leve del precipitado provoca una disminución en el nivel de los complejos solubles, y el metal se reparte entonces entre las fases sólida y acuosa (figura 8.8D).

Estos resultados enfatizan el comportamiento químico dual del fitato frente al ion magnesio. En efecto, el ion metálico y el ligando se involucran en múltiples equilibrios en solución (protonación y complejación) y de precipitación, caracterizados por las constantes de equilibrio determinadas, los cuales modulan de forma compleja la solubilidad del sistema. Dependiendo del pH y la concentración de ligando y metal, es posible optimizar la complejación en solución o, por el contrario, la captación metálica al estado sólido. En términos generales, un aumento de pH favorecerá termodinámicamente la precipitación de la fase sólida, mientras que en medio ácido los complejos 1:1 serán preferentes. Relaciones ligando:metal menores a la unidad incrementarán la solubilidad del sistema por formación de complejos solubles, a la vez que un exceso de ion metálico motivará la precipitación parcial o total del sólido $Mg_5(H_2L)\cdot 22H_2O$.

Este prototipo general de reactividad química se repite en presencia de los iones Ca^{2+} y Zn^{2+}. Sin embargo, dado que existen diferencias en los modelos de especies químicas ajustados y en los valores de constantes de equilibrio correspondientes, las condiciones de predominancia de las especies solubles e insolubles cambian. En las figuras 8.9A, B y C se muestran los diagramas de distribución de especies para los iones +2 considerados, para relación 2:1 ligando:metal. El ion magnesio es, como se discutió anteriormente, el ion metálico que da lugar al sistema menos insoluble. Esto se relaciona con una característica ya mencionada en el capítulo 5: la capacidad de formación de especies complejas solubles 1:1, estables en un amplio rango de pH. Estas compiten con el sólido en medio neutro, pero hacia los extremos de la escala de pH controlan la predominancia del mismo.

Por su parte, el ion calcio provoca la formación del complejo sólido de estequiometría 5:1 metal:ligando a pH tan bajo como 3, marcando una menor

solubilidad. Dado que además carece de complejos 1:1 suficientemente estables, el metal se predice completamente precipitado hasta pH = 9.

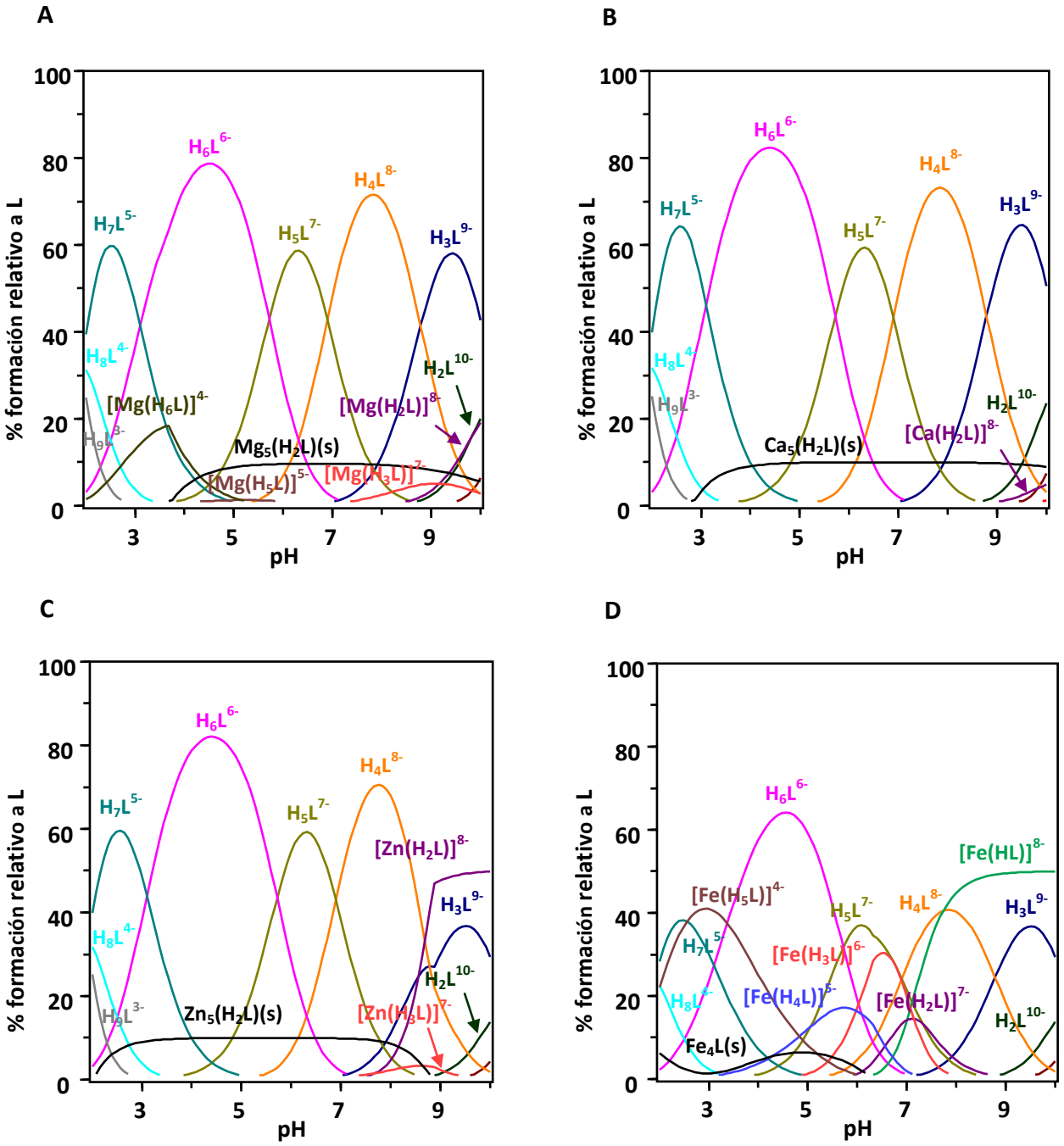


Figura 8.9. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(II)/M(III), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 2 mM, [M] = 1 mM). M = Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Zn^{2+} (C) y Fe^{3+} (D). Las aguas de hidratación de las fases sólidas se omiten por claridad.

Finalmente, el ion Zn^{2+} forma el sólido con menor solubilidad, siendo la forma principal del metal por encima de pH = 2,5. Dada la ausencia de especies complejas en alto grado de protonación, el mismo se extiende hasta pH = 8, donde se redisuelve por formación de los complejos $[Zn(H_3L)]^{7-}$ y $[Zn(H_2L)]^{8-}$, muy estables.

Para ambos cationes, Zn^{2+} y Ca^{2+}, sus especies sólidas poseen una solubilidad intrínseca muy baja, por lo que sus complejos solubles compiten por el metal en forma menos favorable que lo revisado para el ion magnesio. Para poder generar sistemas solubles, es necesario en ambos casos fijar un pH muy bajo o muy alto y/o establecer concentraciones y relaciones metal:ligando bastante pequeñas.

Si se extrapola la tendencia observada al pasar de iones M^{+} (sistemas solubles) a iones M^{2+} (sistemas muy poco solubles), se puede inferir que el aumento de una unidad en la carga del centro metálico, desde M^{2+} a M^{3+}, daría lugar a sistemas extremadamente insolubles, en donde el fitato sólido dominaría la especiación en la gran mayoría de las condiciones. Sin embargo, esto no es lo que ocurre. En la figura 8.10 se muestra el comportamiento del InsP_6 frente al ion Fe^{3+}, según se predice con los datos termodinámicos recabados en este trabajo. En contraposición a lo discutido hasta aquí, en medio neutro y para relaciones ligando:metal mayores a la unidad, el sistema se encuentra por debajo de la saturación. Esto ocurre porque el aumento en la carga del catión provoca, asimismo, una estabilización muy importante de los complejos solubles, lo que en el balance total motiva un incremento de la solubilidad del sistema.

Para concentraciones fijas de metal, el sólido se ve favorecido con un aumento de la concentración de fitato hasta llegar a un máximo a relaciones molares 4:1 metal:ligando, de acuerdo con la estequiometría ajustada para esta fase. Un aumento subsiguiente en la concentración de ligando provoca la redisolución del sólido por formación de los complejos solubles. A medida que disminuye el pH, aumenta el rango de condiciones donde se predice la existencia de la fase sólida, debido, como se muestra en la figura 8.9D, a que la misma es predominante mayoritariamente en el rango ácido. La causa de este fenómeno subyace en la enorme estabilidad del complejo $[Fe(HL)]^{8-}$, el cual compite muy eficientemente por el metal y lo mantiene en solución hasta pH ≈ 11, donde,

como se analizó en el capítulo 5, comienzan a predominar las especies hidrolizadas propias del hierro (III).

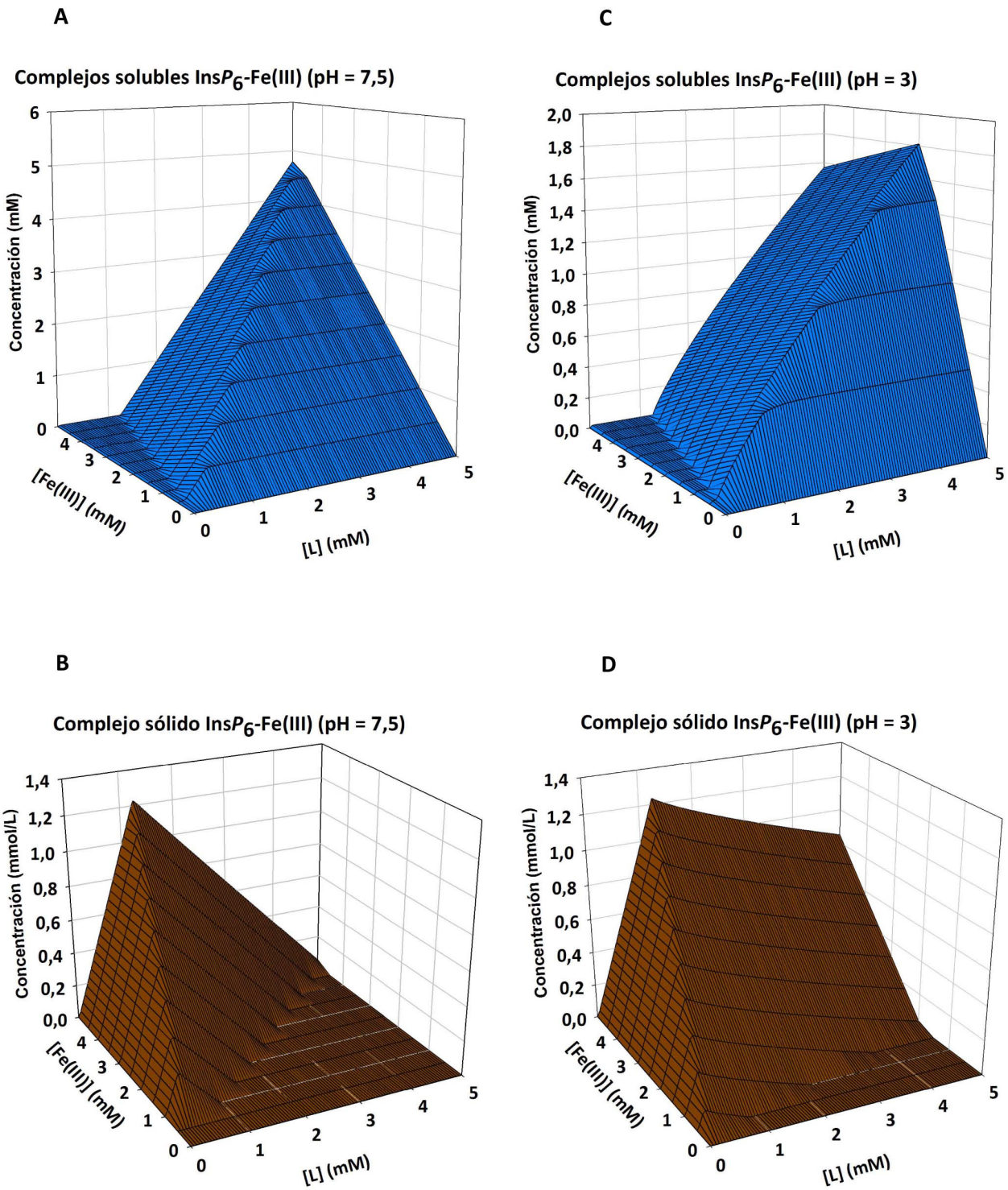


Figura 8.10 Comportamiento del InsP_6 frente al ion Fe^{3+}. Los gráficos muestran la concentración calculada para los complejos solubles (A y C) y el fitato de hierro(III) sólido (B y D) a pH 7,5 (A y B) y 3 (C y D). Las predicciones son válidas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

En concordancia con lo discutido para el magnesio, si se fija la concentración de ligando, un aumento en la concentración de metal da prioridad inicialmente a la formación de los complejos solubles. Éstos desaparecen progresivamente con un aumento extra en la concentración de metal, dando paso a la fase sólida estable a altas relaciones metal:ligando.

Las especies solubles polimetálicas merecen un comentario aparte. La máxima concentración que pueden alcanzar en solución está fijada, en cada sistema, por los valores de $K_{s,0}$ y su constante de formación respecto de la especie del ligando en el mismo estado de protonación. Para el calcio, esta concentración resultó muy pequeña para ser determinada, mientras que para el magnesio, cinc e hierro(III) los valores son muy pequeños: 0,0013 pM, 0,08 pM y 15,8 µM respectivamente.

3.6. Reactividad del fitato frente a iones +2 y +3 en presencia de Na^+

El comportamiento químico del fitato en presencia de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} fue descrito de forma completa en presencia de concentraciones fisiológicas de ion sodio previo a esta tesis[20,21]. En este trabajo se expande el análisis hacia otros sistemas conteniendo Sr^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}. En la figura 8.11 se describe la distribución de especies para los iones alcalinotérreos y el fitato, en presencia de un leve exceso de ligando, en $NaClO_4$ 0,15 M a 37,0 °C. Excepto en presencia de magnesio, el resto de los sistemas muestran la formación del sólido correspondiente dentro del rango de pH de estudio. En efecto, mientras que para el ion Mg^{2+} sólo se detectan especies solubles, el rango en el cual se extiende la fase sólida crece al bajar en el grupo, desde Ca^{2+} a Ba^{2+}.

En el caso de los iones cinc e hierro(III), los resultados son bien diferentes (figuras 8.12A y B). Mientras que el primero da lugar sólo a especies solubles (al igual que el ion Mg^{2+}), el segundo forma el complejo $Fe_4L{\cdot}22H_2O(s)$ por debajo de pH = 5. A valores de pH mayores, se detecta la forma $[Fe(H_3L)]^{6-}$, la cual se descompone en medio neutro para dejar paso a las especies hidroxiladas del metal.

En suma, la solubilidad de los sistemas en estas condiciones y desde medio ácido parece seguir el orden Mg ≈ Zn > Ca > Sr > Ba > Fe(III). Esta tendencia no es evidente a partir de los valores de $K_{s,0}$ ajustados. La solubilidad aparente, en

efecto, es el resultado de la interacción compleja entre la solubilidad de los sólidos ($K_{s,0}$) y los varios equilibrios de protonación y complejación establecidos en solución.

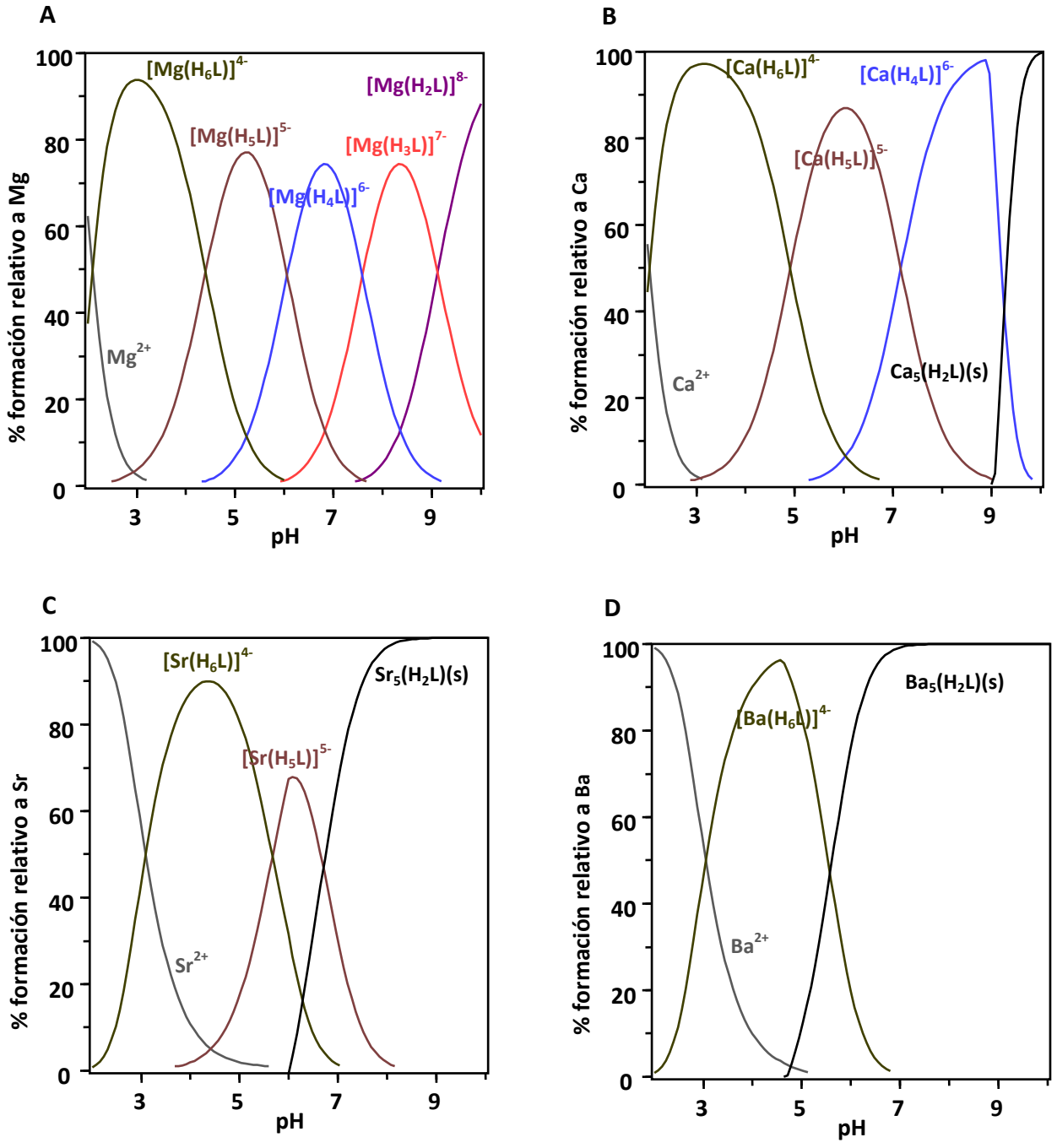


Figura 8.11. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(II), en $NaClO_4$ 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1,5 mM, [M] = 1 mM). M = Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Sr^{2+} (C) y Ba^{2+} (D). Las aguas de hidratación de las fases sólidas se omiten por claridad.

A partir de esta información es posible calcular el valor límite de concentración de los complejos polinucleares en equilibrio con el sólido. Al igual que en NMe_4Cl, el ion calcio da lugar a una especie neutra soluble de concentración demasiado baja para ser detectada. En el caso de los iones Mg^{2+}, Sr^{2+} y Ba^{2+}, los valores calculados son 49 µM[21], 25 pM y 8 pM. En este sentido, los complejos pentametálicos de estos dos últimos cationes se encuentran en una situación intermedia entre el comportamiento del ion magnesio y el del calcio.

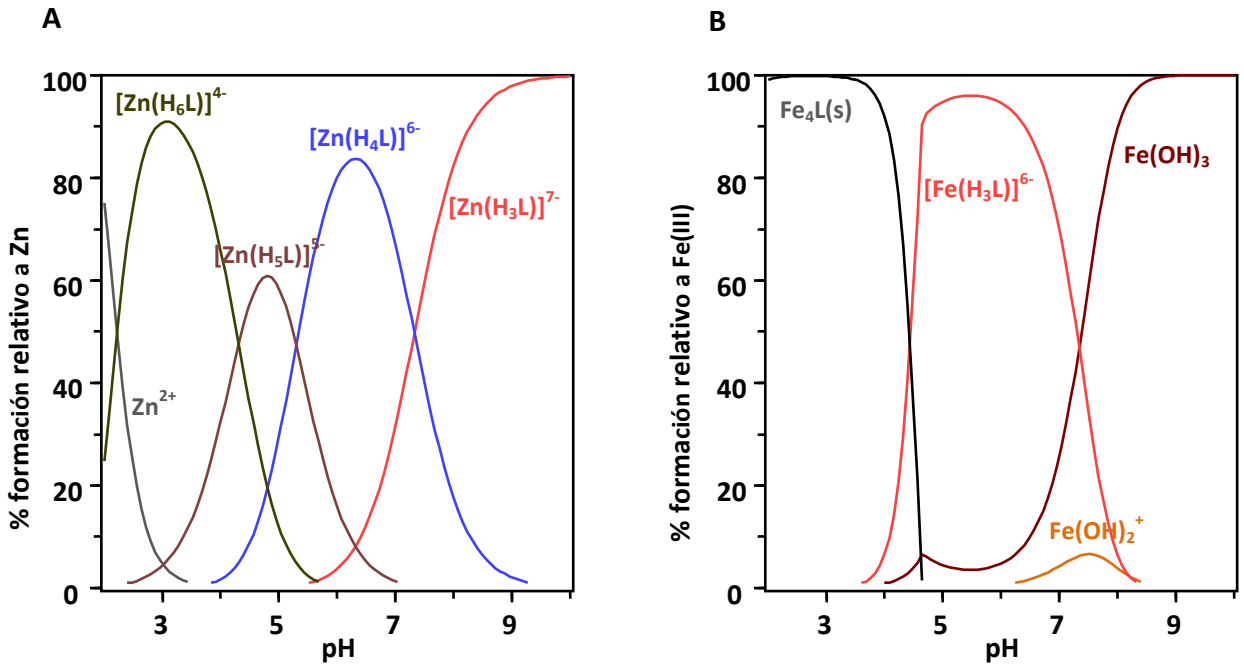


Figura 8.12. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-Zn^{2+}/Fe^{3+}, en $NaClO_4$ 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1,5 mM, [M] = 1 mM). M = Zn^{2+} (A) y Fe^{3+} (B). Las aguas de hidratación de la fase sólida del hierro(III) se omiten por claridad.

Un aspecto muy interesante y con consecuencias que incluyen a diversos sistemas biológicos es la alteración de la distribución y predominancia de las especies complejas del fitato en ausencia y presencia de sodio. En líneas generales, la presencia en exceso de ion alcalino aumenta sustancialmente la solubilidad del sistema. Si se comparan las figuras 8.9A a C con las 8.11A y B y 8.12A, se advierte que a 1 mM de metal en medio neutro, en ausencia de ion sodio y [InsP_6] = 2 mM los iones Mg^{2+}, Ca^{2+} y Zn^{2+} se encuentran precipitados completamente, mientras que en $NaClO_4$ 0,15 M y [InsP_6] = 1,5 mM todos ellos permanecen totalmente en solución. En el caso del hierro(III) este fenómeno es

menos marcado; en un amplio rango de condiciones los resultados son similares. Específicamente para concentraciones 1 mM de ligando y metal, en NMe_4Cl 0,15 M se predice precipitado hasta pH = 6, mientras que en $NaClO_4$ 0,15 M lo hace hasta pH = 5.

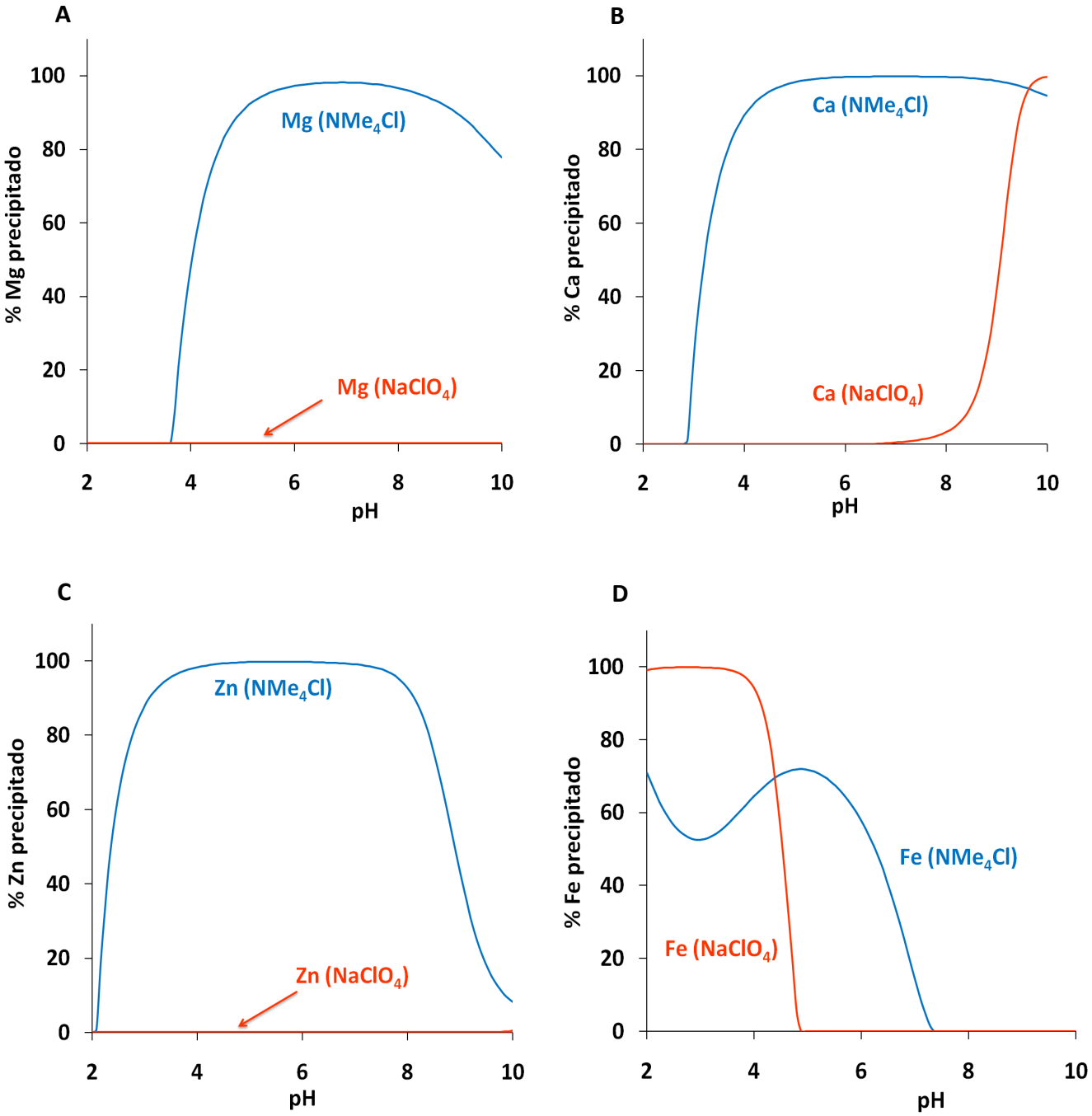


Figura 8.13. Porcentaje de Mg (A), Ca (B), Zn (C) y Fe(III) (D) precipitado en presencia de InsP_6 en función del pH. Las predicciones son válidas en $NaClO_4$ y NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, para concentraciones 1 mM de ligando y metal.

Este efecto es pronunciado en condiciones cercanas a la saturación del sistema y no se restringe a pH cercanos a la neutralidad. En la figura 8.13 se grafica el porcentaje de metal precipitado en función del pH para concentraciones 1 mM de ligando y metal. Para los iones +2 analizados, las curvas en NMe_4Cl superan ampliamente a las correspondientes a $NaClO_4$ entre pH 4 y 9. Para el hierro(III), en un medio no interactuante, la especie $[Fe(H_5L)]^{4-}$ es bastante estable para solubilizar parte del precipitado en medio ácido, mientras que en presencia de exceso de ion sodio el complejo $[Fe(H_3L)]^{6-}$ solubiliza completamente el sólido por encima de pH = 5.

Este comportamiento particular del fitato es probable que encuentre origen en dos aspectos. En primer lugar, según los resultados presentados en este capítulo, los complejos sólidos "puros" forman mezclas en presencia de exceso de ion alcalino, posiblemente por la inclusión de sales simples como cloruros de sodio o potasio. Es posible que este tipo de impurezas provoque un aumento leve en la solubilidad aparente de la fase, aportando al incremento observado de la solubilidad del sistema. En segundo lugar, como se discutió en el capítulo 5, la formación de complejos mixtos Na^+-$M^{2+/3+}$-InsP_6 provoca un incremento significativo en las estabilidades de las especies complejas. Es factible que, en $NaClO_4$, los complejos compitan con los sólidos de forma más favorable, reteniendo en solución al metal y al ligando en un mayor rango de condiciones experimentales.

3.7. Limitaciones del modelo termodinámico

Para finalizar este capítulo es necesario realizar algunas breves precisiones respecto del alcance y las limitaciones de los modelos propuestos. Dadas las pruebas experimentales presentadas hasta aquí, los datos termodinámicos determinados en este trabajo describen satisfactoriamente el comportamiento químico del fitato en diversos entornos. Sin embargo, existen tres determinantes que provocan un ligero apartamiento entre la conducta predicha y aquella verificada experimentalmente en condiciones cercanas a la saturación del sistema. Como un ejemplo de esto, en el capítulo 5 se presentó un análisis de la capacidad complejante del InsP_6 frente a diversos metales +1, +2 y +3, para concentraciones de ligando y metal que aseguraban, según se verificó experimentalmente, la completa solubilidad del sistema entre pH 2 y

10. No obstante, en condiciones similares, la figura 8.9 predice la precipitación de algunos de los iones +2 considerados.

Como primer factor, es necesario tener en cuenta los errores relativos, siempre presentes, en la determinación de las constantes de equilibrio. Este aspecto es más importante en los valores de $K_{s,0}$, los cuales poseen magnitudes menores que 1×10^{-30}. En segundo lugar, el estudio realizado es estrictamente termodinámico, mediante la caracterización del grado de avance de los diversos equilibrios establecidos. Experimentalmente se comprueba que existen, de hecho, factores cinéticos no despreciables asociados a los procesos de precipitación y redisolución de las fases sólidas. En particular, es posible generar una solución con concentraciones de ligando y metal apenas por encima del punto de saturación del sólido correspondiente, pero que el mismo no se haga presente de forma inmediata. Dada la complejidad química de estos sistemas, no es extraño que la nucleación de los sólidos se prediga y detecte, en experimentos donde se varía de forma continua la $[H^+]$, algunas unidades de pH por debajo del correspondiente a la precipitación verificable a simple vista. Por último, dadas las pequeñas concentraciones utilizadas (en el rango milimolar) y el leve exceso aplicado de ligando, en la mayoría de los casos la masa formada de sólido es tan pequeña que en un sistema bajo agitación continua puede pasar fácilmente desapercibida. En efecto, aunque el ion metálico se predice completamente precipitado, la cantidad de sólido formado en las figuras 8.9A a C es menor a 5 mg por cada 20 mL de solución.

4. Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados del estudio químico-estructural de los procesos de precipitación del InsP_6, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas.

El fitato forma con los iones +2 y +3 sales muy insolubles, amorfas y con un alto grado de hidratación. Las fórmulas corresponden, en la mayoría de los casos, a complejos del tipo $M_5(H_2L)\cdot xH_2O$. Los iones Cu^{2+}, Fe^{3+} y Al^{3+} constituyen excepciones a la tendencia general, dando lugar a fases de estequiometría $Cu_6L\cdot 14H_2O$, $Fe_4L\cdot 22H_2O$ y $Al_3(H_3L)\cdot 20H_2O$, respectivamente. Entre 12 y 15 moléculas de agua se liberan fácilmente con un aumento de temperatura entre

50 y 100 °C. Los resultados sugieren que existen no más de dos moléculas de agua coordinadas a cada centro metálico. La presencia de aguas de cristalización asociadas de forma endeble origina que el nivel de hidratación de los complejos, y por tanto su composición química, varíen significativamente con el nivel de humedad del medio.

La técnica de espectroscopía infrarroja evidenció la existencia de gran cantidad de aguas de hidratación en distintos entornos, y un patrón de coordinación M-O-P, donde el grupo fosfato actúa de forma bidentada. Por su parte, los espectros Raman de los complejos con iones alcalinotérreos han demostrado que el fitato no se encuentra en una conformación fija y definida al estado sólido, sino probablemente en una mezcla de ambos confórmeros o en una conformación distorsionada intermedia.

Se sintetizaron complejos mixtos del fitato con los iones +1 y +2 que más comúnmente componen las fitinas, ensayando diversas relaciones metal:ligando que abarcaron, incluso, concentraciones fisiológicas de ion Na^+ o K^+. Ninguno de los compuestos obtenidos pudo ser asignado a una fórmula definida. La repetición de las síntesis en las mismas condiciones, o la evaporación (parcial o a sequedad) de los sobrenadantes de las mismas, dio lugar a la formación de sólidos con contenidos en C, H, metal y K significativamente distintos entre sí y no ajustables a una estequiometría mixta específica. Los espectros infrarrojos asociados a estos compuestos concuerdan con el correspondiente al fitato del ion M^{2+}, mientras que su redisolución muestra una disminución marcada en el contenido de ion alcalino, pruebas que, junto con la evidencia anterior, están de acuerdo con una mezcla al estado sólido entre el fitato del metal +2 y una sal del ion sodio o potasio.

Se determinaron los valores de las constantes de producto de solubilidad para algunos de los fitatos sólidos. La solubilidad de los complejos disminuye en el orden Mg > Sr > Ba > Ca > Zn > Fe(III) en $NaClO_4$ y Mg > Ca > Zn > Fe(III) en NMe_4Cl. A partir de esta información y las constantes de equilibrio de las especies solubles fue posible dar una visión global y cuantitativa del patrón de reactividad química del fitato frente a Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}. Los resultados destacan el comportamiento químico dual del InsP_6, entre la presencia de complejos solubles y la fase sólida correspondiente. En términos generales, para los iones +2 un aumento de pH favorece la precipitación de la fase sólida,

mientras que en medio ácido los complejos 1:1 son predominantes. Relaciones ligando:metal menores a la unidad incrementan la solubilidad del sistema, a la vez que un exceso de ion metálico motiva la precipitación parcial o total del complejo sólido $M_5(H_2L)\cdot xH_2O$. El ion Fe^{3+}, en medio neutro y para relaciones ligando:metal mayores a la unidad, da lugar a un sistema completamente soluble de especies 1:1 muy estables. A medida que disminuye el pH la fase sólida precipita en el sistema, y el rango de condiciones donde la misma es predominante aumenta progresivamente con un incremento en la relación ligando:metal.

En este trabajo se extendió el análisis fisicoquímico anterior, en presencia de concentraciones fisiológicas de ion sodio, hacia sistemas conteniendo Sr^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}. El rango en el cual predomina la fase sólida crece al bajar en la familia de los alcalinotérreos y la solubilidad de los sistemas desde medio ácido sigue el orden Mg ≈ Zn > Ca > Sr > Ba > Fe(III). En líneas generales, en exceso de ion alcalino la solubilidad del sistema se incrementa significativamente. Este comportamiento se origina, probablemente, en la leve variación en la solubilidad de los fitatos debido a impurezas de alguna sal simple de Na^+, además de la formación de especies mixtas Na^+-$M^{2+/3+}$-InsP_6 que aumentan la capacidad secuestrante del ligando en medio acuoso.

5. Referencias bibliográficas

1. Champagne, E. T.; Fisher, M. S. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 217-223.
2. Champagne, E. T.; Fisher, M. S.; Hinojosa, O. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *38*, 199-215.
3. Champagne, E. T. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *31*, 29-42.
4. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *29*, 241-248.
5. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987,** *30*, 101-119.
6. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *28*, 39-55.
7. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *26*, 169-183.
8. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1988,** *32*, 259-268.
9. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1992,** *45*, 105-113.
10. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1991,** *41*, 245-252.
11. Nash, K. L.; Jensen, M. P.; Schmidt, M. A. *Journal of Alloys and Compounds* **1998,** *271-273*, 257-261.
12. Evans, W. J.; Pierce, A. G. *Journal of Food Science* **1982,** *47*, 1014-1015.
13. Martin, C. J.; Evans, W. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *27*, 17-30.
14. Grynspan, F.; Cheryan, M. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1983,** *60*, 1761-1764.
15. Evans, W. J.; Pierce, A. G. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1981,** *58*, 850-851.
16. Crea, F.; Crea, P.; de Robertis, A.; Sammartano, S. *Chemical Speciation and Bioavailability* **2004,** *16*, 53-59.
17. De Carli, L.; Schnitzler, E.; Ionashiro, M.; Szpoganicz, B.; Rosso, N. D. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2009,** *20*, 1515-1522.

18. De Carli, L.; Rosso, N. D.; Schnitzler, E.; Carneiro, P. I. B. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **2006,** *26*, 19-26.
19. Graf, E. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1983,** *31*, 851-855.
20. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
21. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.
22. Bebot-Brigaud, A.; Dange, G.; Fauconnier, N.; Gérard, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999,** *75*, 71-78.
23. Rodrigues-Filho, U. P.; Vaz, J.; Felicissimo, M. P.; Scarpellini, M.; Cardoso, D. R.; Vinhas, R. C. J.; Landers, R.; Schneider, J. F.; McGarvey, B. R.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 1973-1982.
24. Vasca, E.; Materazzi, S.; Caruso, T.; Milano, O.; Fontanella, C.; Manfredi, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002,** *374*, 173-178.
25. Evans, W. J.; Marini, M. A.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1983,** *19*, 129-132.
26. O'Dell, B. L.; De Boland, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1976,** *24*, 804-808.
27. Posternak, S. *Helvetica Chimica Acta* **1921,** *4*, 150-157.
28. Yoo, C. S.; Blank, G.; Pletcher, J.; Sax, M. *Acta Crystallographica Section B* **1974,** *30*, 1983-1987.
29. Spiers, I. D.; Freeman, S.; Schwalbe, C. H. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications* **1995,** 2219-2220.
30. Blank, G. E.; Pletcher, J.; Sax, M. *Acta Crystallographica* **1975,** *B31*, 2584-2592.
31. Blank, G. E.; Pletcher, J.; Sax, M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1971,** *44*, 319-325.
32. Barrientos, L. G.; Murthy, P. P. N. *Carbohydrate Research* **1996,** *296*, 39-54.
33. Mali, G.; Sala, M.; Arcon, I.; Kaucic, V.; Kolar, J. *Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110*, 23060-23067.
34. Ganesan, K.; Epple, M. *New Journal of Chemistry* **2008,** *32*, 1326-1330.
35. Reddy, N. R.; Pierson, M. D.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. *Phytates in Cereals and Legumes;* CRC Press: Boca Raton, FL, 1989.
36. Krebs, N. F. *Journal of Nutrition* **2000,** *130*, 1374S-1377S.
37. Evans, W. J.; Marini, M. A.; Martin, C. J. *Thermochimica Acta* **1983,** *67*, 287-291.
38. Schwarzenwach, G.; Flaschka, H. *Complexometric Titrations;* second ed.; Methuen: London, 1969.
39. Evans, W. J.; Martin, C. J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1988,** *34*, 11-18.
40. Xu, J.; Gilson, D. F. R.; Butler, I. S. *Spectrochimica Acta Part A* **1998,** *54*, 1869-1878.
41. Lien-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Graselli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristics Frequencies of Organic Molecules;* Academic Press, Inc.: California, USA, 1991.
42. Soptrajanov, B. *Journal of Molecular Structure* **2000,** *555*, 21-30.
43. Rajkumar, B. J. M.; Ramakrishnan, V. *Spectrochimica Acta Part A* **2001,** *57*, 247-254.
44. Barlt, F.; Urjasz, H.; Brzezinski, B. *Journal of Molecular Structure* **1998,** *441*, 77-82.
45. Chapman, A. C.; Thirlwell, L. E. *Spectrochimica Acta* **1964,** *20*, 937-947.
46. Youngme, S.; Phuengphai, P.; Chaichit, N.; Pakawatchai, C.; van Alvada, G. A.; Roubeau, O.; Reedijk, J. *Inorganica Chimica Acta* **2004,** *357*, 3603-3612.
47. Stefov, V.; Soptrajanov, B.; Spirovski, F.; Kuzmanovski, I.; Lutz, H. D.; Engelen, B. *Journal of Molecular Structure* **2004,** *689*, 1-10.
48. Isbrandt, L. R.; Oertel, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1980,** *102*, 3144-3148.
49. Yang, H.; Yang, Y.; Yang, Y.; Liu, H.; Zhang, Z.; Shen, G.; Yu, R. *Analytica Chimica Acta* **2005,** *548*, 159-165.

Sección II

myo-inositol(1,3,4,5,6)pentakisfosfato

Capítulo 9

Especiación química del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en solución

En este capítulo se exponen los resultados del estudio potenciométrico de la especiación química del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en ausencia y presencia de iones metálicos +1, +2 y +3, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y temperatura. Se discuten las características ácido-base del ligando y como éstas influyen en la capacidad complejante del mismo. Se evalúan finalmente los aspectos generales de la interacción metal-InsP_5 y su relación con la selectividad y eficiencia relativa de este inositol fosfato como agente secuestrante.

1. Introducción

Luego del fitato, el *myo*-inositol(1,3,4,5,6)pentakisfosfato, (Ins(1,3,4,5,6)P_5, figura 9.1) es el miembro más abundante de la familia de los inositol fosfatos, con concentraciones intracelulares de hasta 50 µM[1-5]. Es un nodo metabólico dentro de la red de reacciones biosintéticas de los sistemas eucarióticos, siendo el precursor directo del fitato y los derivados pirofosforilados del inositol. De hecho, su formación es crítica para la viabilidad de los organismos vivos; ha sido probado que los ratones que carecen de la enzima responsable de la síntesis del Ins(1,3,4,5,6)P_5 mueren tempranamente durante el desarrollo embrionario[6].

En vista de la enorme importancia que posee esta molécula en sistemas biológicos, es sorprendente que aún hoy se carezca de ideas claras sobre sus roles específicos a nivel intracelular. Se ha propuesto una serie inconexa de potenciales funciones relacionadas con los receptores IP_3R [7], la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno[8], la proliferación celular[9,10], la apoptosis[10], el ensamblaje viral[11] y el remodelado de la cromatina [12]. Desafortunadamente, los mecanismos moleculares que subyacen a estas supuestas propiedades, así

como los determinantes químico-estructurales que los modulan, son desconocidos.

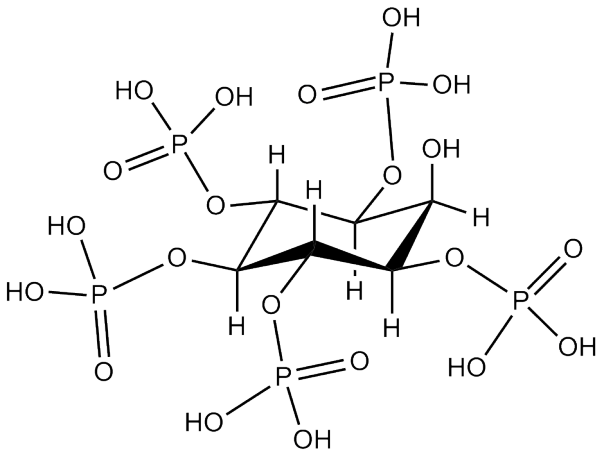


Figura 9.1. Estructura del Ins(1,3,4,5,6)P_5 ($H_{10}L$).

Como se presentara en el capítulo 2, la compleja química de coordinación de los inositol fosfatos se relaciona de manera estrecha con su bioquímica y biología. Respecto del Ins(1,3,4,5,6)P_5, la falta de información tanto química como estructural de los sistemas, en presencia y ausencia de iones metálicos, es importante. Sólo se encuentra en la bibliografía un único reporte sobre sus características ácido-base macro y microscópicas a pH fisiológico (KCl 0,2 M, 37 °C)[13]. No existe, al momento, ningún trabajo publicado concerniente a las propiedades de protonación intrínsecas del ligando o el comportamiento de complejación que exhibe en presencia de iones M(I), M(II) y M(III) relevantes desde el punto de vista biológico.

A la luz de las puntualizaciones anteriores, se exponen a continuación los resultados de la caracterización termodinámica de la química en solución acuosa del Ins(1,3,4,5,6)P_5, en ausencia y presencia de varios iones multivalentes, en un medio no interactuante y en condiciones de fuerza iónica y temperatura similares a las fisiológicas.

2. Parte experimental

Las constantes de protonación y de formación de complejos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con los iones Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+} y Fe^{3+} fueron determinadas en

NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, de acuerdo con las condiciones detalladas en el capítulo 4. Entre 3 y 8 titulaciones fueron llevadas a cabo para cada sistema, entre pH 2 y 11, en un rango de concentraciones de 0,5 a 3 mM para el ligando, 1 a 50 mM para metales alcalinos y 0,5 a 3 mM para metales alcalinotérreos y de transición. En estas condiciones, se cubrieron las relaciones molares Ins(1,3,4,5,6)P_5:M 0,01 a 2 para metales alcalinos y 0,2 a 3 para los otros. Para el ajuste de las constantes de estabilidad de los complejos con Fe(III), las constantes de hidrólisis determinadas en esta tesis fueron tenidas en cuenta en el cálculo. Dado que la sal empleada del Ins(1,3,4,5,6)P_5 contiene 6 moles de ion amonio por cada mol de ligando, la constante de acidez de la especie NH_4^+ fue determinada en las mismas condiciones, a través de la ejecución de tres corridas potenciométricas, utilizando como sal de partida NH_4Cl.

3. Resultados y discusión

3.1. Equilibrios de protonación

El Ins(1,3,4,5,6)P_5 puede ser considerado como un ácido poliprótico que contiene 10 protones ionizables ($H_{10}L$). Los valores ajustados para las constantes globales de protonación del anión L^{10-} se detallan en la tabla 9.1.

Tabla 9.1. Logaritmo de las constantes globales ajustadas para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C (σ = 0,9).

Equilibrio	log $K_{potencio}$ [a]
$L^{10-} + H^+ \leftrightarrow HL^{9-}$	11,62(5)
$L^{10-} + 2\ H^+ \leftrightarrow H_2L^{8-}$	23,02(3)
$L^{10-} + 3\ H^+ \leftrightarrow H_3L^{7-}$	32,39(7)
$L^{10-} + 4\ H^+ \leftrightarrow H_4L^{6-}$	39,81(7)
$L^{10-} + 5\ H^+ \leftrightarrow H_5L^{5-}$	45,2(1)
$L^{10-} + 6\ H^+ \leftrightarrow H_6L^{4-}$	47,8(1)
$L^{10-} + 7\ H^+ \leftrightarrow H_7L^{3-}$	48,9(2)

[a] La constante de acidez del amonio ($NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$, log K = -8,854(5), σ = 0,4) y las constantes de formación de complejos Ins(1,3,4,5,6)P_5-NH_4^+ (tabla 9.2) fueron tomadas en cuenta para el ajuste. Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa.

Fue posible el estudio de las primeras 7 reacciones de protonación; las últimas 3 corresponden a las especies $H_{10}L$, H_9L^- y H_8L^{2-}, las que son extremadamente ácidas (pKa < 1,1) y muy poco predominantes en las condiciones de trabajo. Los valores de log β ajustados siguen el orden esperado y son consistentes con aquellos reportados anteriormente en KCl 0,2 M a 37 °C [13]. El diagrama de distribución de especies para una solución 1 mM de ligando se muestra en la figura 9.2A. En ausencia de iones metálicos, a valores de pH cercanos al fisiológico, las especies predominantes son H_4L^{6-} y H_3L^{7-}.

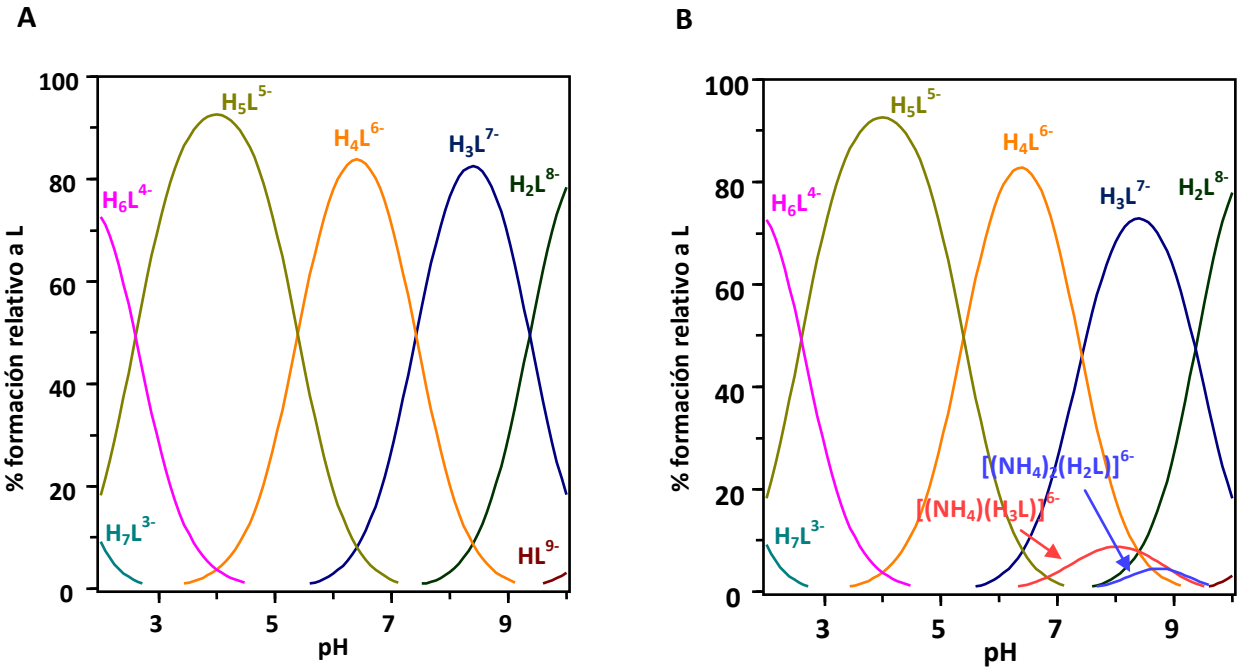


Figura 9.2. Diagramas de distribución de especies para una solución 1 mM de Ins(1,3,4,5,6)P_5 en ausencia (A) y presencia de NH_4^+ (B) ([NH_4^+] = 6 mM), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

La acidez del ion amonio en las mismas condiciones fue asimismo analizada. Para la reacción $NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$, el logaritmo de la constante de equilibrio resultó ser -8,854. Esta información permitió ajustar, además de las constantes de protonación del Ins(1,3,4,5,6)P_5, las constantes de estabilidad de sus especies complejas con amonio. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 9.2. Se detectan tres especies, $[(NH_4)_3(HL)]^{6-}$, $[(NH_4)_2(H_2L)]^{6-}$ y $[(NH_4)(H_3L)]^{6-}$, las cuales se suceden con el pH en orden decreciente del estado de protonación del ligando. Según la distribución de especies del diagrama de la figura 9.2B, para concentraciones en el rango milimolar (similares a aquellas empleadas en

las corridas potenciométricas), la predominancia de estas especies es baja, dando cuenta como máximo, en estas condiciones, de menos del 15 % de las especies conteniendo el ligando.

3.2. Interacción del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con iones alcalinos

Más allá de que en presencia de iones alcalinos se esperan interacciones metal-ligando no demasiado importantes, la descripción de los procesos de complejación para los sistemas conteniendo Na^+ y K^+ es relevante, dado que ambos abundan en sistemas biológicos, encontrándose en gran exceso respecto de este inositol fosfato. Los resultados de la caracterización química de los sistemas en presencia de ambos iones se muestran en la tabla 9.2. Los complejos detectados son todos polinucleares, de fórmula general $[M_i(H_jL)]^{(10-i-j)-}$ con *i:j* = (2:2), (3:1) y (4:0). Los logaritmos de las constantes de estabilidad de las especies detectadas no son grandes en términos absolutos, aunque son apreciables para complejos con iones alcalinos. En efecto, de la misma forma que se discutió para el fitato, la estabilidad de estas especies es comparable con la de los complejos alcalinos de estequiometría 1:1 metal:ligando del EDTA [14].

La estabilidad y nuclearidad de los complejos se reducen a medida que el ligando neutraliza parcialmente su carga por protonación, por lo que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 pierde capacidad complejante a medida que disminuye el pH. Este fenómeno está de acuerdo con un modelo de enlace metal:ligando de carácter mayoritariamente electrostático, como cabría esperar dada la alta carga de las formas del InsP_5 en solución y los pequeños potenciales iónicos de los cationes considerados.

Tabla 9.2. Logaritmo de las constantes de formación de complejos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con cationes +1, +2 y +3, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C[a].

Catión	Equilibrio	log *K* [a]	σ
NH_4^+	$3\ NH_4^+ + HL^{9-} \leftrightarrow [(NH_4)_3(HL)]^{6-}$	8,48(4)	0,4
	$2\ NH_4^+ + H_2L^{8-} \leftrightarrow [(NH_4)_2(H_2L)]^{6-}$	4,38(1)	
	$NH_4^+ + H_3L^{7-} \leftrightarrow [(NH_4)(H_3L)]^{6-}$	1,41(1)	

Na^+	$4\ Na^+ + L^{10-} \leftrightarrow [Na_4L]^{6-}$	7,91(4)	1,0
	$3\ Na^+ + HL^{9-} \leftrightarrow [Na_3(HL)]^{6-}$	5,33(4)	
	$2\ Na^+ + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Na_2(H_2L)]^{6-}$	2,67(5)	
K^+	$4\ K^+ + L^{10-} \leftrightarrow [K_4L]^{6-}$	8,57(5)	0,9
	$3\ K^+ + HL^{9-} \leftrightarrow [K_3(HL)]^{6-}$	5,96(4)	
	$2\ K^+ + H_2L^{8-} \leftrightarrow [K_2(H_2L)]^{6-}$	2,92(6)	
Mg^{2+}	$Mg^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Mg(H_2L)]^{6-}$	4,43(4)	0,5
	$Mg^{2+} + H_3L^{7-} \leftrightarrow [Mg(H_3L)]^{5-}$	3,32(5)	
	$Mg^{2+} + H_4L^{6-} \leftrightarrow [Mg(H_4L)]^{4-}$	2,33(9)	
	$4\ Mg^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Mg_4(H_2L)]$	14,73(5)	
Ca^{2+}	$Ca^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Ca(H_2L)]^{6-}$	4,93(3)	0,4
	$Ca^{2+} + H_3L^{7-} \leftrightarrow [Ca(H_3L)]^{5-}$	3,72(5)	
	$Ca^{2+} + H_4L^{6-} \leftrightarrow [Ca(H_4L)]^{4-}$	2,58(5)	
	$4\ Ca^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Ca_4(H_2L)]$	15,95(4)	
Fe^{2+}	$Fe^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Fe(H_2L)]^{6-}$	5,5(2)	0,2
	$Fe^{2+} + H_3L^{7-} \leftrightarrow [Fe(H_3L)]^{5-}$	4,84(6)	
	$Fe^{2+} + H_4L^{6-} \leftrightarrow [Fe(H_4L)]^{4-}$	3,64(5)	
	$5\ Fe^{2+} + L^{10-} \leftrightarrow [Fe_5L]$	32,9(2)	
Cu^{2+}	$Cu^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Cu(H_2L)]^{6-}$	8,69(7)	0,3
	$Cu^{2+} + H_3L^{7-} \leftrightarrow [Cu(H_3L)]^{5-}$	6,36(6)	
	$Cu^{2+} + H_4L^{6-} \leftrightarrow [Cu(H_4L)]^{4-}$	3,77(8)	
	$5\ Cu^{2+} + L^{10-} \leftrightarrow [Cu_5L]$	37,7(3)	
Fe^{3+}	$Fe^{3+} + HL^{9-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{6-}$	24,86(9)	0,1
	$Fe^{3+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Fe(H_2L)]^{5-}$	19,7(2)	
	$Fe^{3+} + H_3L^{7-} \leftrightarrow [Fe(H_3L)]^{4-}$	14,0(2)	

[a] La constante de acidez del amonio ($NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$, log K = -8,854(5), σ = 0,4) y las constantes de formación de complejos Ins(1,3,4,5,6)P_5-NH_4^+ (mostradas en esta tabla) fueron tomadas en cuenta para el ajuste. Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa.

Por comparación con el InsP_6, la ausencia de un grupo fosfato en C2 y la consecuente pérdida de dos unidades de carga negativa máxima provocan algunos cambios en el conjunto de las especies formadas. Para el Ins(1,3,4,5,6)P_5, se detecta la presencia de una especie compleja a partir del ligando totalmente deprotonado que contiene en su fórmula dos iones M^+ menos ($[M_6L]^{6-}$ para el fitato *vs.* $[M_4L]^{6-}$ para el Ins(1,3,4,5,6)P_5). Asimismo, la forma diprotonada del inositol fosfato es capaz de unir 5 iones alcalinos en el caso del fitato, mientras que sólo 2 para el Ins(1,3,4,5,6)P_5. Como contrapartida, para este último ligando se detecta el complejo $[M_3(HL)]^{6-}$, cuando la especie monoprotonada del fitato no se predice, en las condiciones de trabajo, asociada a sodio o potasio en grado apreciable.

Resulta interesante que las especies complejas del amonio son significativamente más estables que las correspondientes con Na^+ o K^+ (comparar valores para los complejos del tipo $[M_3(HL)]^{6-}$ y $[M_2(H_2L)]^{6-}$ en la tabla 9.2). La causa de este fenómeno está asociada a las características estructurales del catión NH_4^+, el cual no sólo se sentirá atraído hacia el ligando por fuerzas de tipo electrostáticas, sino que además establecerá enlaces de hidrógeno con los grupos ionizables del mismo.

La figura 9.3 muestra el diagrama de distribución de especies para una solución 1 mM de Ins(1,3,4,5,6)P_5 en presencia de concentraciones fisiológicas de Na^+ o K^+. En estas condiciones, las especies metálicas comienzan a ser detectadas por encima de pH = 7. A pH citosólico-nuclear se predice la presencia de los compuestos H_4L^{6-}, H_3L^{7-} y $[M_2(H_2L)]^{6-}$, mientras que el ligando se encuentra completamente asociado al metal sólo por encima de pH = 9. Dado que la estabilidad de las especies no es grande, las mismas sólo tienen existencia significativa a alta concentración de ion metálico y relación metal:ligando. En efecto, para concentraciones 1 mM de ligando e ion alcalino, el porcentaje de inositol fosfato asociado al metal es despreciable (no se muestra). La comparación entre los diagramas de distribución de especies para Na^+ y K^+ revela que la interacción ligando-metal es muy similar en ambos casos. De hecho, el modelo de especies ajustado y los valores de constantes de equilibrio que las caracterizan son prácticamente idénticos.

En condiciones de exceso de catión alcalino, a medida que se aumenta el pH el ligando se deprotona sucesivamente hasta alcanzar la especie H_4L^{6-}, la que

posee menos de un H^+ por cada grupo fosfato. Esta forma del ligando no genera complejos con los iones alcalinos de concentración apreciable como para ser detectados. No obstante, la pérdida de los dos protones siguientes, para dar lugar a las especies H_3L^{7-} y H_2L^{8-}, provoca la formación del complejo $[Na_2(H_2L)]^{6-}$, cuya predominancia se hace máxima a pH = 9, constituyendo más del 60 % del ligando total en solución. Estos hechos sugieren que es necesaria la presencia de al menos dos grupos fosfato completamente deprotonados para una efectiva coordinación metálica. Un aumento ulterior de pH induce la deprotonación de los complejos y la ganancia de más cationes M^+, en un proceso que, al igual que ocurría con el fitato, mantiene constante la carga de la especie.

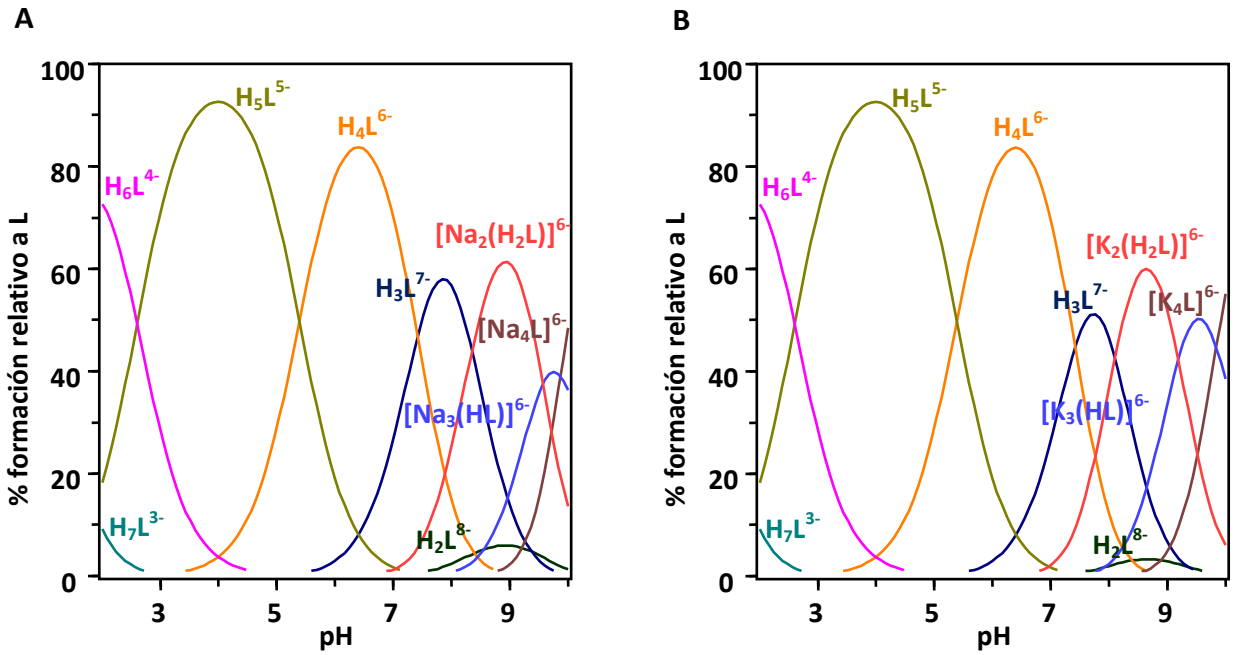


Figura 9.3. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(I), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 150 mM). M = Na^+ (A) y K^+ (B).

3.3. Interacción del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con iones divalentes

En presencia de iones de tipo M^{2+} se detectan para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 los complejos especificados en la tabla 9.2. En contraste con el modelo de los sistemas conteniendo iones alcalinos, la estequiometría de la mayoría de los compuestos es del tipo 1:1 metal:ligando, de fórmula general $[M(H_jL)]^{(10-2-j)-}$ con $2 \le j \le 4$. Se logra, asimismo, la detección de un complejo neutro polimetálico

de tipo $[M_4(H_2L)]$ para Mg(II) y Ca(II) y $[M_5L]$ para Fe(II) y Cu(II). La estabilidad de los complejos 1:1 es significativamente mayor a la encontrada para los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-iones alcalinos. De hecho, como se advierte de la comparación entre los logaritmos de las constantes de formación de las especies $[Mg(H_2L)]^{6-}$ (log K = 4,43) y $[K_2(H_2L)]^{6-}$ (log K = 2,92), el ligando es capaz de unir un sólo ion M^{2+} con mayor avidez que dos iones M^{+}. Además, para un catión divalente dado, la neutralización de la carga de las especies del ligando por protonación provoca una disminución en la estabilidad de los complejos (ver tabla 9.2), lo que da cuenta de la competencia de los iones H^{+} por los grupos ionizables del ligando. Estos aspectos sugieren que la fuerza del enlace metal-ligando es modulada principalmente por el potencial iónico del catión metálico y la carga de las especies presentes del ligando, como parte de un modelo de unión predominantemente electrostático. Todos los complejos formados son, no obstante, menos estables que aquellos 1:1 M(II)-EDTA detectados en condiciones experimentales similares[15].

En la figura 9.4 se muestran los diagramas de distribución de especies construidos para una concentración de metal(II) y ligando de 1 mM. En primera instancia y de forma general, para los cationes M^{2+} estudiados la reactividad ligando-metal es muy similar. Para ambos metales alcalinotérreos, se espera en estas condiciones la formación de complejos 1:1 a partir de pH = 4, los cuales aumentan su predominancia a medida que disminuye su grado de protonación. Aunque este fenómeno es originado en la pérdida progresiva de estabilidad de los complejos a medida que se neutraliza la carga del ligando (tabla 9.2), no se observa en presencia de iones alcalinos (figura 9.3), dado que es contrarrestado por un aumento en la nuclearidad de las especies complejas.

Paralelamente a estos equilibrios de complejación, en estas condiciones se predice para magnesio y calcio la formación de los complejos $[Mg_4(H_2L)]$ y $[Ca_4(H_2L)]$. El rango de pH en donde son detectados se extiende desde pH = 6 hasta pH = 10, y coexisten en solución, mayoritariamente, con los complejos 1:1 di y triprotonados. Su formación implica la asociación de 4 moles de ion metálico por cada mol de ligando involucrado, por lo que aumentan sustancialmente la capacidad secuestrante del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en medio neutro y básico.

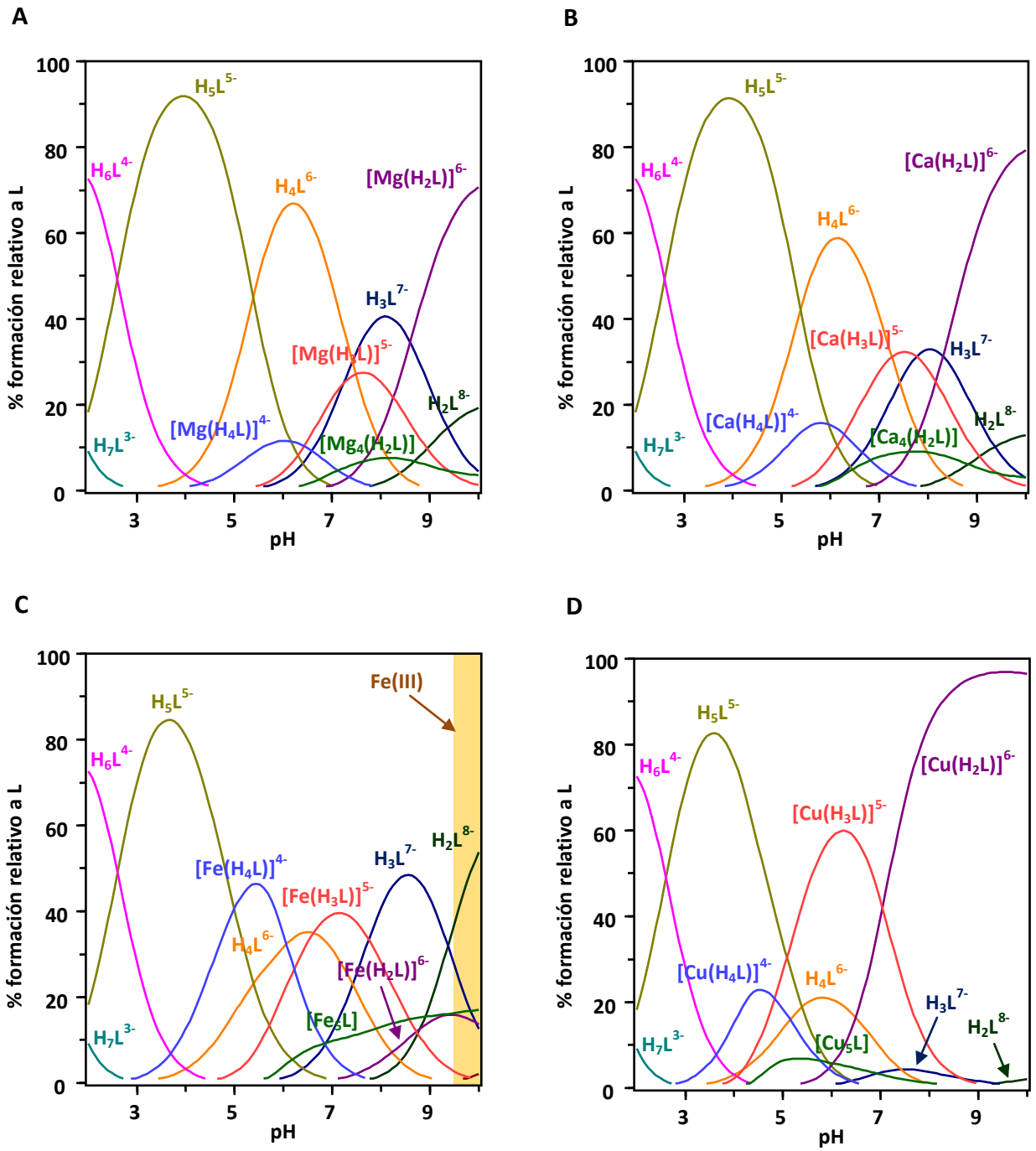


Figura 9.4. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(II), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 1 mM). M = Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Fe^{2+} (C) y Cu^{2+} (D). En (C) se resalta la zona en donde ocurre la oxidación del ion Fe(II).

Por su parte, los iones +2 de transición analizados muestran un comportamiento similar. No obstante, los complejos 1:1 son más estables y su formación se predice a valores de pH por encima de 3. Asimismo, los complejos neutros solubles son ahora pentanucleares. Esto genera dos diferencias respecto al comportamiento registrado para los sistemas conteniendo iones

alcalinotérreos. En primer lugar, la capacidad de asociación al metal que exhibe el ligando se extiende una unidad de pH hacia medio ácido para Cu(II) y Fe(II). Segundo, el ion metálico es secuestrado completamente a partir de pH = 7 para estos últimos, mientras que en el caso de Mg(II) y Ca(II) esto no ocurre en todo el rango de pH incluido en el análisis.

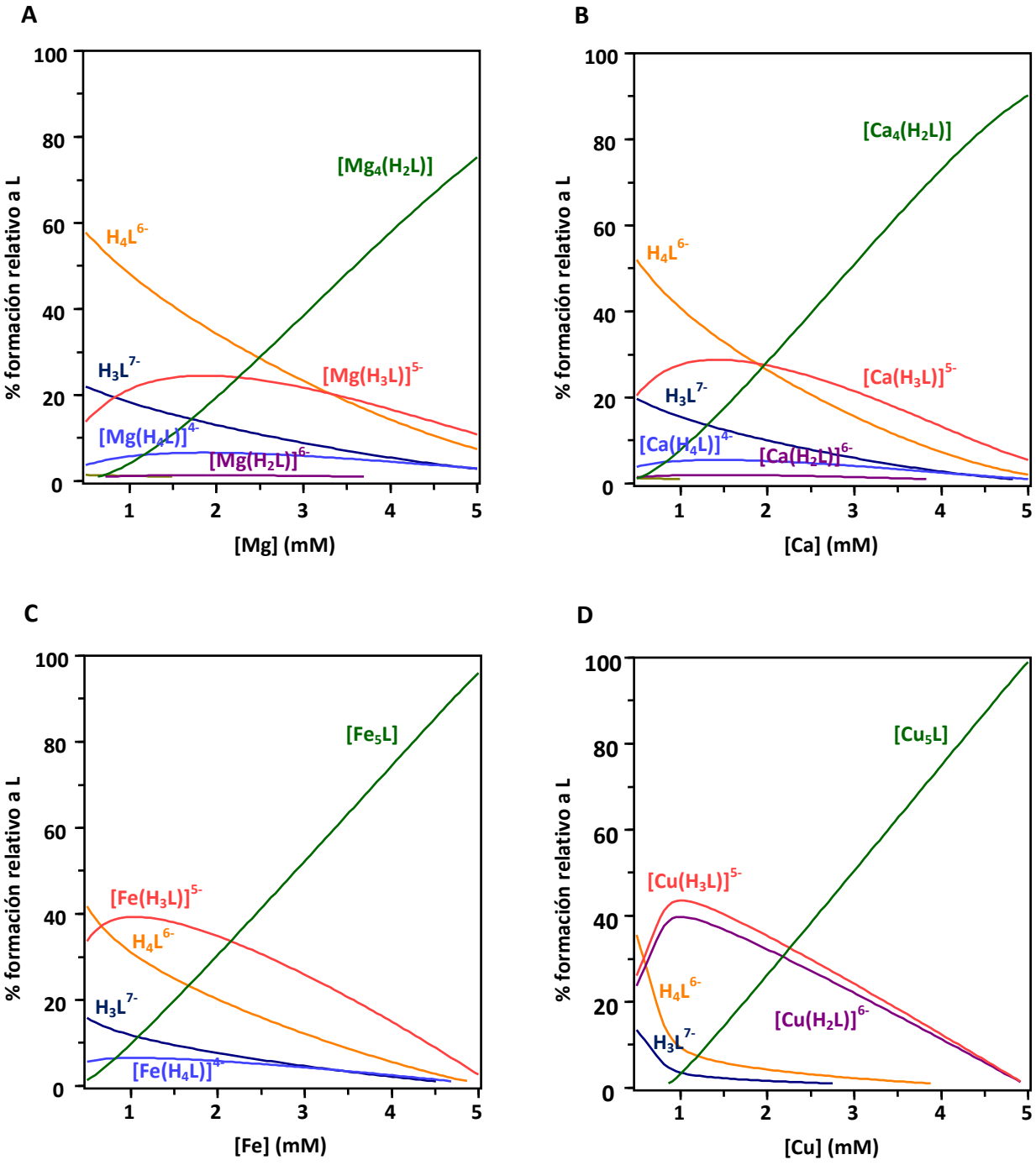


Figura 9.5. Diagramas de distribución de especies para los sistemas InsP_6-M(II), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, pH = 7). M = Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Fe^{2+} (C) y Cu^{2+} (D).

Por comparación de las figuras 9.4C y D se aprecia que la distribución de especies es ligeramente diferente para Fe^{2+} y Cu^{2+}. El primero muestra al metal y ligando involucrados preferentemente en los complejos 1:1 $[Fe(H_4L)]^{4-}$ y $[Fe(H_3L)]^{5-}$ y la especie neutra $[Fe_5L]$. Por el contrario, la predominancia de la forma $[Cu_5L]$ es algo menor y se ha desplazado hacia valores de pH menores. La misma está limitada, en medio básico, por la formación del complejo $[Cu(H_2L)]^{6-}$ muy estable.

Desde un punto de vista termodinámico, la distribución ajustada de las especies muestra que la forma H_5L^{5-} no es capaz de asociarse con cualquiera de los cationes +2 considerados (figura 9.4). En contraposición, la predominancia de las formas tetra y triprotonadas del ligando se ve sustancialmente disminuida, dando lugar en el mismo rango de pH a los complejos metálicos ya analizados. En apariencia, por tanto, para una efectiva interacción metal(II)-Ins(1,3,4,5,6)P_5 es necesaria la presencia de menos de un H^+ por cada grupo fosfato del ligando.

Respecto de los equilibrios establecidos entre especies solubles, el sistema está químicamente caracterizado por dos procesos de complejación diferentes, dando lugar a complejos mono o polinucleares, cuya extensión relativa es dependiente del pH y la relación M/L. En la figura 9.5 se muestran los diagramas de distribución de especies obtenidos en medio neutro, para una concentración de ligando de 1 mM y cantidades variables de M^{2+}. Para relaciones molares M/L menores o iguales a la unidad, la formación de complejos 1:1 se ve termodinámicamente favorecida. De todos los ejemplos, este fenómeno es más acusado en el caso del ion Cu^{2+}, cuyos complejos 1:1 son los más estables dentro de todos los caracterizados. En estas condiciones, los aniones $H_iL^{(10-i)-}$ se unen preferentemente a un solo ion metálico, formando especies $[M(H_iL)]^{(10-2-i)-}$ cuyo grado de protonación varía dependiendo de la concentración hidrogeniónica. Con un aumento subsiguiente de la relación metal:ligando, los complejos mononucleares son rápidamente remplazados por los complejos neutros polinucleares, cuya predominancia varía aproximadamente de forma lineal con la concentración de metal. En línea con lo discutido para el InsP_6, es probable que esta etapa se corresponda con un proceso independiente de coordinación, en donde la unión de un segundo

catión M^{2+} motive un cambio estructural que provoque la unión en conjunto de otros dos (Mg^{2+} y Ca^{2+}) o tres (Fe^{2+} y Cu^{2+}).

Al margen de la evidencia anterior, en condiciones de exceso de metal es probable que ocurra la aparición de fases sólidas muy poco solubles. Como se ha discutido en el capítulo 8 para el fitato, este fenómeno altera de forma significativa la distribución y por tanto la capacidad secuestrante del ligando.

3.4. Interacción del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con Fe^{3+}

Se detectan en este sistema sólo complejos de tipo 1:1 metal:ligando, con estequiometría general $[M(H_jL)]^{(10-3-j)-}$ con $1 \le j \le 3$ (tabla 9.2). En comparación con los iones divalentes analizados, el Fe^{3+} forma con el Ins(1,3,4,5,6)P_5 complejos sustancialmente más estables. Más aún, el complejo $[Fe(HL)]^{6-}$ posee una constante de formación cercana a la reportada para el complejo 1:1 Fe(III)-EDTA (log K = 24,95 a 25°C, I = 0,10 M)[16]. En concordancia con un modelo de interacción predominantemente electrostático, a medida que el ligando se protona la estabilidad de las especies disminuye, debido a la baja en la fuerza de atracción M^{3+} - $H_iL^{(10-i)-}$. En la figura 9.6 se muestra la predominancia de las especies con el pH para soluciones equimolares de ligando y hierro(III).

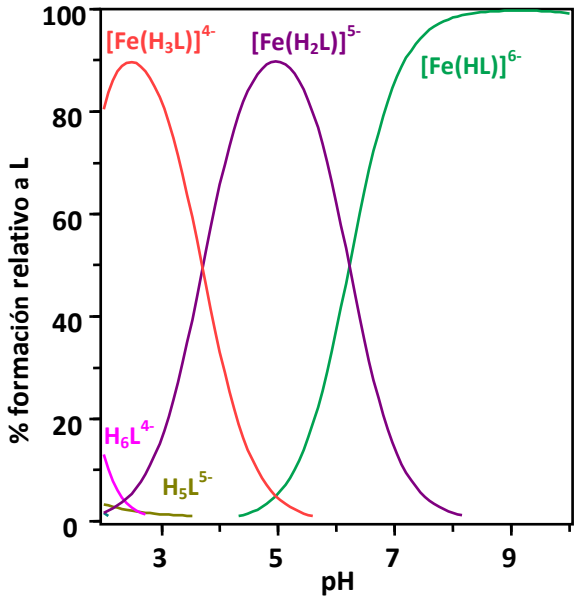


Figura 9.6. Diagrama de distribución de especies para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Fe^{3+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [Fe^{3+}] = 1 mM).

El Ins(1,3,4,5,6)P_5 logra secuestrar completamente al metal en todo el rango de pH de estudio, lo cual revela la gran afinidad que posee por el ion +3. En general, la alta carga del centro metálico da lugar a interacciones metal:ligando muy intensas y con ello un menor grado de protonación del ligando en las especies complejas. Dado que en presencia de cantidades equimolares de este inositol fosfato el hierro se hidroliza a partir de pH = 10, los complejos detectados se extienden hasta el final de la escala en el diagrama. A pH fisiológico, se predice como complejo predominante la especie $[Fe(HL)]^{6-}$.

3.5. Ins(1,3,4,5,6)P_5 como agente secuestrante

En consideración de los datos termodinámicos adquiridos, es posible evaluar la selectividad y la eficiencia relativa del Ins(1,3,4,5,6)P_5 como agente secuestrante de iones metálicos. El desempeño del ligando en este sentido estará determinado, fundamentalmente, por su capacidad quelante y como ésta varía con la naturaleza del ion en consideración, el pH y la relación metal a ligando.

La interacción Ins(1,3,4,5,6)P_5-M^{n+} parece ser dependiente, en primer lugar, de la carga del ion metálico. De esta manera, el ligando interacciona débilmente con los iones alcalinos, moderadamente con los alcalinotérreos y +2 de transición, y fuertemente con el ion Fe^{3+}. Asimismo, mientras que para los iones M^{+} se detectan especies polinucleares predominantes sólo en condiciones de gran exceso de metal, para los iones +2 el comportamiento presenta especies mono y polinucleares cuya predominancia relativa es dependiente del pH y la relación M/L. La presencia de electrones d en los iones divalentes tiene repercusiones en el grado de nuclearidad de los complejos neutros; mientras que la especie $[M_4(H_2L)]$ es detectada para Mg(II) y Ca(II), el complejo $[M_5L]$ se encuentra presente para Fe(II) y Cu(II). El hierro(III), por su parte, da preferencia a complejos del tipo 1:1 metal:ligando extremadamente estables.

Estos detalles de los modelos de especies tienen directa repercusión en la selectividad que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 exhibe frente a los diversos cationes. En la figura 9.7 se muestra la concentración de metal libre en el sistema, en una

solución 2 mM de ligando y 1 mM de metal, donde no se observó experimentalmente la formación de fases sólidas.

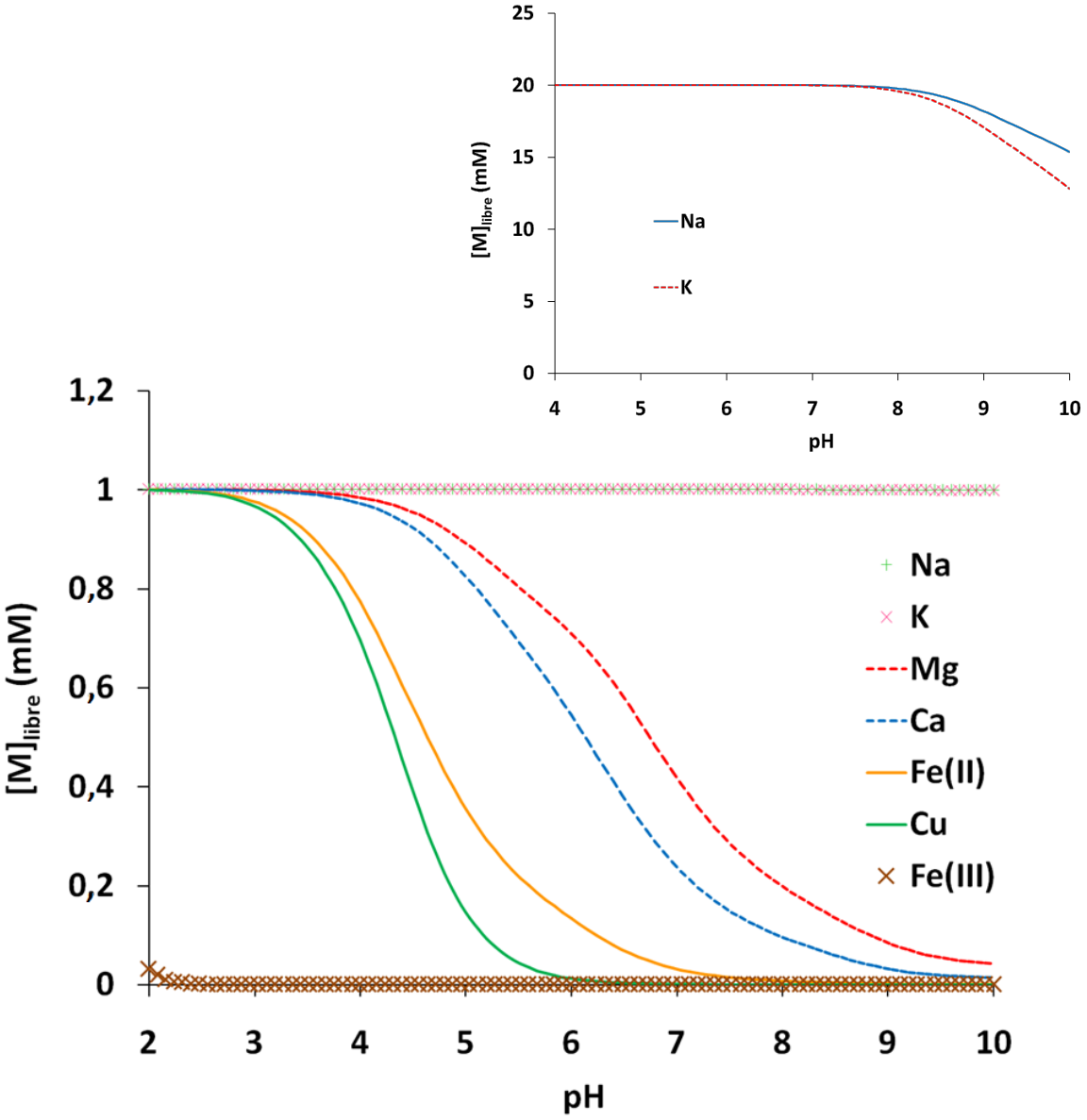


Figura 9.7. Concentración de metal libre en mM para los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-iones +1, +2 y +3, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 2 mM, $[M^{+/2+/3+}]$ = 1 mM). La ausencia de procesos de precipitación fue confirmada experimentalmente en estas condiciones. La figura incrustada corresponde a los resultados obtenidos empleando [L] = $[M^+]$ = 20 mM.

La concentración de Na^+ y K^+ complejada es prácticamente nula en todo el rango de pH abarcado. Esto es consecuencia tanto de la pequeña afinidad ligando-metal, como de la baja capacidad que estos iones monovalentes tienen para competir con el protón por los grupos ionizables. En el gráfico incrustado de la figura, se muestra el mismo parámetro calculado en base a una

concentración de ligando y metal de 20 mM. Incluso a este nivel sólo se observan pequeñas diferencias en la concentración de metal libre a pH > 8, en donde el ligando interacciona siguiendo el orden $Na^+ < K^+$.

Por el contrario, los iones +2 y +3 muestran una mayor capacidad de competencia con los H^+ por los sitios de coordinación. La concentración de metal alcalinotérreo en solución se ve incambiada hasta pH ≈ 4. Dado que en medio ácido las formas protonadas del ligando son incapaces de complejar a estos cationes, la capacidad secuestrante del Ins(1,3,4,5,6)P_5 es nula (figuras 9.4A y B). A partir de este punto, se forman tres complejos 1:1 y un complejo tetrametálico, que asocian de manera progresiva al metal alcalinotérreo en solución (figura 9.7). Como resultado, la capacidad secuestrante del ligando en estas condiciones es máxima a pH por encima de 9 - 10. En el caso de ambos iones +2 de transición, el comportamiento es relativamente similar. Sin embargo, como fue discutido, el aumento en la estabilidad de los complejos 1:1 y el aumento en la nuclearidad de la especie neutra soluble genera algunos cambios en la capacidad secuestrante del ligando. En las mismas condiciones, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 comienza a ser activo frente a la complejación a pH apenas por debajo de 3. Un aumento ulterior de pH desencadena la formación de complejos mono y pentanucleares, los cuales captan con un ligero cambio de pH al ion en solución (figuras 9.4C y D). Dada la diferencia en las estabilidades relativas de los complejos detectados para ambos iones 3*d*, el cobre está completamente unido a pH ≈ 6, mientras que el hierro(II) lo está a pH ≈ 7.

El ion Fe^{3+} interactúa fuertemente con el ligando. En consecuencia, el mismo es secuestrado en un 100 % a partir de pH = 2, y no es liberado hasta el final del rango de pH de estudio. Evaluadas en conjunto, las curvas de la figura 9.7 dejan en evidencia la gran diferencia de estabilidad que existe entre las especies complejas de los cationes con distinta carga, en línea con el modelo de enlace predominantemente electrostático manejado. Mientras que en estas condiciones el ligando es incapaz de asociarse con los iones sodio o potasio, el ion Fe^{3+} se encuentra completamente complejado entre pH 2 y 10. De esta manera, en concentraciones del orden milimolar, el ligando muestra cierta selectividad hacia los diversos iones testeados. En medio neutro, por ejemplo, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se une a los cationes en porcentajes que van desde 0 hasta

100 %: Na^+ (0 %), K^+ (0 %), Mg^{2+} (57 %), Ca^{2+} (75 %), Fe^{2+} (97 %), Cu^{2+} (100 %) y Fe^{3+} (100 %).

Mediante el uso de la información presentada en este y otros capítulos, en adición con datos termodinámicos de bases externas[17], es posible modelar el comportamiento químico del Ins(1,3,4,5,6)P_5 comparativamente con otros ligandos como InsP_6 y EDTA, en presencia de dos de los cationes metálicos analizados, Mg^{2+} y Fe^{3+}. Los resultados se especifican en la figura 9.8, donde se muestran los gráficos de porcentaje de metal libre con el pH para soluciones equimolares de metal y ligando.

Para el ion Mg^{2+}, el porcentaje de metal no complejado varía significativamente con el pH, aunque de forma bastante distinta para los tres ligandos analizados (figura 9.8A). A valores de pH menores a 4, el metal presenta preferencia por el InsP_6, debido fundamentalmente a la formación del complejo $[Mg(H_6L)]^{4-}$, estable en medio ácido. El resto de los ligandos se encuentran en un grado de protonación lo suficientemente alto como para que su capacidad complejante se vea disminuida. Nuevamente, se enfatiza en este contexto la habilidad del fitato de interaccionar con el ion magnesio a altas concentraciones de H^+, lo que, como fue discutido en el capítulo 5, constituye una ventaja trascendente para éste frente al resto de los ligandos considerados. Un aumento de pH por encima de 4 provoca la deprotonación del EDTA, el que forma un complejo de estequiometría 1:1 muy estable. A partir de aquí, este ligando es el que posee el mayor poder secuestrante, complejando totalmente al metal presente por encima de la neutralidad. Es interesante notar que el Ins(1,3,4,5,6)P_5, al igual que el EDTA, no logra unirse al magnesio hasta pH = 4. Sin embargo, la extensión en la cual este fenómeno de asociación ocurre es mucho menos marcado. En consecuencia, el mismo se perfila como el agente secuestrante de menor eficiencia respecto de los ligandos considerados. Esta característica tendrá repercusiones a nivel intracelular, en donde, como será discutido en capítulos posteriores, el Ins(1,3,4,5,6)P_5, a diferencia del fitato, no se predice asociado completamente a magnesio en condiciones citosólico-nucleares.

En presencia de Fe^{3+} el análisis cambia significativamente (figura 9.8B). Desde pH = 2 hasta pH = 10, el EDTA y el fitato son los agentes secuestrantes más eficientes, dando cuenta de prácticamente el 100 % de metal complejado. Por

encima de pH = 8, el fitato libera una mínima parte del ion metálico por competencia con los procesos de hidrólisis.

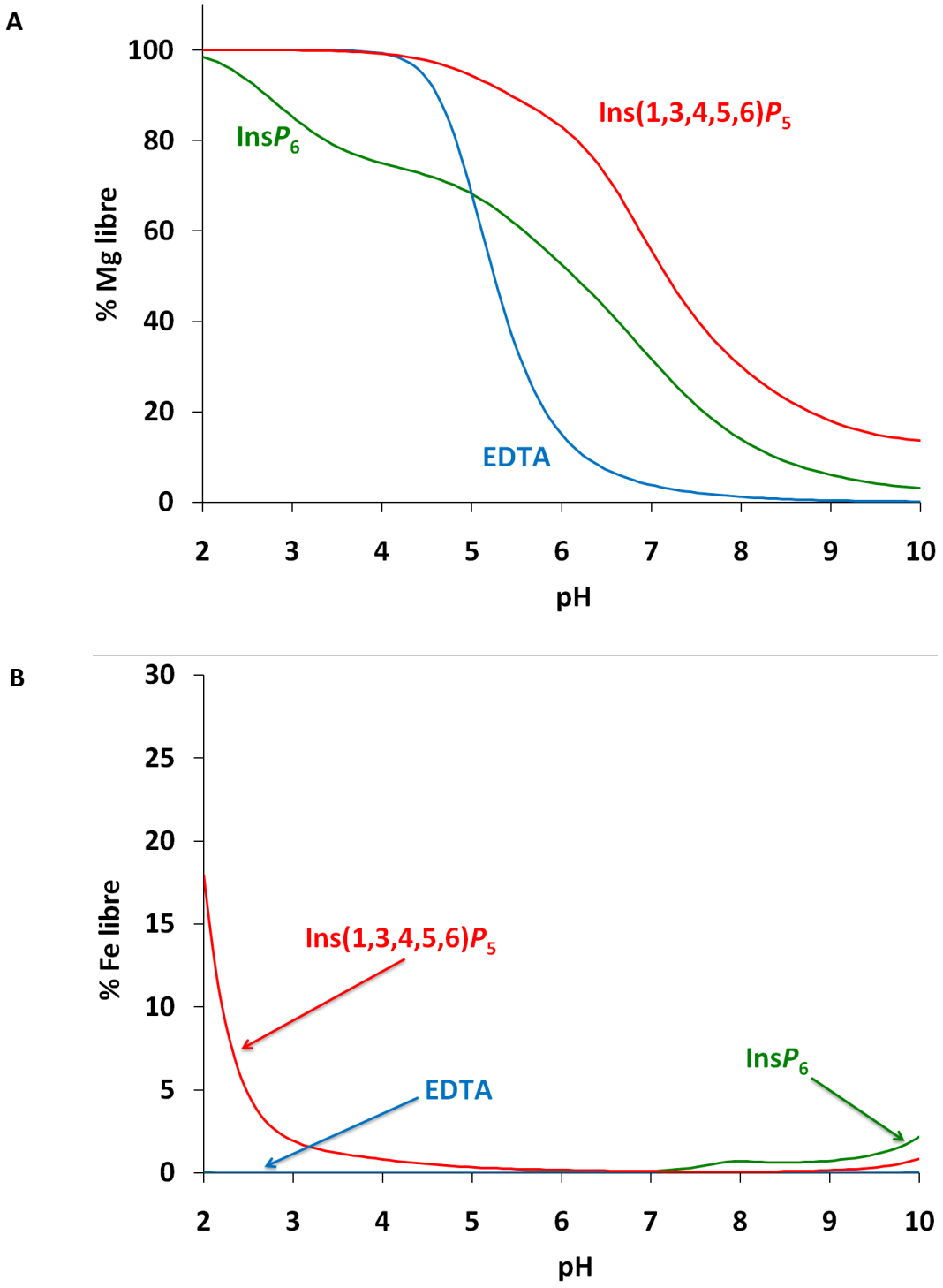


Figura 9.8. Porcentaje de metal libre en función del pH para los sistemas conteniendo Mg^{2+} (A) ó Fe^{3+} (B) en presencia de fitato, EDTA e Ins(1,3,4,5,6)P_5 ([L] = [M] = 1 mM). Para el modelado, las constantes de equilibrio del EDTA en condiciones similares a las de este trabajo fueron extraídas de la base IUPAC de datos termodinámicos[17].

Por su parte, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 muestra un comportamiento levemente diferente. Su eficiencia como agente secuestrante es marcado por encima de pH = 3, donde los complejos $[Fe(H_3L)]^{4-}$, $[Fe(H_2L)]^{5-}$ y $[Fe(HL)]^{6-}$ corresponden a las especies predominantes del metal en solución. En este rango, el ligando es, de hecho, tan efectivo para complejar hierro como el fitato o el EDTA. Por debajo de este punto, sin embargo, la protonación del ligando inhibe su capacidad quelante y, con ello, hasta un 20 % del metal es liberado a pH ≈ 2.

4. Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados de la caracterización termodinámica de los equilibrios de protonación y complejación del Ins(1,3,4,5,6)P_5, en ausencia y presencia de Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+} y Fe^{3+}, en un medio no interactuante y en condiciones de fuerza iónica y temperatura similares a las fisiológicas.

Fue posible el estudio de las primeras siete reacciones de protonación, cuyos valores de log β ajustados siguen el orden esperado y son consistentes con reportes anteriores. A valores de pH cercanos al fisiológico, las especies predominantes son H_4L^{6-} y H_3L^{7-}.

En presencia de iones alcalinos, los complejos detectados son todos polinucleares, de fórmula general $[M_i(H_jL)]^{(10-i-j)-}$ con *i:j* = (2:2), (3:1) y (4:0). Los logaritmos de las constantes de estabilidad no son grandes en términos absolutos, aunque son apreciables para complejos con iones alcalinos. La comparación entre los diagramas de distribución de especies para Na^+ y K^+ revela que la interacción ligando-metal es muy similar en ambos casos. La evidencia sugiere, además, que es necesaria la presencia de menos de un H^+ por cada grupo fosfato para una efectiva coordinación metálica. La estabilidad y nuclearidad de los complejos se reducen a medida que el ligando neutraliza parcialmente su carga por protonación, por lo que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 pierde capacidad complejante a medida que disminuye el pH. En presencia de concentraciones fisiológicas de Na^+ o K^+, las especies metálicas comienzan a ser detectadas por encima de pH = 7 y a pH citosólico-nuclear se predice la formación de los compuestos H_4L^{6-}, H_3L^{7-} y $[M_2(H_2L)]^{6-}$.

En presencia de iones de tipo M^{2+}, se detectan para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 compuestos es del tipo 1:1 metal:ligando, de fórmula general $[M(H_jL)]^{(10-2-j)-}$ con $2 \leq j \leq 4$, y un complejo neutro polimetálico de tipo $[M_4(H_2L)]$ para Mg(II) y Ca(II) y $[M_5L]$ para Fe(II) y Cu(II). La estabilidad de los complejos 1:1 es significativamente mayor a la encontrada para los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-iones alcalinos. La neutralización de la carga de las especies del ligando por protonación provoca una disminución en la estabilidad de los complejos. Este comportamiento sugiere que la fuerza del enlace metal-ligando es modulada principalmente por el potencial iónico del catión metálico y la carga de las especies presentes del ligando. De forma general, para los cationes M^{2+} estudiados el comportamiento ligando-metal es muy similar. Desde un punto de vista termodinámico, los resultados marcan que para una efectiva interacción metal(II)-ligando es necesaria la presencia de menos de un H^+ por cada grupo fosfato. Todos los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(II) analizados están químicamente caracterizados por dos procesos de complejación diferentes, dando lugar a complejos mono o polinucleares, cuya extensión relativa es dependiente del pH y la relación M/L. Para relaciones molares M/L menores o iguales a la unidad, la formación de complejos 1:1 se ve termodinámicamente favorecida.

En presencia de hierro(III), se detectan sólo complejos de tipo 1:1, con estequiometría general $[M(H_jL)]^{(10-3-j)-}$ con $1 \leq j \leq 3$, los que son sustancialmente más estables respecto de los obtenidos con iones mono y divalentes. En general, la alta carga del centro metálico da lugar a interacciones metal:ligando muy intensas y con ello un menor grado de protonación del ligando en las especies complejas. A pH fisiológico, se predice como complejo predominante la especie $[Fe(HL)]^{6-}$.

La interacción Ins(1,3,4,5,6)P_5-M^{n+} parece ser dependiente esencialmente de la carga del ion metálico. De esta manera, el ligando interacciona débilmente con los iones alcalinos, moderadamente con los alcalinotérreos y de transición, y fuertemente con el ion Fe^{3+}. Asimismo, las diversas características de los modelos de especies químicas tienen directa repercusión en la selectividad que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 exhibe frente a los diversos cationes. Así, para concentraciones de metal y ligando en el orden milimolar, el porcentaje de Na^+ y K^+ complejado es prácticamente nulo en todo el rango de pH abarcado,

mientras que los iones +2 y +3 muestran una mayor capacidad de competencia con los H^+ por los sitios de coordinación.

La capacidad secuestrante de este inositol fosfato fue evaluada en relación a la exhibida por otros ligandos. Para el ion Mg^{2+}, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 no logra unirse hasta pH = 4. Por encima de este punto, la extensión de los procesos de complejación es mucho menor que la registrada para el EDTA o el fitato, perfilando al Ins(1,3,4,5,6)P_5 como el agente secuestrante de menor eficiencia entre los analizados. En presencia de Fe^{3+}, por el contrario, este InsP_5 muestra un comportamiento totalmente diferente. Su desempeño como agente secuestrante es relevante por encima de pH = 3, siendo en estas condiciones tan efectivo como el fitato o el EDTA.

5. Referencias bibliográficas

1. Shears, S. B. *The Handbook of Cell Signalling;* Academic Press: San Diego, 2003; Vol. 2.
2. Johnson, L. F.; Tate, M. E. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1969,** *165*, 526-532.
3. Stephens, L. R.; Hawkins, P. T.; Stanley, A. F.; Moore, T.; Poyner, D. R.; Morris, P. J.; Hanley, M. R.; Kay, R. R.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1991,** *275*, 485-499.
4. Guse, A. H.; Emmrich, F. *Journal of Biological Chemistry* **1991,** *266*, 24498-24502.
5. McConnell, F. M.; Stephens, L. R.; Shears, S. B. *Biochemical Journal* **1991,** *280*, 323-329.
6. Frederick, J. P.; Mattiske, D.; Wofford, J. A.; Megosh, L. C.; Drake, L. Y.; Chiou, S. T.; Hogan, B. L. M.; York, J. D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005,** *102*, 8454-8459.
7. Lu, P. J.; Shieh, W. R.; Chen, C. S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996,** *220*, 637-642.
8. Riera, M.; Fuster, J. F.; Palacios, L. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **1991,** *260*, R798-R803.
9. Orchiston, E. A.; Bennett, D.; Leslie, N. R.; Clarke, R. G.; Winward, L.; Downes, C. P.; Safrany, S. T. *Journal of Biological Chemistry* **2004,** *279*, 1116-1122.
10. Piccolo, E.; Vignati, S.; Maffucci, T.; Innominato, P. F.; Riley, A. M.; Potter, B. V. L.; Pandolfi, P. P.; Broggini, M.; Iacobelli, S.; Innocenti, P.; Falasca, M. *Oncogene* **2004,** *23*, 1754-1765.
11. Campbell, S.; Fisher, R. J.; Towler, E. M.; Fox, S.; Issaq, H. J.; Wolfe, T.; Phillips, L. R.; Rein, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001,** *98*, 10875-10879.
12. Steger, D. J.; Haswell, E. S.; Miller, A. L.; Wente, S. R.; O'Shea, E. K. *Science* **2003,** *299*, 114-116.
13. Riley, A. M.; Trusselle, M.; Kuad, P.; Borkovec, M.; Cho, J.; Choi, J. H.; Qian, X.; Shears, S. B.; Spiess, B.; Potter, B. V. L. *ChemBioChem* **2006,** *7*, 1114-1122.
14. Anderegg, G. *Critical survey of stability constants of EDTA complexes;* Pergamon Press: Oxford, 1977.
15. Arena, G.; Musumeci, S.; Purrello, R. *Thermochimica Acta* **1983,** *61*, 129-138.
16. Delgado, R.; Quintino, S.; Teixeira, M. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997,** 55-64.
17. *The IUPAC Stability Constants Database, SC-Database,* version 5.83; Academic Software: Sourby Old Farm, Timble, Otley, Yorks, LS21 2PW, UK, 2005

Capítulo 10

Estudio estructural en solución de los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+/$M^{+/2+}$

En este capítulo se amplía el estudio en solución de los sistemas conteniendo Ins(1,3,4,5,6)P_5, en ausencia y en presencia de los iones Na^+ y Mg^{2+}, mediante un abordaje estructural y energético. A través del análisis de los resultados de experimentos de RMN de ^{31}P y técnicas de química computacional, se discuten los detalles inframoleculares de la secuencia de protonación del ligando en ausencia de ion metálico. Mediante herramientas análogas, se evalúa la alteración que los iones metálicos ejercen sobre la estabilidad, conformación y estado de protonación de las especies del ligando. Se exponen los parámetros estructurales y energéticos que caracterizan algunas de las especies complejas detectadas en ambos sistemas, haciendo énfasis en probables esquemas de coordinación, geometrías, conformación, entre otros factores que sientan a nivel molecular las bases de la capacidad de complejación del ligando.

1. Introducción

De acuerdo a los argumentos expuestos oportunamente para el fitato, ha quedado en evidencia que la evaluación de la interacción Ins*P*-M^{n+}, desde un punto de vista esencialmente estructural, proporciona información importante para el entendimiento cabal del rol o los roles de cada inositol fosfato a nivel celular. Yendo un paso más adelante, esta información constituye una herramienta muy útil en el establecimiento racional de estrategias de síntesis de compuestos relacionados, con potencial aplicación en la prevención y/o terapia de diversas enfermedades, usualmente asociadas al desajuste de los procesos biológicos que estas moléculas modulan.

Existen muy pocos estudios que se focalizan en el estado de protonación y la capacidad de complejación a nivel inframolecular de los inositol fosfatos. Muy

pocos autores, asimismo, han analizado desde un punto de vista estructural el influjo que estos factores tienen sobre las especies del ligando, siendo el InsP_6 y algunos InsP_3 los miembros más estudiados (ver capítulo 6, 7 y referencias[1-7]). En especial para el Ins(1,3,4,5,6)P_5, la información publicada hasta el momento en este sentido es realmente escasa. Volkman *et al*.[7] han reportado un cambio conformacional del ligando 1a5e → 5a1e operativo en el rango de pH 10,5 - 10,7, con una variación en la energía libre al estado de transición, $\Delta G^{\#}$, de 59,6 kJ/mol. Dado que este valor es mayor que el correspondiente al fitato ($\Delta G^{\#}$ = 54,8 kJ/mol), los autores sugieren que el grupo fosfato en C2 tendría algún tipo de influencia en el proceso de transición conformacional. Por otra parte, se ha estudiado en KCl 0,2 M a 37 °C el cambio conformacional que el ligando sufre en función del pH (entre 9 y 11), así como el patrón de protonación y probabilidad relativa de las microespecies presentes a pH = 7,5[5]. No obstante, dado que los experimentos fueron realizados en condiciones de exceso de catión potasio, la gran interacción que se espera ocurra entre este ion y el Ins(1,3,4,5,6)P_5 desvirtúa el análisis, ya que los equilibrios de protonación a nivel macroscópico y microscópico se ven profundamente afectados por la formación de complejos metálicos.

Un estudio espectroscópico similar al realizado para el InsP_6 por RMN, en agua y en presencia de bajas cantidades de ion alcalino, se vuelve necesario para ampliar el entendimiento y racionalización a nivel molecular de la interacción química Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(I,II). En este marco, se presenta aquí un estudio del comportamiento químico del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en ausencia y en presencia de los iones Na^+ y Mg^{2+}, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura. Para completar el análisis, se expone paralelamente un estudio energético-estructural de algunas de las especies complejas, con énfasis en aquellas detectadas en condiciones fisiológicas, lo que permitirá sopesar, entre otros, la influencia de diversos factores estructurales en el cambio conformacional del ligando y el cooperativismo de los grupos fosfato en el enlace ligando-metal.

2. Parte experimental

El comportamiento químico del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en ausencia y en presencia de iones metálicos fue analizado a 37,0 °C en NMe_4Cl 0,15 M. Los espectros de

RMN de ^{31}P a diferentes valores de pH fueron registrados y tratados de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 4. La asignación de las señales para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ se realizó en base al reporte de Riley *et al*[5], mientras que la correspondiente a los espectros en presencia de metal se efectuó por comparación con los espectros del ligando. Se utilizaron concentraciones y relaciones ligando-metal que permitieron obtener buenas relaciones señal/ruido: Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ ([L] = 10,6 mM), Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ ([L] = 4,8 mM, [Na] = 500 mM) e Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+} ([L] = 2,48 mM, [Mg] = 0,99 mM). Utilizando la misma estrategia metodológica que para el InsP_6, los experimentos fueron realizados en agua, evitando los errores asociados al trabajo con D_2O. Se estimaron los valores de p*K*a individuales para cada grupo fosfato a partir de las curvas de titulación de RMN, analizando el mecanismo íntimo de protonación del ligando a través del método de expansión de clúster[6].

Todas las optimizaciones de geometrías moleculares se realizaron en las condiciones expuestas en el capítulo 4. Para el estudio teórico del mecanismo de protonación del ligando, se realizaron cálculos de optimización de geometría con el método RHF/3-21+G*, sobre ambos estados conformacionales de las especies L^{10-}, HL^{9-}, H_2L^{8-}, H_3L^{7-}, H_4L^{6-}, H_5L^{5-} y $H_{10}L$. Las geometrías iniciales se construyeron a partir de la forma completamente deprotonada del ligando, agregando un protón por vez según la información del patrón de protonación derivada del ajuste de los datos espectroscópicos por RMN. En base a las estructuras de mínima energía en cada caso, se realizaron cálculos puntuales de energía con los métodos RB3LYP/3-21+G*, IPCM y CPCM. Para el abordaje computacional de las especies complejas con sodio, se optimizaron con el método RB3LYP/LANL2DZ las diversas geometrías iniciales, construidas mediante mecánica molecular (MM+) partiendo de las geometrías refinadas del ligando, y haciendo uso de la información estructural derivada del análisis espectroscópico por RMN y las características topológicas del potencial electrostático molecular. Se realizó el modelado en fase gaseosa para luego considerar el efecto del solvente a través de un modelo discreto de dos moléculas de agua de coordinación por cada ion metálico. El procedimiento descrito se aplicó a ambos estados conformacionales de los tres complejos detectados. En el caso de las especies biológicamente relevantes con magnesio, se optimizaron las geometrías moleculares utilizando el método RB3LYP/6-

31+G*. En particular y siguiendo los resultados del capítulo anterior, los complejos considerados fueron $[Mg(H_3L)]^{5-}$ y $[Mg_4(H_2L)]$, los cuales predominan en condiciones fisiológicas a pH = 7,5 (citosólico-nuclear). Para el primero, la geometría inicial se construyó mediante mecánica molecular (MM+) de acuerdo con los datos estructurales derivados del análisis de los espectros de RMN. Se tuvo en cuenta el efecto del solvente mediante la aplicación de un modelo discreto de tres moléculas de agua de coordinación. En el caso del complejo polimetálico se partió de una estructura MM+ en donde los cuatros cationes Mg^{2+} fueron ubicados entre pares de grupos fosfato adyacentes, completando el resto de las posiciones de coordinación con 4 moléculas de agua. Debido a la falta de datos estructurales, los dos protones se asociaron al ligando de forma de encontrarse lo más alejados posible de los cationes metálicos. El procedimiento detallado fue aplicado, en este último caso, a ambos estados conformacionales del ligando.

3. Resultados y discusión

3.1. Sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+

3.1.1. Análisis de los equilibrios de protonación por RMN de ^{31}P

La figura 10.1A muestra los espectros de RMN de ^{31}P registrados para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 en ausencia de ion metálico. El perfil espectral está constituido por tres señales, dos de las cuales integran el doble que la tercera, de acuerdo con los tres conjuntos de grupos fosfato simétricamente equivalentes: P1/3, P4/6 y P5. La reducción del pH del medio provoca una disminución en los desplazamientos químicos de las señales, como ocurría con el fitato. Este fenómeno, discutido en el capítulo 6, encuentra explicación mecanocuántica en la suma de tres contribuciones: variación de la electronegatividad de los oxígenos asociados al átomo de P, variación del ángulo de enlace O-P-O, y ocupación de los orbitales dπ del fósforo.

No se observan mesetas claras en las curvas de desplazamiento químico en función del pH (figura 10.1B), por lo que no existen especies ampliamente mayoritarias, sino varias formas del ligando en distinto grado de protonación que coexisten en el sistema.

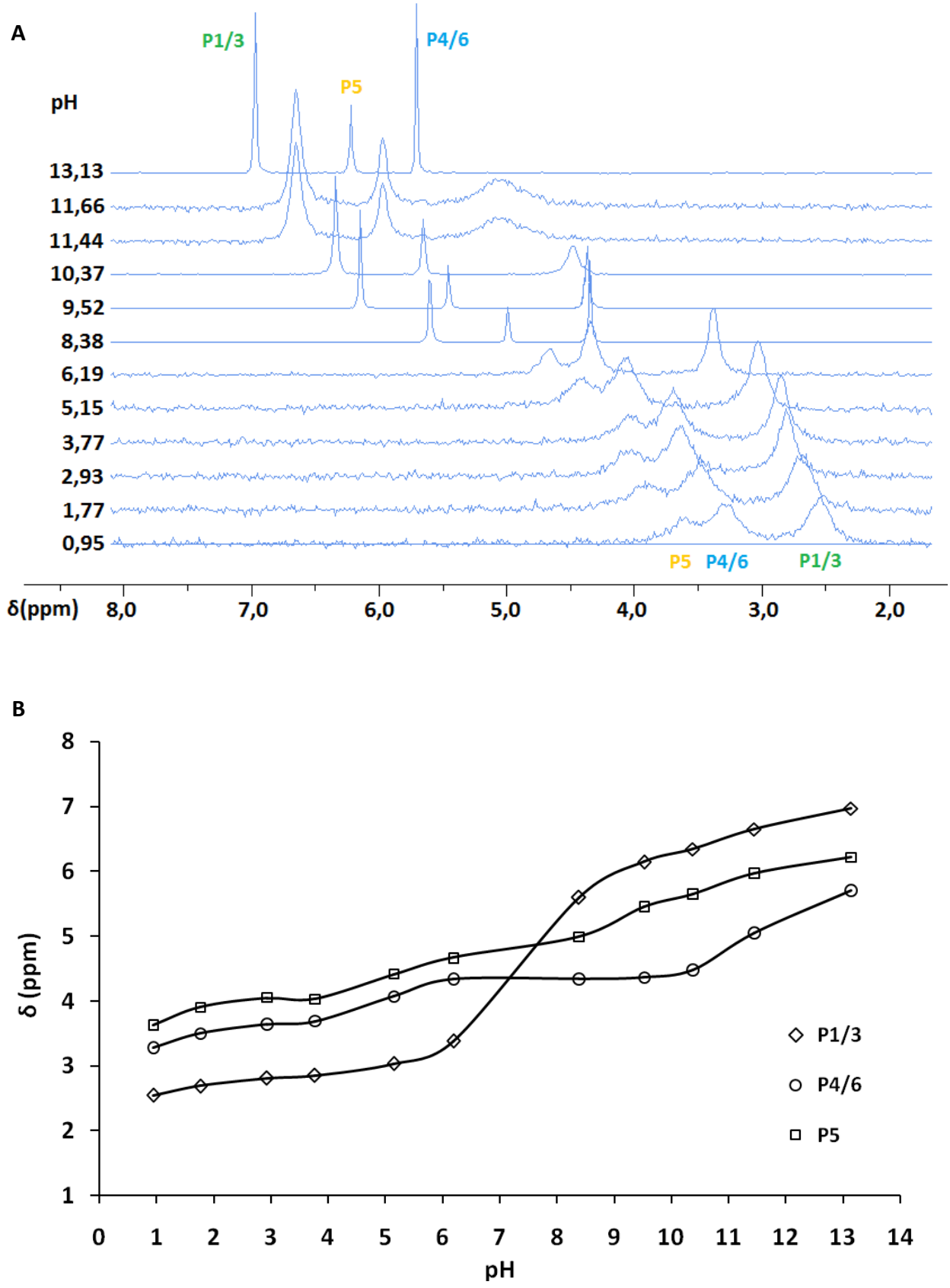


Figura 10.1. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ en función del pH, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 10,6 mM). (B) Ajuste de los valores de δ *vs.* pH. La curva continua corresponde al modelo teórico.

A partir del ajuste de los datos de desplazamiento químico con el pH es posible caracterizar los equilibrios de protonación del ligando. En la tabla 10.1 se especifican los valores ajustados de constantes globales de protonación del Ins(1,3,4,5,6)P_5, los que reproducen satisfactoriamente el comportamiento de las señales en el RMN, dando cuenta de la bondad del modelo de especies propuesto (figura 10.1B).

Tabla 10.1. Logaritmo de las constantes globales ajustadas para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (σ = 0,01).

Equilibrio	log *K*
$L^{10-} + H^+ \leftrightarrow HL^{9-}$	12,41(4)
$L^{10-} + 2\ H^+ \leftrightarrow H_2L^{8-}$	23,58(4)
$L^{10-} + 3\ H^+ \leftrightarrow H_3L^{7-}$	32,53(4)
$L^{10-} + 4\ H^+ \leftrightarrow H_4L^{6-}$	39,62(4)
$L^{10-} + 5\ H^+ \leftrightarrow H_5L^{5-}$	44,63(5)
$L^{10-} + 6\ H^+ \leftrightarrow H_6L^{4-}$	47,6(1)
$L^{10-} + 7\ H^+ \leftrightarrow H_7L^{3-}$	49,0(1)

Al igual que mediante el método potenciométrico, fue posible el análisis de las primeras 7 reacciones de protonación. Las especies obtenidas por la protonación de H_7L^{3-} no fueron detectadas, debido a la gran acidez que presentan (pK_a < 1,4). Los valores ajustados de log β siguen el orden esperado y son consistentes con aquellos determinados potenciométricamente en KCl 0,2 M a 37 °C por Riley *et al* [5]. El diagrama de distribución de especies construido a partir de las constantes de la tabla 10.1, para una solución 10,6 mM de ligando, se muestra en la figura 10.2. En concordancia con los resultados del capítulo 9, en ausencia de iones metálicos y a valores de pH cercanos al fisiológico, las especies predominantes son H_4L^{6-} y H_3L^{7-}.

Un aspecto interesante que surge en este contexto es que, a diferencia de los resultados derivados del análisis potenciométrico del sistema, no resultó posible en este caso el ajuste de las constantes de formación de las especies Ins(1,3,4,5,6)P_5-NH_4^+. De acuerdo con los datos presentados en el capítulo 9, éstas se forman en las corridas experimentales de RMN en una concentración

significativa, entre pH 6 y 11, donde llegan a constituir hasta un 50 % del ligando total. En apariencia, el entorno químico del átomo de fosforo no es demasiado sensible a los cambios generados por la formación de estos compuestos. Desde un punto de vista puramente espectral, estos agregados parecen comportarse de forma similar a las especies del ligando de las cuales se originan, lo que explica el buen ajuste teórico-experimental resultante (figura 10.1B) y el acuerdo, ampliamente satisfactorio, entre los resultados potenciométricos y espectroscópicos por RMN. En vista de este fenómeno, se despreciará en el análisis subsiguiente la contribución del ion amonio aportado por la sal del ligando utilizada.

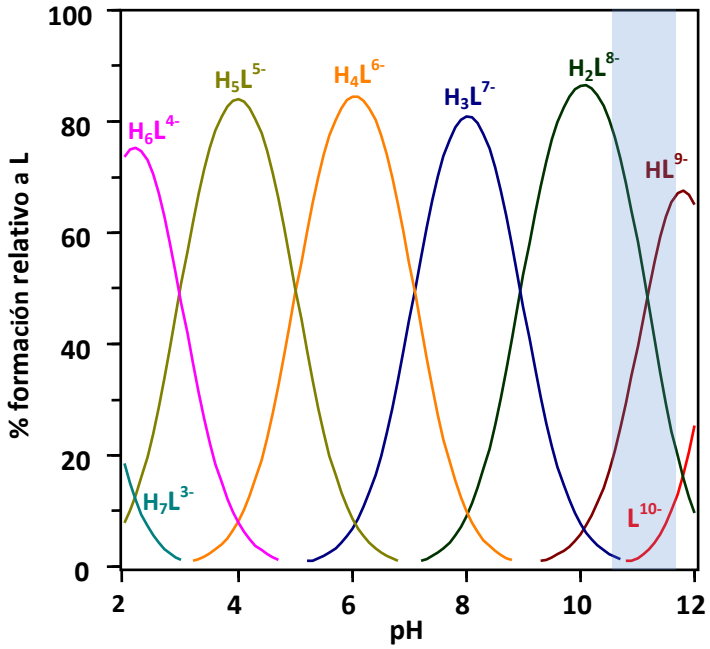


Figura 10.2. Diagrama de distribución de especies para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 10,6 mM). Se resalta la zona de cambio conformacional del ligando.

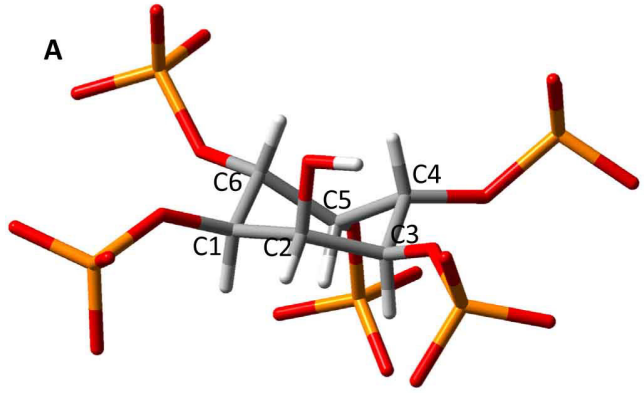
Los desplazamientos químicos individuales y su variación debido a los procesos sucesivos de protonación ($\Delta\delta_{prot}$) se resumen en la tabla 10.2. Usando la misma estrategia aplicada en otros sistemas de esta tesis, se destacarán las características estructurales más importantes de las especies detectadas, mediante el análisis de las tendencias generales observadas para estos indicadores.

Tabla 10.2. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

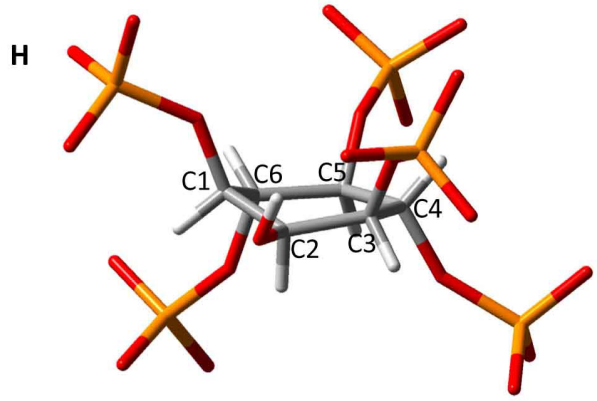
	Desplazamientos químicos individuales (ppm)				$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5		P1/3	P4/6	P5
L^{10-}	7,001	5,777	6,236		---	---	---
HL^{9-}	6,807	5,355	6,141		-0,195	-0,422	-0,095
H_2L^{8-}	6,298	4,352	5,607		-0,509	-1,003	-0,535
H_3L^{7-}	5,539	4,341	4,842		-0,759	-0,011	-0,764
H_4L^{6-}	3,147	4,383	4,698		-2,392	0,042	-0,144
H_5L^{5-}	2,847	3,661	3,992		-0,300	-0,722	-0,707
H_6L^{4-}	2,777	3,639	4,104		-0,070	-0,023	0,112
H_7L^{3-}	2,464	3,158	3,459		-0,313	-0,481	-0,645

Una inspección en conjunto de los valores de la tabla 10.2 muestra que la gran mayoría de los valores de $\Delta\delta_{prot}$ son negativos, dando cuenta del mencionado efecto de aumento del campo con la protonación de los grupos fosfato. Como se especificó para el fitato, el desplazamiento químico para cada señal es el resultado del aporte de varias microespecies con distinto esquema de protonación, las que coexisten en solución. Con la hipótesis de que la ubicación de los protones en las microespecies más estables dentro de un macroestado es relativamente similar, los valores de $\Delta\delta_{prot}$ proveen de datos estructurales genéricos de las diversas formas del ligando. En la figura 10.3 se muestran las geometrías, optimizadas en fase gaseosa, para ambos estados conformacionales de las especies del ligando detalladas en la tabla 10.2. El modelado computacional brinda en este caso información estructural complementaria, además de asistir en el análisis espacial de los requerimientos geométricos de la secuencia de protonación.

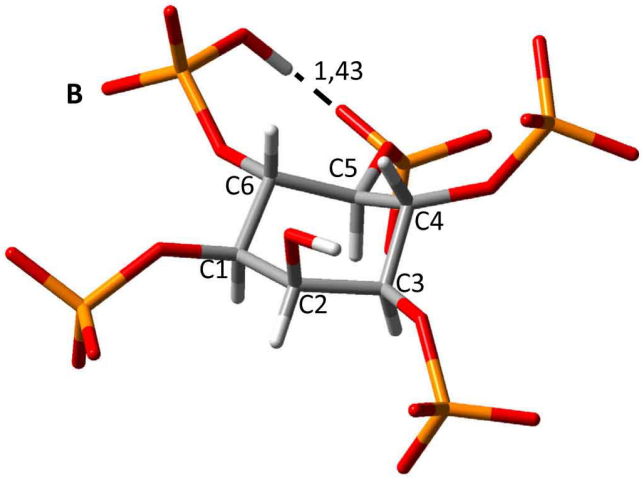
$\Delta\delta_{prot}$ es más negativo para el grupo P4/6, por lo que la primera protonación es factible a nivel de este grupo. Dado que los demás fosfatos sólo se ven afectados en menor medida, el protón entrante debe asociarse con P1/3 y P5 como parte de microespecies minoritarias del ligando o ser compartido por enlace de hidrógeno del tipo P4/6-P1/3 ó P4/6-P5. De acuerdo con esto, según las figuras 10.3B e I se espera un fuerte enlace de hidrógeno en la especie HL^{9-}, con una distancia del orden de 1,4 - 1,5 Å, para esta última dupla.



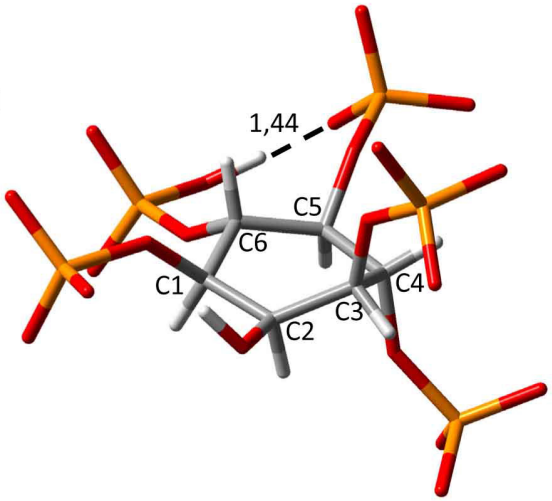
L^{10-} (1a5e)



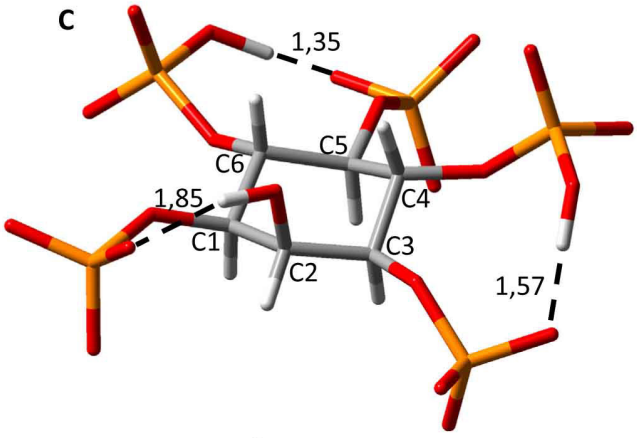
L^{10-} (5a1e)



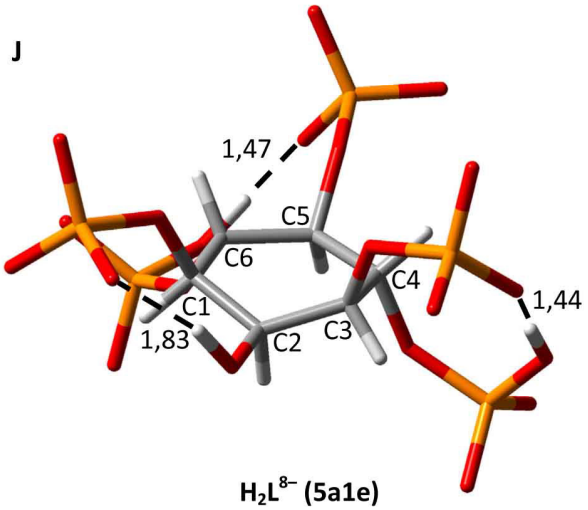
HL^{9-} (1a5e)



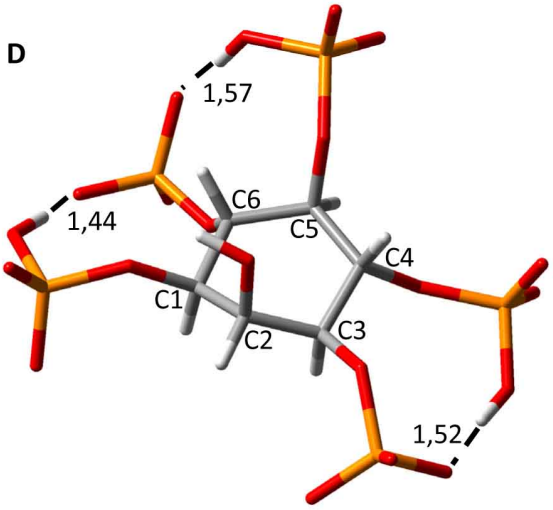
HL^{9-} (5a1e)



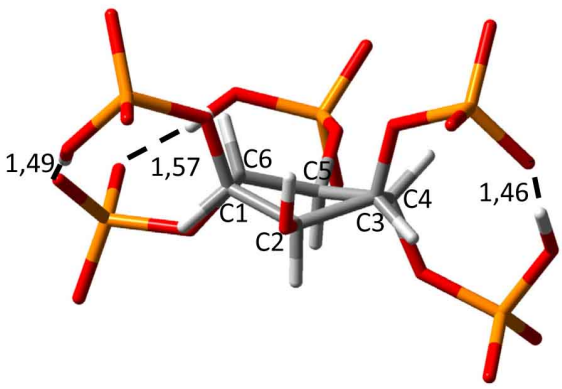
H_2L^{8-} (1a5e)



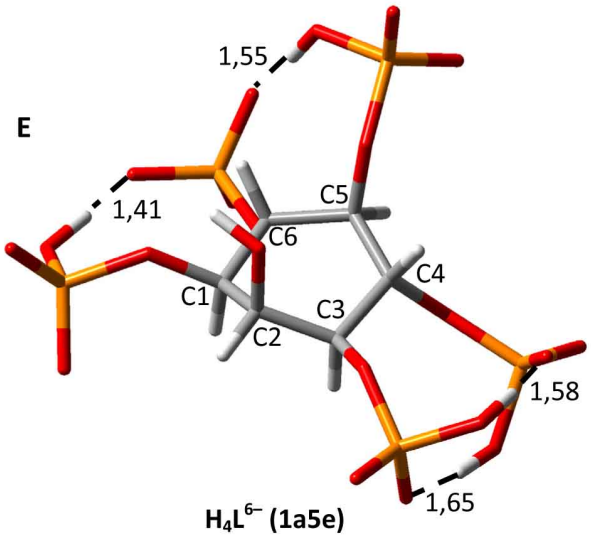
H_2L^{8-} (5a1e)



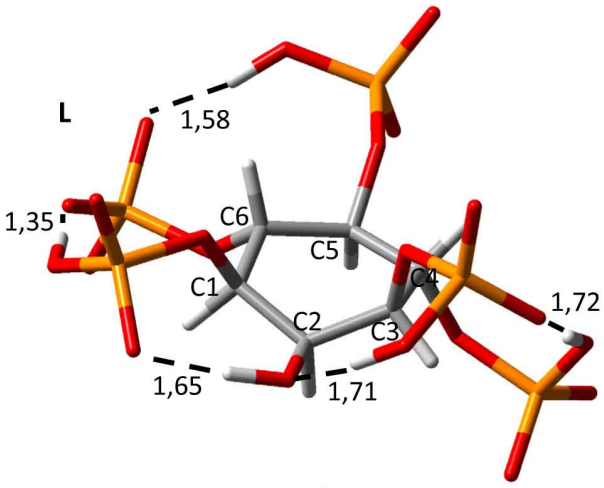
H_3L^{7-} (1a5e)



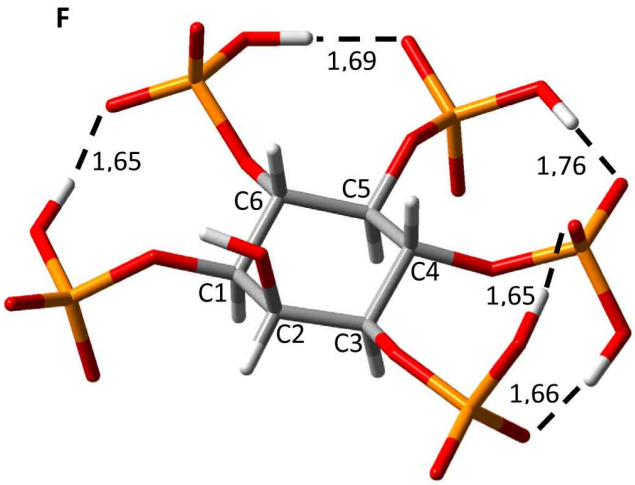
H_3L^{7-} (5a1e)



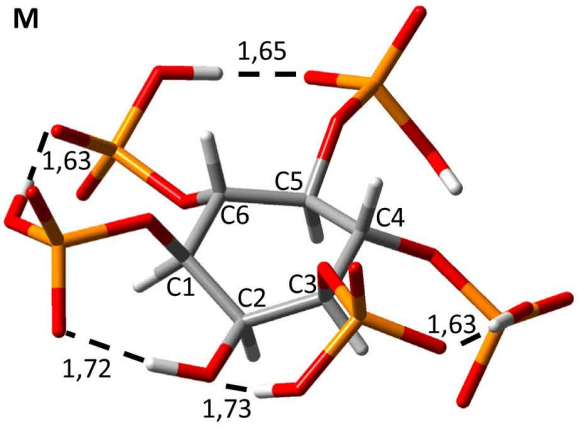
H_4L^{6-} (1a5e)



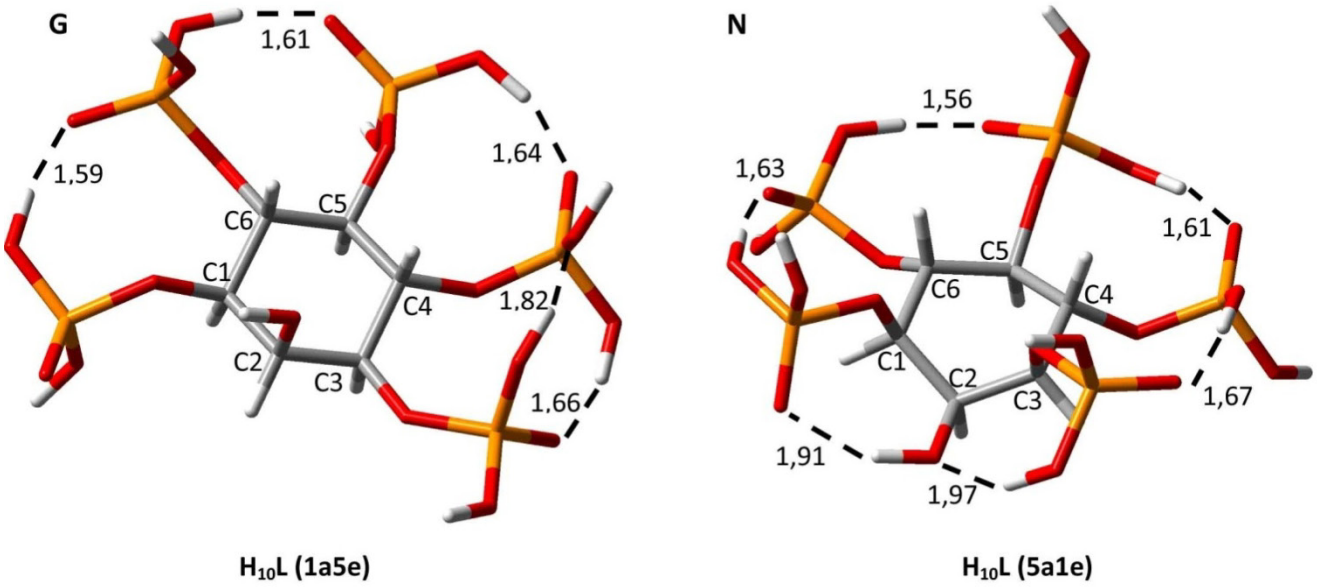
H_4L^{6-} (5a1e)



H_5L^{5-} (1a5e)



H_5L^{5-} (5a1e)



$H_{10}L$ (1a5e) $H_{10}L$ (5a1e)

Figura 10.3. Geometrías RHF/3-21+G* optimizadas en fase gaseosa para ambos estados conformacionales de algunas de las especies protonadas del Ins(1,3,4,5,6)P_5. L^{10-}(A,H), HL^{9-}(B,I), H_2L^{8-}(C,J), H_3L^{7-}(D,K), H_4L^{6-}(E,L), H_5L^{5-}(F,M), $H_{10}L$(G,N). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas con la distancia correspondiente en Å.

El segundo protón que ingresa lo hace también sobre P4/6 (bajo valor de $\Delta\delta_{prot}$), por lo que es probable que ambos fosfatos estén protonados en H_2L^{8-}, compartiendo sus protones con grupos vecinos (ver figuras 10.3C y J) y por tanto generando que las señales de P1/3 y P5 resulten afectadas de forma similar. La formación de H_3L^{7-} va asociada a una disminución importante del desplazamiento químico de las señales de P1/3 y P5. Asimismo, de forma interesante, la señal de P4/6 se ve muy poco afectada. Si se observan las figuras 10.3D y K, esto sería coherente con la protonación de P1/3 ó P5 y el rearreglo posterior de los protones sobre el ligando, de forma que en el estado final los grupos P1/3, P5 y P4/6 conservan mayoritariamente un solo protón cada uno. En este proceso, P4/6 pierde un protón, pero comienza a compartir dos mediante enlaces de hidrógeno que establece con los fosfatos adyacentes, lo que anula parcialmente sobre δ los efectos asociados de aumento y disminución del campo. La protonación de esta última especie da lugar a H_4L^{6-}, donde los $\Delta\delta_{prot}$ marcan la asociación del H^+ entrante a P1/3 (figuras 10.3E y L). En este caso el resto de los fosfatos se ven poco afectados, por lo que es

posible que ocurra un cambio menor en el entorno del resto de los grupos, o que el rearreglo protónico sea tal que los efectos sobre los desplazamientos químicos se compensen. El proceso $H_4L^{6-} \rightarrow H_5L^{5-}$ conlleva la compartición del protón que ingresa por parte de P4/6 y P5 (figuras 10.3F y M), según lo indican los bajos valores de $\Delta\delta_{prot}$ para estos grupos. Desde un punto de vista energético este último paso en la secuencia de protonación es razonable, ya que se ocuparía el único hueco formado por grupos fosfato adyacentes que se encuentra vacío en H_4L^{6-} (figura 10.3E y L). A partir de este punto, el análisis se vuelve bastante complejo, ya que todas las señales se ven afectadas de forma similar. Como fue discutido para el InsP_6, al no existir "espacios" libres entre fosfatos, es factible que este fenómeno se origine en el establecimiento de rearreglos continuos y dinámicos de los protones sobre el ligando. No obstante, dados los valores de alteración en los desplazamientos químicos, el sexto protón podría unirse a P1/3, mientras que el séptimo lo haría entre P5 y P4/6.

3.1.2. Equilibrios de microprotonación

La información recabada a través del análisis de la variación del desplazamiento químico de las señales debida a la protonación de las especies es de tipo cualitativo. Al igual que lo presentado para el fitato en el capítulo 6, se ha abordado cuantitativamente el estudio de los equilibrios de protonación mediante el denominado método de “expansión de clúster” [6], cuya aplicación específica al sistema en estudio se realizó por encima de pH = 3,7, de modo de considerar sólo aquellas especies en las que cada fosfato se protona una vez como máximo: H_5L^{5-}, H_4L^{6-}, H_3L^{7-}, H_2L^{8-}, HL^{9-} y L^{10-}. Los pormenores matemáticos de la resolución de este sistema se exponen en el Anexo A. Los resultados finales, detallados en la figura 10.4, concuerdan con el análisis cualitativo previo del mecanismo de protonación.

Para la especie totalmente deprotonada del Ins(1,3,4,5,6)P_5, el mayor valor de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ corresponde a los fosfatos en C4 ó C6 (Anexo A). Por tanto, ambos estados con n = 1 se agrupan por simetría en un único microestado, 4/6, el que es mayoritario (64,8 %). El siguiente H^+ se ubica en la otra posición simétrica (4 ó 6), de acuerdo con los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ del microestado predominante con n = 1. Esta distribución de los protones es esperable desde el punto de vista energético, ya que ambos se sitúan lo más alejados posible del OH en C2,

neutralizando la carga negativa del ligando de forma homogénea. De hecho, la microespecie donde los dos protones están en 1 y 3, lo más cercanos posible al OH en C2, es la que posee la menor probabilidad de ocurrencia (ver Anexo A). Asimismo, el esquema de protonación "46" provee de un medio efectivo para la estabilización del estado 1a5e, ya que en esta conformación la disposición ecuatorial de ambos fosfatos permite la interacción con el resto de los grupos ionizables a través del establecimiento de fuertes enlaces de hidrógeno, sin tensionar demasiado el anillo carbonado (ver figuras 10.3C y J). Estos resultados son compatibles con un cambio conformacional entre los macroestados con n = 1 y n = 2. Según muestra la figura 10.2, HL^{9-} y H_2L^{8-} coexisten, de hecho, en el rango de pH asociado al ensanchamiento de las señales en los espectros de la figura 10.1A (10,4 - 11,7), rasgo espectral que ha sido asociado anteriormente al cambio conformacional en solución de este mismo ligando [5].

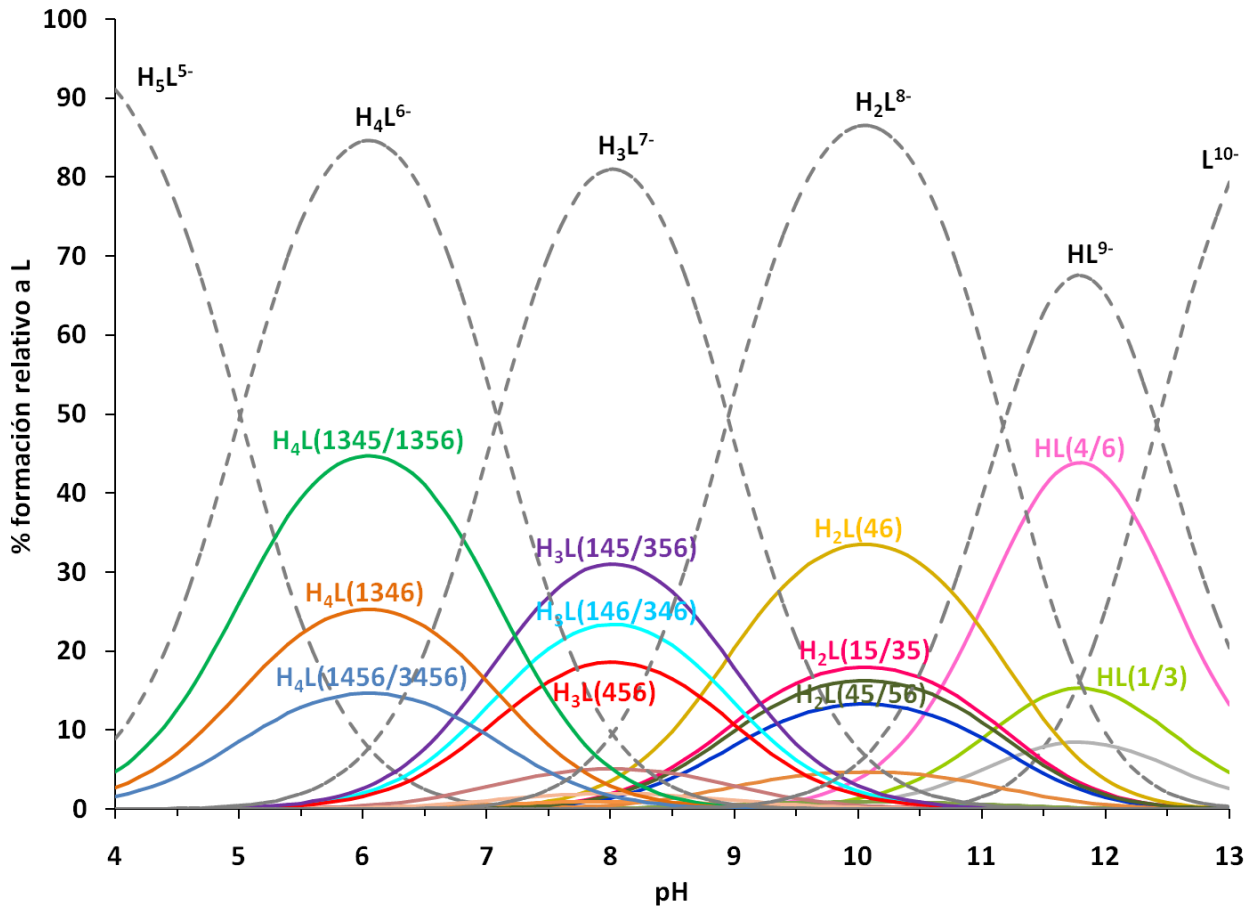


Figura 10.4. Diagrama de distribución de macro y microespecies del sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Se omiten las cargas de las microespecies por claridad.

Los valores de $\widehat{pK}$ para los fosfatos de la microespecie mayoritaria con n = 2 indican que un nuevo protón se uniría mayoritariamente al grupo en C5, dando lugar al microestado 456 como forma predominante con n = 3. Sin embargo, existen dos microespecies con n = 2 también mayoritarias, 15 y 56, que generan por protonación otros dos microestados con n = 3 relacionados por simetría, 145/356, los que juntos se establecen como las formas predominantes del ligando triprotonado. La distribución de protones en ellas es homogénea a lo largo del anillo, y es evidente, nuevamente, que las variantes que poseen dos protones en 1 y 3 son minoritarias. El siguiente microestado de H_3L^{7-} en importancia está compuesto también de dos estados simétricamente iguales, 346/146. Para la especie H_4L^{6-}, el microestado predominante en solución posee al fosfato en C4/C6 deprotonado, el cual se espera interaccione con los grupos adyacentes a través de fuertes enlaces de hidrógeno. Esta microespecie, 1345/1356, debe su importancia frente a la 1346 al hecho de que está conformada por dos microestados equivalentes simétricamente.

La comparación de los resultados obtenidos con los reportados para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 a pH = 7,5 por Riley *et al*. [5] muestra cierta concordancia (tabla 10.3), aunque se observan algunos apartamientos debidos a la diferentes condiciones experimentales utilizadas.

Tabla 10.3. Predominancia de las microespecies más importantes del sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ a pH fisiológico.

Microestados mayoritarios (pH = 7,5)	% sobre ligando (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C)[a]	% sobre ligando (KCl 0,2 M a 37 °C)[b]
145/356	26,9	55
146/346	20,2	15
456	16,1	---
1345/1356	14,4	11
1346	8,1	6

[a] Datos obtenidos en este trabajo. [b] Datos reportados por Riley *et al.*[5]

Las microespecies mayoritarias a pH citosólico-nuclear son aquellas protonadas en las posiciones 145/356 y 146/346, cuyas estructuras a nivel molecular se

muestran en las figuras 10.3D y K. Por otra parte, este estudio permite extender el análisis hacia condiciones más cercanas a las correspondientes a compartimientos vesiculares ácidos. En el rango de pH 4,5 - 6,5, las microespecies mayoritarias serán H_4L^{6-}(1345/1356) y H_5L^{5-}, cuyas geometrías están representadas en las figuras 10.3E, L, F y M.

3.1.3. Determinantes estructurales del cambio conformacional

Para finalizar el análisis, se revisan en esta sección los factores estructurales que influyen en la energía de las especies en solución, y por ende, en la conformación preferida del ligando en cada caso. En la figura 10.5 se muestra la diferencia energética entre ambos estados conformacionales (ΔE = E(5a1e) – E(1a5e)) para las estructuras de la figura 10.3.

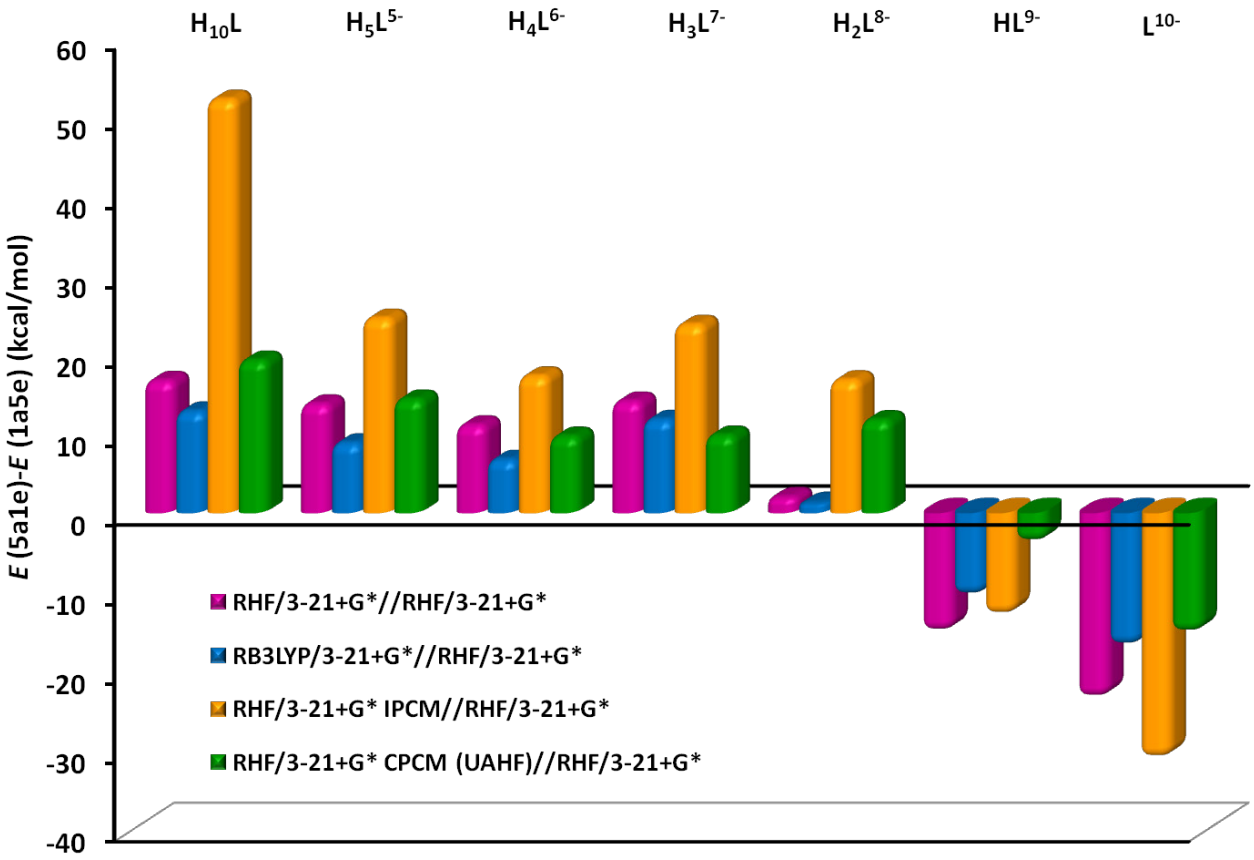


Figura 10.5. Diferencia de energía entre las geometrías optimizadas en fase gaseosa de ambos estados conformacionales para algunas de las especies protonadas del Ins(1,3,4,5,6)P_5. Se muestran además los valores obtenidos para el mismo indicador utilizando otros métodos, mediante cálculos puntuales de energía sobre estas geometrías.

En términos generales, los valores obtenidos en ausencia de solvente (barra fucsia en la figura 10.5) marcan, en las especies más deprotonadas del ligando (L^{10-} y HL^{9-}), una clara preferencia por el estado 5a1e. Por el contrario, para aquellas con un grado de protonación intermedio y alto ocurre lo inverso (desde H_3L^{7-} a $H_{10}L$), estabilizándose la forma en donde todos los fosfatos son ecuatoriales. En el medio de estos dos grupos se encuentra H_2L^{8-}, cuyo comportamiento en fase gaseosa involucra la coexistencia de estados conformacionales prácticamente isoenergéticos.

Una inspección detallada de las geometrías de la figura 10.3 puede dar idea de la causa de esta tendencia general. En este sentido, se resumen en la tabla 10.4 algunos parámetros estructurales de estas especies. La separación media de los átomos de fósforo de grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes ($X_{P\text{-}P}$) es siempre mayor en el estado 5a1e, por lo que los grupos ionizables se encuentran en promedio más distantes entre sí cuando todos se disponen en posición axial. Se espera que este efecto sea predominante cuando el ligando está altamente deprotonado, ya que los grupos cargados negativamente se repelen de forma importante. De acuerdo con esto, la conformación 5a1e es el estado preferido desde el punto de vista energético para L^{10-} y HL^{9-}.

Tabla 10.4. Parámetros estructurales de algunas de las especies del sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+ (geometrías RHF/3-21+G*).

	$X_{O\text{-}H}$ (Å)[a]			$X_{P\text{-}P}$ (Å)[b]			$\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ (°)[c]	
Especies	1a5e	5a1e		1a5e	5a1e		1a5e	5a1e
L^{10-}	---	---		5,52	5,89		20	39
HL^{9-}	1,43	1,44		5,19	5,55		14	47
H_2L^{8-}	1,59	1,58		4,87	5,39		8	44
H_3L^{7-}	1,51	1,51		4,95	5,07		34	45
H_4L^{6-}	1,55	1,60		4,85	5,05		36	46
H_5L^{5-}	1,68	1,67		4,27	4,79		6	56
$H_{10}L$	1,66	1,73		4,10	4,54		4	53

[a] $X_{O\text{-}H}$ representa la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en Å. [b] $X_{P\text{-}P}$ corresponde a la distancia promedio, en Å, entre los átomos de fósforo de los grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes. [c] $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ es la desviación promedio, desde el valor esperado de 180°, de todos los ángulos diedros formados por los grupos axiales de carbonos adyacentes en °.

Con el agregado de más protones, los grupos fosfato comienzan a interactuar entre sí a través de la formación de múltiples enlaces de hidrógeno (figura 10.3). A medida que se protona el ligando, las distancias promedio asociadas a los enlaces de hidrógeno intramoleculares varían de forma errática, y no se apartan sustancialmente entre ambas conformaciones, por lo que este factor no explica el cambio conformacional observado. Sin embargo, este fenómeno fuerza a los grupos negativos a acercarse, generando cierta tensión en el anillo carbonado. Como se deduce de los valores de $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$, la deformación de la conformación de silla es mucho más importante para el estado 5a1e. Esto se origina en la gran alteración que sufren los ángulos de enlace, necesaria para el establecimiento de fuertes enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato axiales que se encuentran, de hecho, muy alejados entre sí. Dado que este fenómeno es dependiente de la formación de enlaces de hidrógeno, se vuelve progresivamente más relevante con la disminución del pH. De esta manera, para las especies más protonadas del ligando la conformación 1a5e es la más estable, proveyendo de una disposición espacial de los grupos ionizables apropiada para una buena interacción fosfato-protón-fosfato, con un mínimo de aumento energético por deformación de la estructura molecular.

Con el objetivo de afinar los resultados computacionales, se determinó la energía molecular en cada caso mediante un método de DFT. Esto permitió estimar la contribución que la energía de correlación electrónica tiene sobre el valor de ΔE. Los resultados muestran que esta última es más importante para aquellas especies que poseen gran cantidad de electrones, como es el caso de las formas aniónicas altamente cargadas del ligando (barra azul en la figura 10.5). En general, las conclusiones son muy similares a las derivadas del método HF, posiblemente porque los efectos se cancelan al computar la diferencia energética en el valor de ΔE.

Por último, es importante estimar la contribución del solvente a las energías moleculares determinadas. Considerando que las geometrías optimizadas de la figura 10.3 son buenas representaciones de aquellas encontradas en solución, los valores de ΔE en agua, determinados por dos métodos distintos, IPCM y CPCM, se resumen en la figura 10.5 (barras en verde y naranja). Ambos condicen con los resultados en fase gaseosa, por lo que la hidratación de las especies no altera lo discutido hasta el momento. No obstante y al igual que

surgía entre las conclusiones del sistema InsP_6-H^+, la interacción ligando-solvente parece ser crítica para la definición del rango de pH de cambio conformacional. En efecto, mientras en fase gaseosa la transición era dada por el cambio H_3L^{7-} - HL^{9-}, en un rango donde H_2L^{8-} se encontraba en equilibrio conformacional, la hidratación de las especies restringe este proceso a la segunda protonación del ligando. Es importante destacar que Riley y sus colaboradores han reportado este mismo cambio conformacional pero en un rango de pH inferior (9 - 11) [5]. Esta diferencia con los resultados expuestos encuentra explicación, seguramente, en el exceso de K^+ utilizado en ese reporte (0,2 M). Como será analizado en la siguiente sección, la presencia en exceso de ion alcalino influye significativamente sobre la propiedades de protonación del ligando, formando complejos metálicos que modulan las condiciones en las que opera el cambio conformacional.

3.2. Sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+

3.2.1. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

A partir del análisis potenciométrico de la especiación química de este sistema se eligieron los valores de pH para el registro de los espectros de RMN de ^{31}P. De esta forma, se realizó un estudio espectroscópico altamente dirigido, estableciéndose en cada caso las condiciones experimentales que permitieron la predominancia de cada una de las especies complejas. Los resultados se detallan en la figura 10.6A. La resolución que muestran las señales permitió la asignación de las mismas por simple inspección y comparación con el ligando. Se observa en todos los casos el mismo patrón de señales que en ausencia de metal, por lo que los procesos de protonación y complejación operan de forma reversible sobre ambas mitades simétricas del ligando. En la figura 10.6B se comparan los desplazamientos químicos de las señales en función del pH, en presencia y en ausencia de sodio. Las señales sufren un incremento del δ por unión del ion alcalino a los grupos fosfato. Dado que las estequiometrías ajustadas de los complejos con sodio indican especies polinucleares (capítulo 9), es probable un esquema cooperativo de coordinación, donde varios grupos fosfato contribuyan a la unión de los distintos iones Na^+. No obstante, este efecto es diferente para cada señal, por lo que los distintos grupos fosfatos se asociarán de manera diferencial al metal.

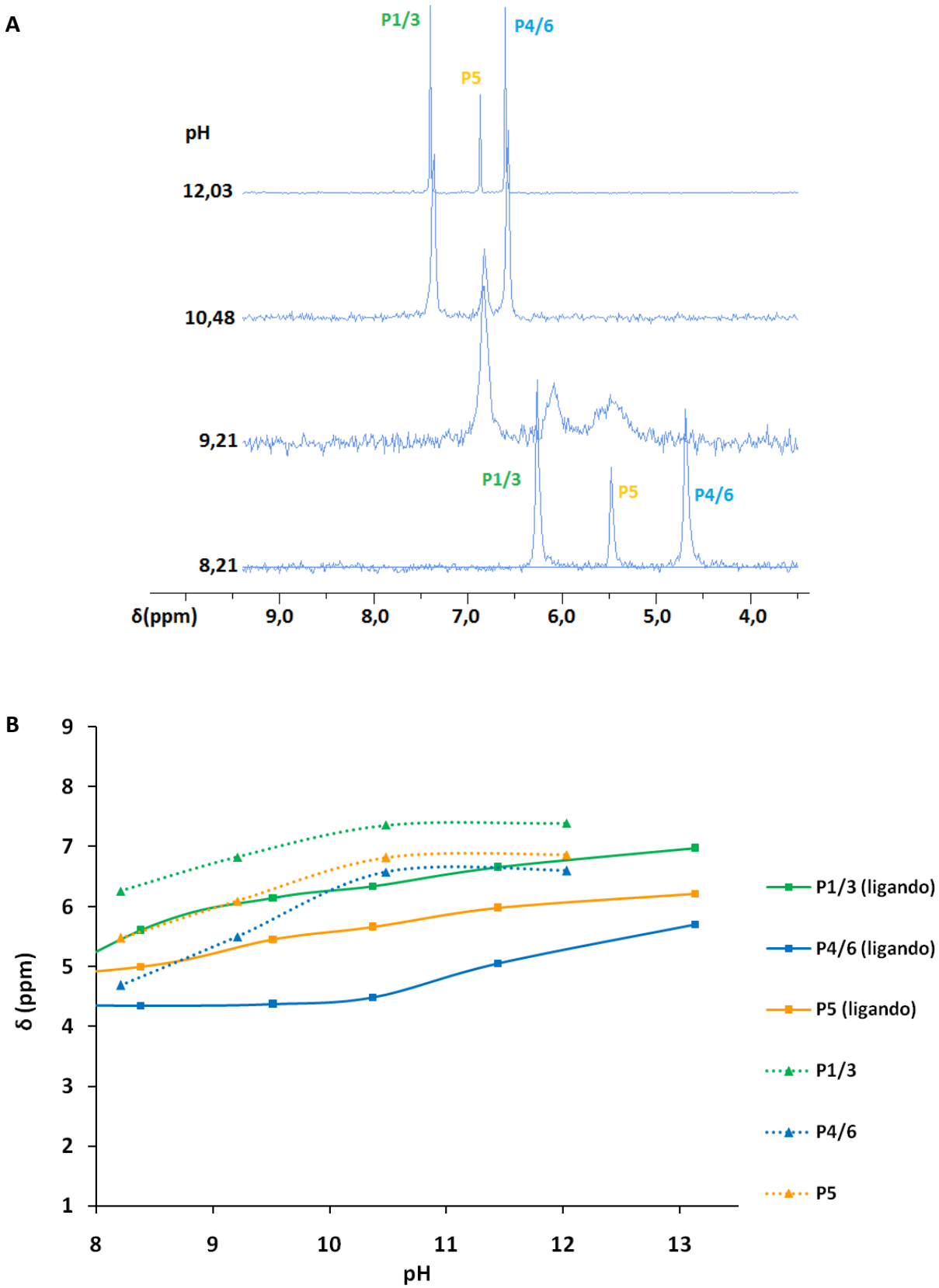


Figura 10.6. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ en función del pH, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 4,8 mM, [Na^+] = 500 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH en ausencia (líneas continuas) y presencia de Na^+ (líneas discontinuas).

Con el fin de estimar la contribución particular de los procesos de protonación y complejación sobre los valores de δ, se ajustaron los datos espectroscópicos por RMN a un modelo de especies químicas. Los resultados, resumidos en la tabla 10.5, son bastante similares a los obtenidos a partir de los datos potenciométricos (capítulo 9). Más aún, en conjunto con las constantes de protonación calculadas (tabla 10.1), reproducen satisfactoriamente el comportamiento de las curvas de δ = f(pH) (figura 10.7). En las condiciones establecidas, los complejos detectados son todos polinucleares, de fórmula general $[M_i(H_jL)]^{(10-i-j)-}$ con *i:j* = (2:2), (3:1) y (4:0).

Tabla 10.5. Logaritmo de las constantes de formación ajustadas para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+, a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

Equilibrio	log *K*	σ
$4\ Na^+ + L^{10-} \leftrightarrow [Na_4L]^{6-}$	6,58(3)	0,001
$3\ Na^+ + HL^{9-} \leftrightarrow [Na_3(HL)]^{6-}$	4,73(2)	
$2\ Na^+ + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Na_2(H_2L)]^{6-}$	2,41(1)	

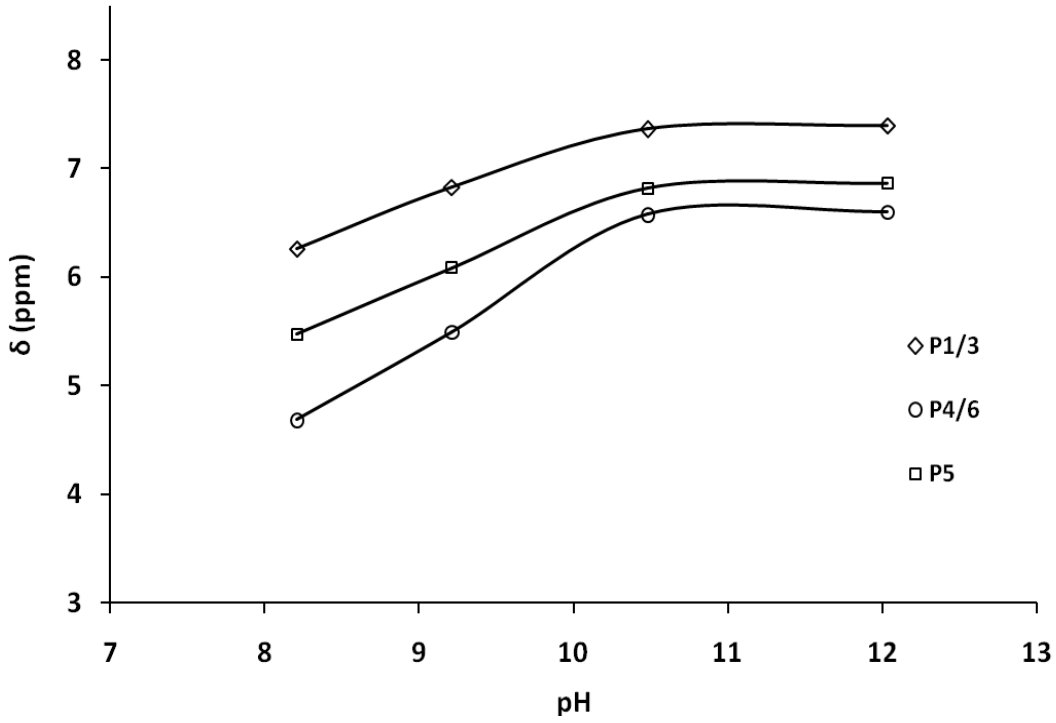


Figura 10.7. Ajuste de los datos experimentales de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+, a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M. La curva continua corresponde al modelo teórico.

En condiciones de exceso de catión metálico, las especies complejas comienzan a ser detectadas por encima de pH = 7, aunque el ligando no se encuentra completamente asociado al metal hasta valores de pH por encima de 9 (figura 10.8). En concordancia con los resultados expuestos en el capítulo 9, a pH cercano al del citosol y núcleo celular, se predice la presencia de las especies H_4L^{6-}, H_3L^{7-} y $[M_2(H_2L)]^{6-}$.

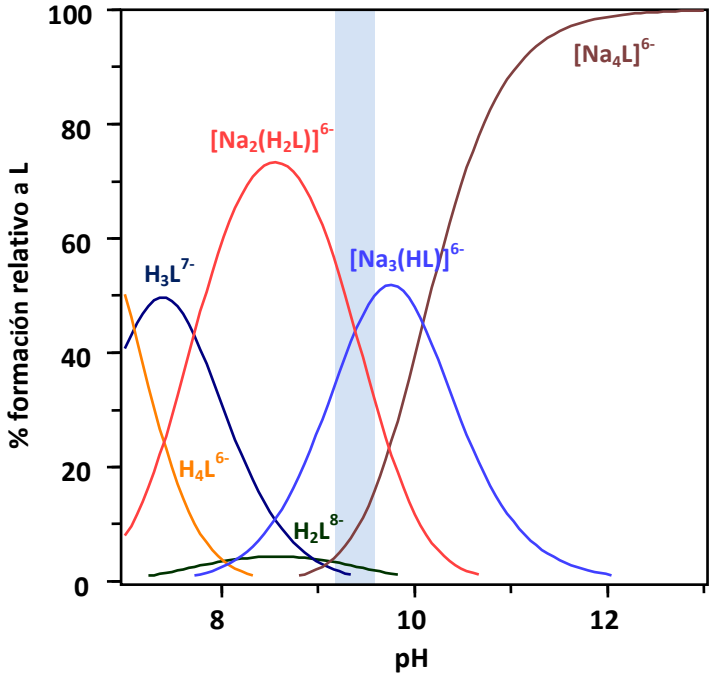


Figura 10.8. Diagrama de distribución de especies para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 4,8 mM, [Na^+] = 500 mM). Se resalta la zona de transición conformacional.

3.2.2. Secuencia de complejación

Los desplazamientos químicos ajustados para cada especie detectada se detallan en la tabla 10.6. Se muestran también, para facilitar el análisis del sistema, la variación de estos δ individuales con los procesos sucesivos de protonación (y pérdida de metal) y complejación (a partir de la especie del ligando en el mismo estado de protonación).

Si se analizan en conjunto los valores obtenidos se observan dos tendencias generales. En primer término, las señales reducen su desplazamiento químico a medida que disminuye el pH. Esto encuentra explicación en la naturaleza de las especies complejas que se suceden de derecha a izquierda en el diagrama de

distribución de especies de la figura 10.8. A medida que disminuye el pH, no sólo ocurre la protonación de los complejos, sino además la pérdida progresiva de iones Na^+. De esta forma, los valores de $\Delta\delta_{prot}$ son, en general, negativos. En segundo lugar, $\Delta\delta_{compl}$ es en la mayoría de los casos una magnitud positiva. Como se estableció para los sistemas fitato-ion alcalino, esto implica un desblindaje del átomo de fósforo por polarización de la densidad electrónica de los grupos fosfato hacia el ion positivo.

Tabla 10.6. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Na_4L]^{6-}$	7,395	6,598	6,868
$[Na_3(HL)]^{6-}$	7,364	6,688	6,813
$[Na_2(H_2L)]^{6-}$	6,481	4,680	5,588
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Na_4L]^{6-}$	---	---	---
$[Na_3(HL)]^{6-}$	-0,031	0,090	-0,055
$[Na_2(H_2L)]^{6-}$	-0,883	-2,008	-1,225
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Na_4L]^{6-}$	0,394	0,821	0,632
$[Na_3(HL)]^{6-}$	0,557	1,333	0,672
$[Na_2(H_2L)]^{6-}$	0,183	0,328	-0,019

En medio fuertemente básico predomina la especie $[Na_4L]^{6-}$, la cual se asocia a valores de $\Delta\delta_{compl}$ diferentes para cada grupo fosfato. El patrón de complejación diferencial es explicable a través de una estructura de iones sodio unidos por más de un grupo fosfato a la vez, en donde cada conjunto de átomos de fósforo del ligando posea un entorno químico distinto. En línea con esto, es interesante notar que a diferencia de lo que ocurría con el complejo análogo del InsP_6, en este caso el número de grupos fosfato no coincide con la

cantidad de iones sodio unidos. Este fenómeno apoya la idea de que el patrón de coordinación de los inositol fosfatos no debe ser, seguramente, establecido por interacciones fosfato-metal simples 1 a 1. El esquema de coordinación cooperativo surgirá varias veces en el análisis estructural de los complejos Ins*P*-M(I)/M(II)/M(III), debido a que permite que los cationes se ubiquen en "cavidades" negativas preformadas, aliviando la repulsión fosfato-fosfato. En particular para esta especie, los grupos en C4/6 son los que se encuentran más involucrados en el enlace, aunque P1/3 y P5 participan activamente.

La protonación del complejo tetrasódico, genera la remoción de un ion Na^+. Dado que los valores de $\Delta\delta_{prot}$ son menores para P1/3 y P5, es probable que ambos liberen al catión metálico que unían y compartan el protón entrante mediante un enlace de hidrógeno. No obstante, los valores son pequeños, lo que sólo podría tener una explicación en la existencia de algún rearreglo interno de los iones sodio restantes, que compense la baja esperada en los desplazamientos químicos del ligando por protonación y pérdida de metal. Asimismo, un aspecto estructural interesante surge del análisis topológico de esta especie. Para que P1/3 y P5 puedan compartir un protón a través del espacio, es necesario que la especie se encuentre mayoritariamente bajo el estado conformacional 5a1e. Paralelamente a esto, los valores de $\Delta\delta_{compl}$, asociados al proceso $HL^{9-} \rightarrow [Na_3(HL)]^{6-}$, son bastante más importantes para P4/6 que para P1/3 y P5. Esto es causado no sólo por la unión de los tres cationes metálicos, sino además por la transferencia de un protón desde P4/6 (microespecie mayoritaria HL^{9-}(4/6)) hacia el espacio entre P1/3 y P5 en el complejo.

La transformación de la especie $[Na_3(HL)]^{6-}$ a $[Na_2(H_2L)]^{6-}$ está mediada por un nuevo intercambio Na^+ - H^+. Siguiendo los valores ajustados de $\Delta\delta_{prot}$, la protonación se daría preferentemente sobre P4/6, por lo que es esperable que se libere el ion metálico que ambos compartían en la especie 5a1e $[Na_3(HL)]^{6-}$. De forma interesante, P1/3 y P5 se ven realmente muy afectados por este proceso, lo que implica una conexión espacial de ambos con P4/6, algo que puede darse, sin la generación de gran tensión en el anillo, si todos los grupos se encuentran ecuatoriales. Esto proporcionaría una explicación al hecho de que los valores de $\Delta\delta_{prot}$, calculados para el proceso 5a1e $[Na_3(HL)]^{6-} \rightarrow$ 1a5e $[Na_2(H_2L)]^{6-}$, son bastante mayores en valor absoluto que los correspondientes

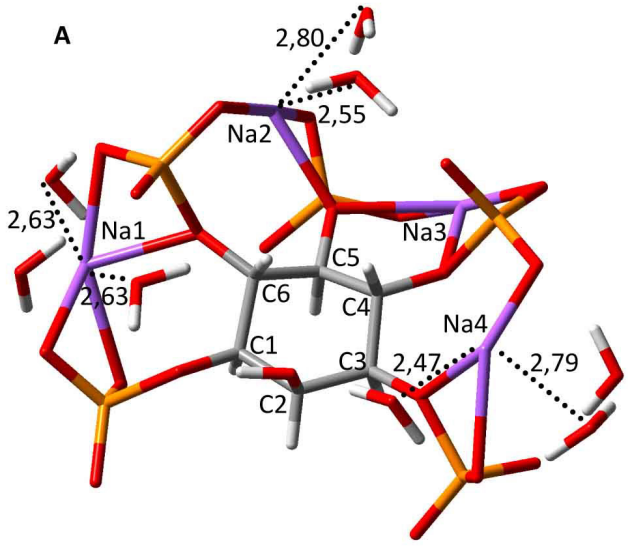
$\Delta\delta_{compl}$, los cuales se determinan para el cambio 1a5e H_2L^{8-} → 1a5e $[Na_2(H_2L)]^{6-}$, en donde ambas especies comparten el mismo estado conformacional. Si se observa la figura 10.6A, el espectro a pH = 9,21 presenta el ensanchamiento de bandas y el aumento del ruido espectral característicos del proceso de transición conformacional del ligando, condiciones en donde, según el diagrama de especies de la figura 10.8, coexisten en solución las especies $[Na_3(HL)]^{6-}$ y $[Na_2(H_2L)]^{6-}$. De acuerdo con lo que se observaba para los sistemas conteniendo fitato, la presencia de un ion alcalino disminuye el rango de pH en el cual opera el cambio conformacional de las diversas especies. En consideración de la similitud ya discutida entre los iones sodio y potasio, esta es, seguramente, la causa principal de que mientras que en este trabajo, en ausencia de ion metálico, el ligando cambia su conformación a pH cercano a 11, Riley *et al*. hayan reportado este proceso en presencia de exceso de ion K^+ a partir de pH = 9 [5].

3.2.3. Características estructurales generales de los complejos

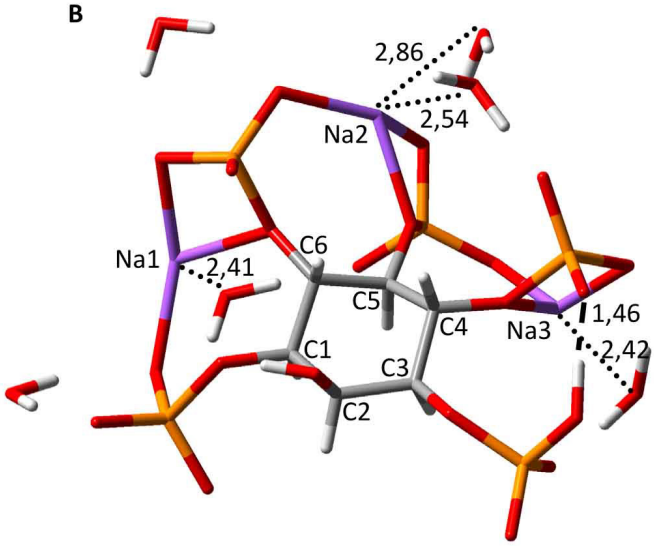
A partir de la información estructural adquirida, se realizó el modelado molecular en fase gaseosa de ambos estados conformacionales para los tres complejos detectados. Para considerar los posibles efectos del solvente, este procedimiento se repitió considerando dos moléculas de agua de coordinación por cada ion metálico. En la figura 10.9 se muestran los resultados para éstos últimos cálculos.

Analizadas en conjunto, las geometrías obtenidas revelan el carácter cooperativo del enlace fosfato-metal, en donde varios grupos negativos unen varios iones metálicos al mismo tiempo, conformando una red de interacciones que soporta la gran estabilidad termodinámica de las especies. Sin embargo, la afinidad de los iones metálicos por las moléculas de agua es bastante baja. Durante los cálculos de optimización, las moléculas de agua de coordinación se alejan del metal y se unen a la especie compleja por fuertes enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato. De hecho, las diferencias estructurales entre las geometrías en fase gaseosa y las correspondientes en presencia de aguas de coordinación son mínimas, por lo que los iones sodio no sufren un cambio sustancial en el entorno de coordinación (no se muestra). En este sentido, es esperable que estos complejos Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ posean un carácter

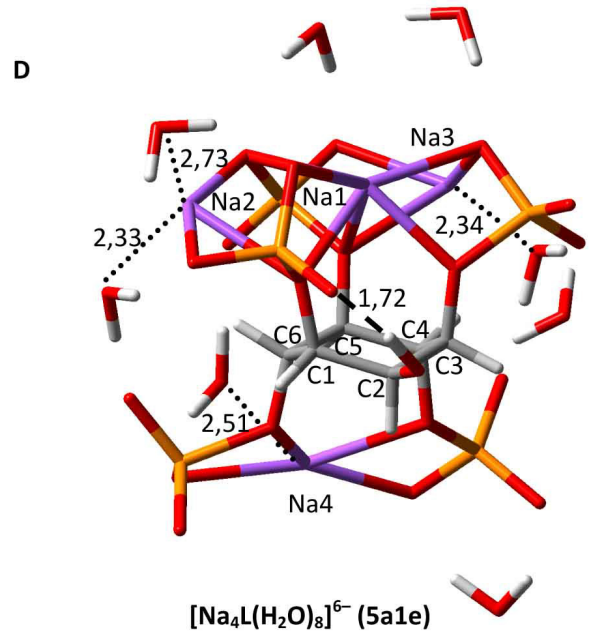
importante de par iónico, en donde los grupos fosfato se unen a los diversos cationes mediante la formación de huecos negativos, priorizando la atracción de tipo electrostático y sin la necesidad de completar estrictamente todas las posiciones del poliedro de coordinación. El agua hidrata a la especie aniónica como un todo, y en la dinámica de la solución podrá en algunos casos completar las posiciones de coordinación de los cationes o unirse a los grupos fosfato que conforman los "huecos negativos" mediante fuertes enlaces de hidrógeno.



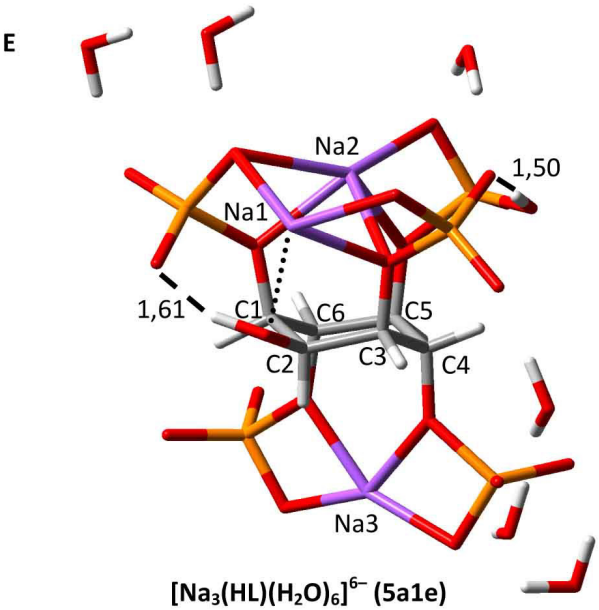
$[Na_4L(H_2O)_8]^{6-}$ (1a5e)



$[Na_3(HL)(H_2O)_6]^{6-}$ (1a5e)



$[Na_4L(H_2O)_8]^{6-}$ (5a1e)



$[Na_3(HL)(H_2O)_6]^{6-}$ (5a1e)

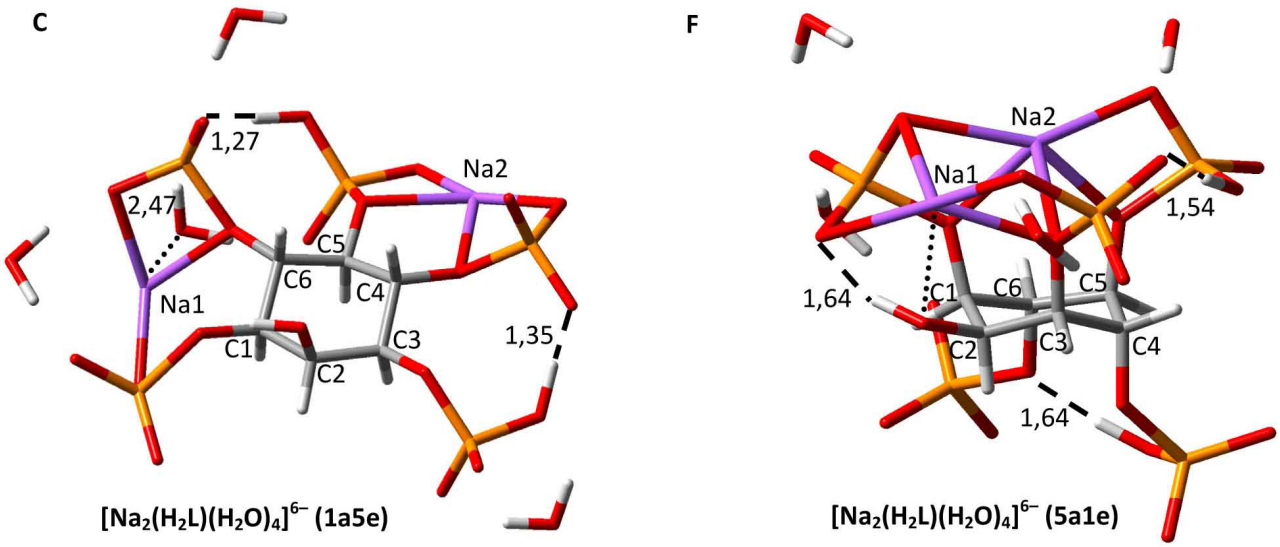


Figura 10.9. Geometrías RB3LYP/LANL2DZ optimizadas para ambos estados conformacionales de los complejos Na^+-Ins(1,3,4,5,6)P_5. $[Na_4L(H_2O)_8]^{6-}$ (A,D), $[Na_3(HL)(H_2O)_6]^{6-}$ (B,E), $[Na_2(H_2L)(H_2O)_6]^{6-}$ (C,F). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas, mientras que los enlaces metal-aguas de hidratación y metal-grupo OH en C2 se representan con líneas punteadas. En ambos casos se detalla la distancia correspondiente en Å.

Revisando en detalle las geometrías de la figura 10.9, se desprenden algunos aspectos interesantes en relación con los resultados experimentales de RMN ya discutidos. En la especie $[Na_4L]^{6-}$ (figuras 10.9A y D), todos los fosfatos están asociados por lo menos a un catión, lo que explica los valores positivos de $\Delta\delta_{compl}$ correspondientes (tabla 10.6). No obstante, el estado 5a1e parece ser el que mejor da cuenta de la diferencia en el entorno del átomo de fósforo en P4/6 respecto del de P1/3 y P5.

Si se compara la geometría optimizada de esta especie con la de su análoga de InsP_6, $[Na_6L]^{6-}$, se advierte que la remoción de P2 en el ligando provoca la pérdida de dos iones sodio (figura 10.10). Atendiendo a la estructura de ambos complejos, los cationes metálicos liberados corresponderían a aquellos que en el estado más estable, 5a1e, se encuentran asociados a este mismo fosfato en $[Na_6L]^{6-}$. Esta concordancia apoya, de hecho, la hipótesis de la conformación 5a1e como la más estable a alto pH en ambos sistemas, Ins(1,3,4,5,6)P_5-M^+ e InsP_6-M^+.

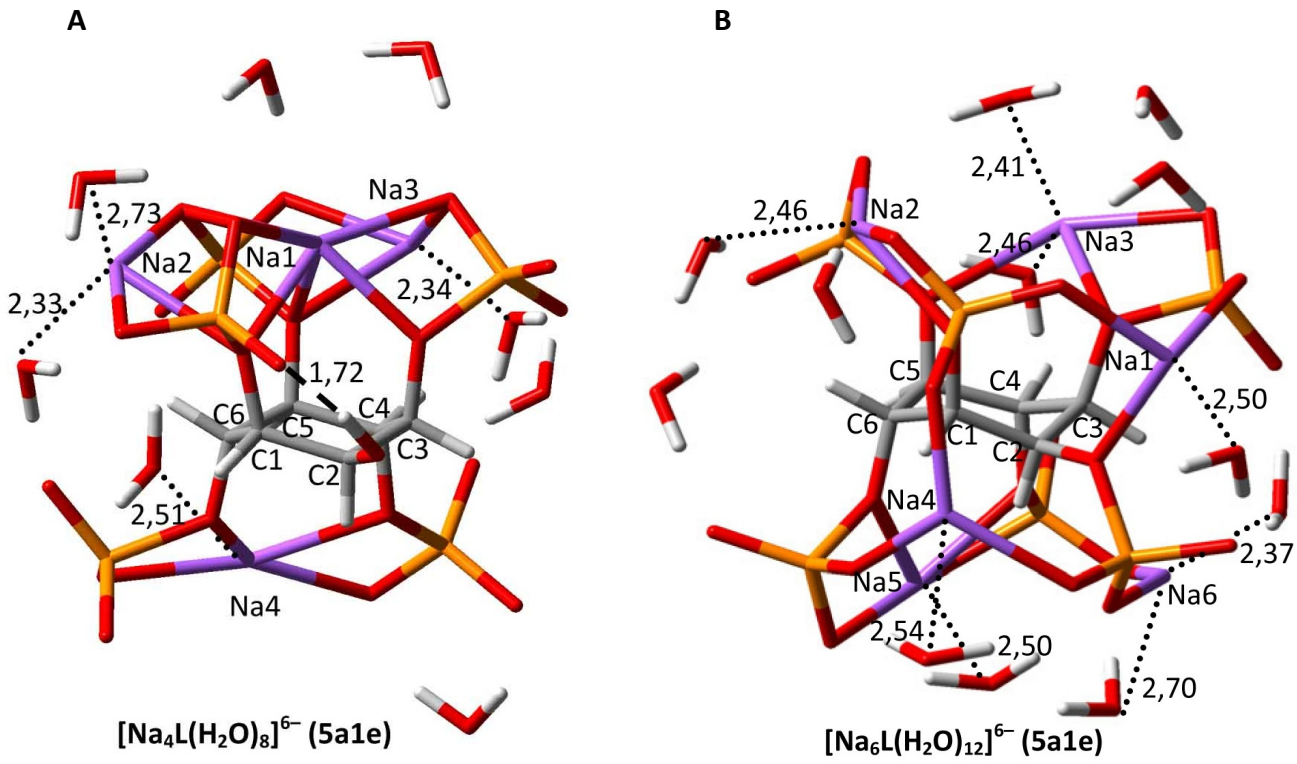


Figura 10.10. Geometrías RB3LYP/LANL2DZ optimizadas para la conformación 5a1e de las especies $[Na_4L]^{6-}$ del Ins(1,3,4,5,6)P_5 (A) y $[Na_6L]^{6-}$ del InsP_6 (B). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas, mientras que los enlaces metal-aguas de hidratación y metal-grupo OH en C2 se representan con líneas punteadas. En ambos casos se detalla la distancia correspondiente en Å.

Con la protonación de $[Na_4L]^{6-}$ se libera un ion sodio del espacio P1/3-P5, dando lugar a la especie $[Na_3(HL)]^{6-}$, cuyas geometrías optimizadas corresponden a las figuras 10.9B y E. De ambas conformaciones, aquella correspondiente al estado 5a1e reconcilia en mejor medida los resultados teóricos y experimentales. Es en este estado en donde P1/3 y P5 se encuentran a la distancia adecuada para la compartición del protón entrante, provocando un mínimo de alteración en el entorno de P4/6 (bajo valor de $\Delta\delta_{prot}$). Asimismo, como se predijo a partir de los datos de RMN, la liberación del catión Na^+ genera un rearreglo de los cationes que opera por encima del anillo. Como se observa comparando las figuras 10.9D y E, en esta secuencia los iones sodio cambian de posición, liberándose de sus moléculas de agua de hidratación y uniéndose más fuertemente a P1/3 y P5. En efecto, con esta redistribución interna los iones metálicos se acercan (en promedio 0,1 Å) a los grupos donores cargados, contrarrestando el efecto de la protonación de ambos grupos, y haciendo que

sus valores de $\Delta\delta_{prot}$ sean apenas negativos. Finalmente, es la conformación axial la que, ciertamente, logra un franco acuerdo con la transferencia completa de un protón desde P4/6 hacia P1/3 y P5 observada en el proceso $HL^{9-} \rightarrow [Na_3(HL)]^{6-}$, explicando el alto valor de $\Delta\delta_{compl}$ para P4/6.

Como era previsible desde un punto de vista energético, el segundo protón se une lo más alejado posible del primero, sobre los fosfatos en C4/6, lo que induce la pérdida de un ion Na^+ ubicado entre ambos grupos (figura 10.9C y F). En contraposición a lo discutido en el párrafo anterior, en este caso la conformación que mejor da cuenta de los resultados espectroscópicos es la 1a5e. Solamente en este caso se permite la interacción de P4/6 con el resto de los fosfatos mediante dos enlaces de hidrógeno, fenómeno que se derivaba de los valores de $\Delta\delta_{prot}$ ajustados. Asimismo, cuando todos los grupos fosfato están en posición ecuatorial, la ubicación de los cationes sodio y los protones sobre el ligando es tal que explica satisfactoriamente el orden de los valores de $\Delta\delta_{compl}$. Como se advierte por comparación de las figuras 10.3C y 10.9C, en el proceso $H_2L^{8-} \rightarrow [Na_2(H_2L)]^{6-}$ P4 y P6 se alejan de sendos protones, y se unen a su vez a un ion Na^+. Esto hace que su señal sea la más afectada por la complejación. Por otra parte, P1/3 y P5 se protonan y se unen a un ion sodio a la vez, por lo que los efectos sobre los desplazamientos químicos se cancelan parcialmente, dando valores de $\Delta\delta_{compl}$ más pequeños. Afinando el análisis, con la coordinación P1/3 pierde además el enlace de hidrógeno con el grupo -OH en C2, haciendo que el valor de su $\Delta\delta_{compl}$ sea un poco mayor que el correspondiente a P5.

3.2.4. Determinantes estructurales del cambio conformacional

Para finalizar el análisis es necesario realizar un breve comentario respecto de los factores energéticos asociados con el cambio conformacional, los cuales estarán modulados por los aspectos estructurales ya explicados. En la figura 10.11 se muestra la diferencia energética entre ambas conformaciones, tanto en fase gaseosa como en presencia de aguas de coordinación, para las tres especies complejas con sodio. El cambio conformacional se predice, desde el punto de vista teórico, entre las especies $[Na_2(H_2L)]^{6-}$ y $[Na_3(HL)]^{6-}$, en total acuerdo con los resultados experimentales.

Apenas por encima de pH neutro el ligando se asocia a dos iones sodio y dos protones. Este número de H^+ es capaz, como ya se mencionó, de estabilizar la forma 1a5e del ligando. Si se comparan las figuras 10.9C y F, el estado ecuatorial es el más estable para $[Na_2(H_2L)]^{6-}$, permitiendo, aun con la inclusión de dos cationes metálicos, minimizar la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno formados, con un mínimo de tensión del anillo carbonado (ver $X_{O\text{-}H}$ y $\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ en la tabla 10.7). Más aún, la complejación no genera, de hecho, un cambio estructural demasiado importante respecto de la microespecie mayoritaria con n = 2 (comparar figuras 10.3C y 10.9C); los dos iones alcalinos complejados parecen simplemente aliviar la repulsión interfosfato.

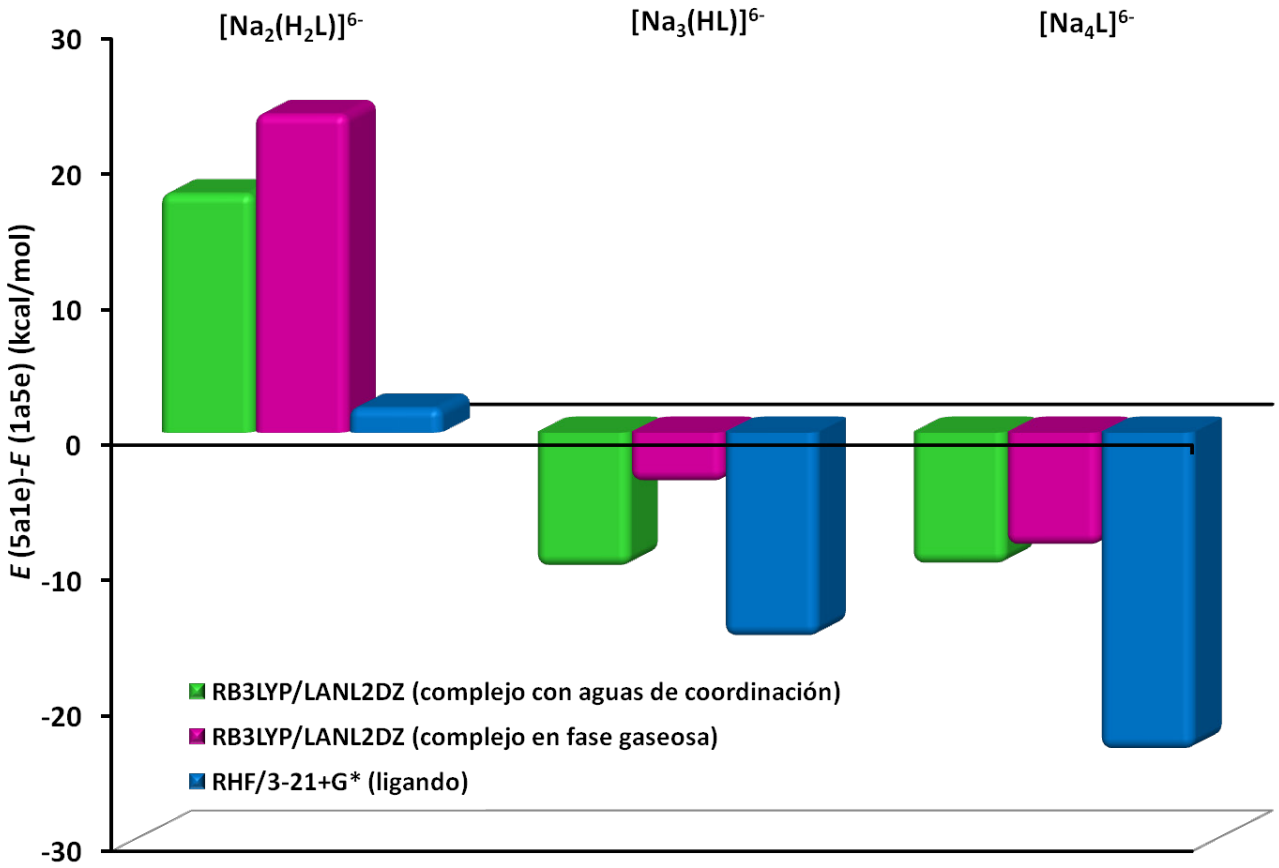


Figura 10.11. Diferencia de energía entre ambos estados conformacionales de los complejos Na^+-Ins(1,3,4,5,6)P_5, en fase gaseosa y considerando dos aguas de hidratación por ion metálico. Se muestran además los valores obtenidos para el mismo parámetro en ausencia de ion metálico.

A medida que el ligando se deprotona y se asocia progresivamente a más iones Na^+ las características del sistema cambian. Cuando sólo se tiene un protón, el factor relacionado con la formación de fuertes enlaces de hidrógeno comienza a tener menor peso relativo, haciendo que los valores de X_{O-H} de ambos confórmeros se acerquen entre sí (tabla 10.7). Paralelamente, se hacen más importantes las interacciones entre los grupos fosfato y los iones Na^+. En este aspecto, el estado 5a1e tiene las características adecuadas para la formación de "cajas aniónicas" que envuelven casi totalmente a los iones (figura 10.9), a la vez que separa más eficientemente los grupos altamente cargados con una mínima tensión del anillo carbonado (mayor valor de X_{P-P} y levemente menor de $\Delta\theta_{axial-axial}$ respecto del estado 1a5e, tabla 10.7). En particular, el hueco que forman P4 y P6 es muy apropiado para la unión del metal; en efecto, es aquel que al recibir el ion alcalino gatilla el cambio conformacional hacia el estado axial. Cuando se pierde el último protón, queda un hueco negativo ya preformado para recibir al ion sodio que ingresa, obteniéndose el complejo de la figura 10.9D.

Tabla 10.7. Parámetros estructurales para ambas conformaciones de las especies complejas Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ (geometrías RB3LYP/LANL2DZ).

	X_{O-H} (Å)[a]			X_{P-P} (Å)[b]			$\Delta\theta_{axial-axial}$ (°)[c]	
Especies	1a5e	5a1e		1a5e	5a1e		1a5e	5a1e
$[Na_4L]^{6-}$	---	---		5,19	5,94		15	14
$[Na_3(HL)]^{6-}$	1,46	1,55		---	---		15	13
$[Na_2(H_2L)]^{6-}$	1,31	1,61		---	---		7	15

[a] X_{O-H} representa la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en Å. [b] X_{P-P} corresponde a la distancia promedio, en Å, entre los átomos de fósforo de los grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes. [c] $\Delta\theta_{axial-axial}$ es la desviación promedio, desde el valor esperado de 180°, de todos los ángulos diedros formados por los grupos axiales de carbonos adyacentes en °.

Finalmente, si se comparan los valores de ΔE para los complejos, con aquellos obtenidos para las especies del ligando correspondientes (figura 10.11), se advierte que el proceso de complejación, sea en fase gaseosa o considerando aguas de hidratación, favorece en todos los casos el estado 1a5e. Esto puede

explicarse a partir de la discusión energético-estructural realizada para el ligando. El estado ecuatorial acerca demasiado los grupos fosfato entre sí, por lo que sólo es estable cuando se tienen dos o más protones unidos al ligando. En este sistema, la asociación de los iones metálicos alivia la repulsión interfostato en mucho mayor grado para la conformación 1a5e que 5a1e. Por otra parte, la inclusión de los efectos del solvente favorece moderadamente el estado axial respecto de las geometrías en fase gaseosa. Esto se debe a una interacción diferencial con el solvente por parte de ambos estados conformacionales. Si se observan las estructuras optimizadas de la figura 10.9, el estado 1a5e mejora la afinidad de los iones metálicos por las aguas de coordinación, ya que deja a los cationes más expuestos a la solución, afectando entonces la contribución energética debida a las interacciones fosfato-ion metálico.

3.3. Sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+}

3.3.1. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

Las condiciones de los experimentos de RMN de ^{31}P para este sistema se establecieron utilizando la misma metodología aplicada en presencia de sodio. Los resultados se muestran en la figura 10.12A. La resolución de los espectros resultó ser muy buena, asignándose las señales mediante comparación con las correspondientes al ligando y su seguimiento con el pH. De la misma manera que se observó en presencia de Na^+, se conserva en todo momento el mismo patrón de bandas, por lo que el ligando y las especies complejas comparten la misma simetría de los grupos ionizables: P1/3, P4/6 y P5.

La comparación entre las curvas de desplazamiento químico en función del pH, en presencia y ausencia de magnesio, se muestra en la figura 10.12B. Las señales sufren un corrimiento hacia mayores o menores campos dependiendo del pH del medio. Este comportamiento complejo ya se presentó en todos los sistemas InsP_6-M(II)/(III), y tiene origen en los múltiples procesos de complejación y desplazamiento de protones, los cuales afectan de manera inversa al valor de δ [8]. Además, en estos sistemas se ha encontrado un efecto de desblindaje a distancia de los grupos fosfato, causado fundamentalmente por la polarización de la densidad electrónica del ligando hacia el ion metálico.

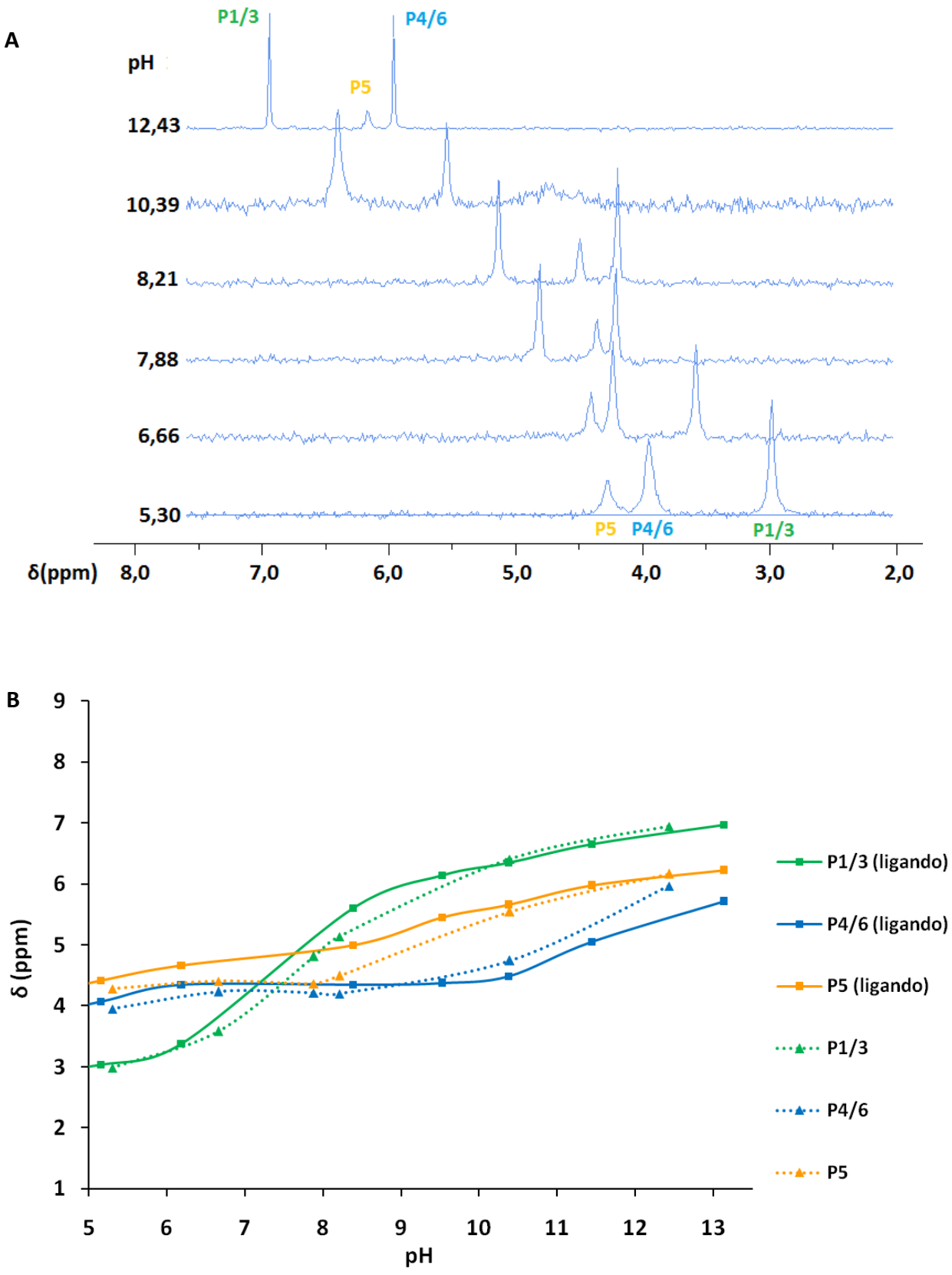


Figura 10.12. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+} en función del pH, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 2,48 mM, [Mg^{2+}] = 0,99 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH en ausencia (líneas continuas) y presencia de Mg^{2+} (líneas discontinuas).

En conjunto, las curvas de la figura 10.12B dan cuenta de dos aspectos generales. En primer lugar, el desplazamiento de las mismas en presencia del ion metálico es diferente para cada señal, lo que evidencia complejación en todo el rango de estudio. Asimismo, hacia medio fuertemente básico, la señal más afectada es la de P4/6, mientras que P5 y P1/3 se ven moduladas en mayor proporción por debajo de pH = 10.

Las curvas de la figura 10.12B en presencia de metal se ajustan entonces a un modelo de especies, de forma de realizar un análisis cuantitativo de la interacción Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+}. Los resultados, que se muestran en la figura 10.13A, evidencian residuales muy pequeños (σ = 0,038), a la vez que las especies detectadas reproducen de forma altamente satisfactoria el comportamiento de todas las señales con el pH. En presencia de Mg^{2+}, se detectan para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 los complejos especificados en la tabla 10.8. Las constantes de equilibrio obtenidas señalan la formación de especies de estequiometría 1:1 metal:ligando, muy estables y altamente cargadas, de fórmula general $[Mg(H_jL)]^{(10-2-j)-}$ con $1 \leq j \leq 4$.

Tabla 10.8. Logaritmo de las constantes de formación ajustadas para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+}, a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

Equilibrio	log *K*	σ
$Mg^{2+} + HL^{9-} \leftrightarrow [Mg(HL)]^{7-}$	5,3(1)	0,038
$Mg^{2+} + H_2L^{8-} \leftrightarrow [Mg(H_2L)]^{6-}$	4,18(4)	
$Mg^{2+} + H_3L^{7-} \leftrightarrow [Mg(H_3L)]^{5-}$	3,1(2)	
$Mg^{2+} + H_4L^{6-} \leftrightarrow [Mg(H_4L)]^{4-}$	2,06(7)	

Como resultado, en la figura 10.14 se muestra la distribución de especies en las condiciones experimentales de la corrida espectroscópica ([L] = 2,48 mM, [Mg] = 0,99 mM). Se predice en este caso la formación de los complejos a partir de pH = 4, los cuales aumentan su predominancia a medida que disminuye su grado de protonación. A valores de pH cercanos al correspondiente al del núcleo y citosol celulares, las formas mayoritarias del ligando son $[Mg(H_3L)]^{5-}$, H_4L^{6-} y H_3L^{7-}.

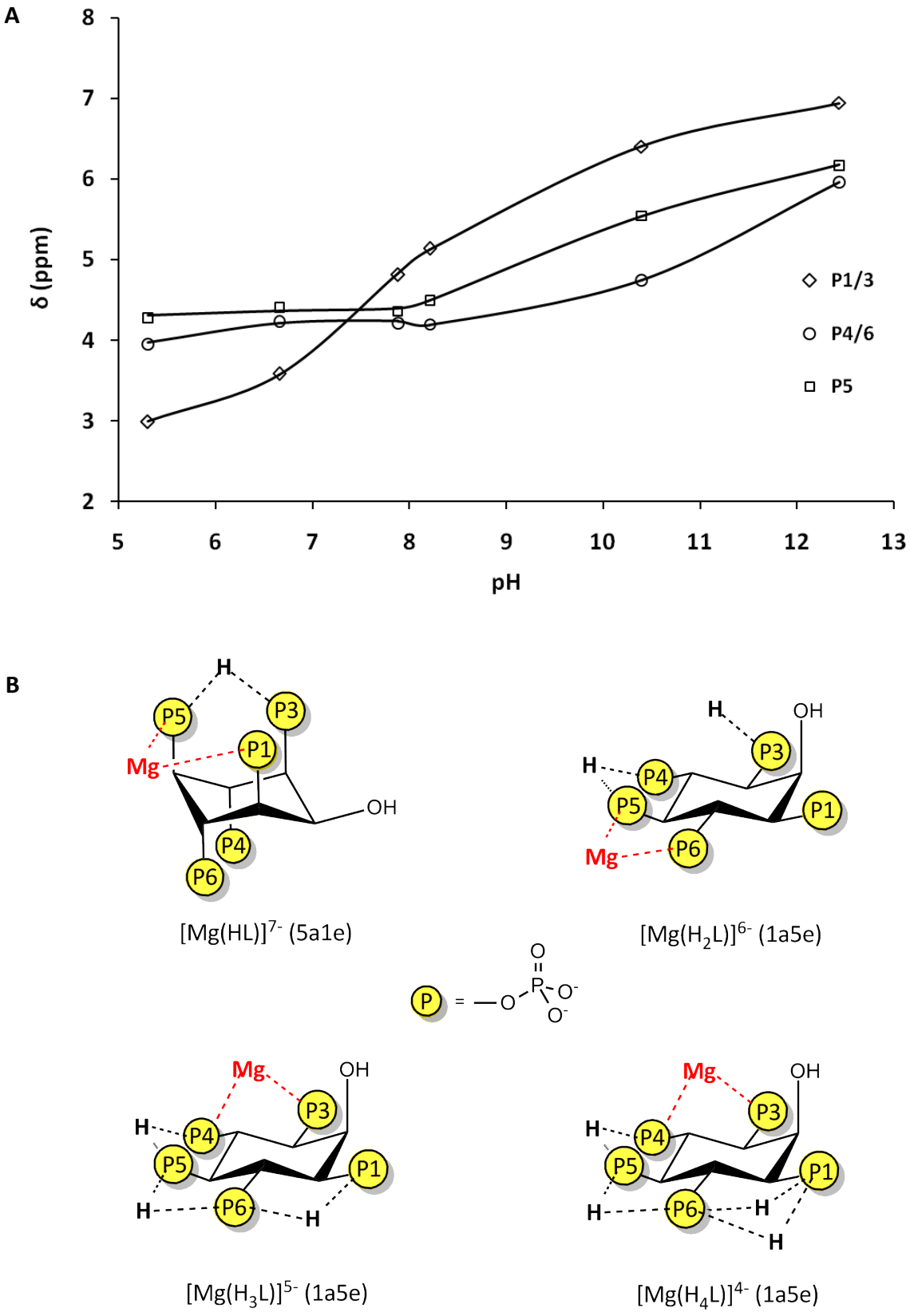


Figura 10.13. (A) Ajuste de los datos de δ *vs*. pH para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. La curva continua corresponde al modelo teórico. (B) Esquema de la ubicación más probable del ion Mg^{2+} y los protones en algunos de los complejos analizados.

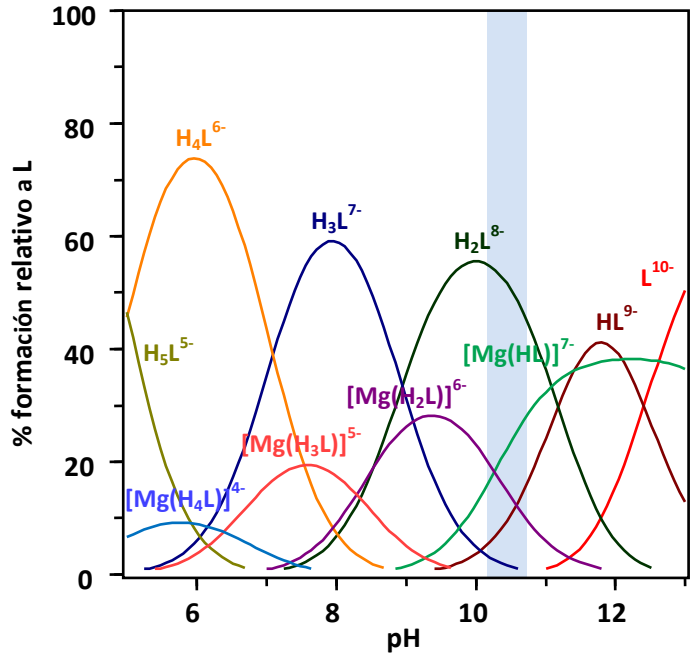


Figura 10.14. Diagramas de distribución de especies para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M ([L] = 2,48 mM, [Mg^{2+}] = 0,99 mM). Se resalta la zona de cambio conformacional.

3.3.2. Aspectos estructurales del proceso de complejación

Como información adicional de este ajuste teórico, se obtienen los desplazamientos químicos individuales y su variación con los diversos procesos de protonación y complejación en solución. Los resultados finales se especifican en la tabla 10.9.

Un análisis en conjunto de los valores de $\Delta\delta_L$ (variación en los valores de δ debido al proceso de complejación desde L^{10-}), muestra un cambio significativo del entorno de los átomos de fósforo entre las especies $[Mg(HL)]^{7-}$ y $[Mg(H_2L)]^{6-}$. Esto se ha asociado para otros sistemas de esta tesis a un cambio conformacional operativo entre ambos complejos. De hecho, de los espectros de la figura 10.12A, el correspondiente a pH = 10,39 presenta el ensanchamiento y aumento del ruido de las señales característicos del equilibrio conformacional [5]. En total acuerdo, a este pH ambos complejos se encuentran coexistiendo en solución, como se observa en la figura 10.14. Se concluye, por tanto, que la especie $[Mg(HL)]^{7-}$ se encuentra mayoritariamente

en el estado 5a1e, mientras que el resto presenta la conformación opuesta, 1a5e.

Tabla 10.9. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$, $\Delta\delta_{comp}$ y $\Delta\delta_L$ para el sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+}, a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{7-}$	7,031	6,665	6,181
$[Mg(H_2L)]^{6-}$	5,850	3,195	4,217
$[Mg(H_3L)]^{5-}$	2,718	4,275	2,564
$[Mg(H_4L)]^{4-}$	2,128	2,034	2,728
	$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{7-}$	---	---	---
$[Mg(H_2L)]^{6-}$	-1,181	-3,470	-1,964
$[Mg(H_3L)]^{5-}$	-3,132	1,080	-1,653
$[Mg(H_4L)]^{4-}$	-0,589	-2,240	0,163
	$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{7-}$	0,224	1,310	0,039
$[Mg(H_2L)]^{6-}$	-0,448	-1,157	-1,390
$[Mg(H_3L)]^{5-}$	-2,821	-0,066	-2,278
$[Mg(H_4L)]^{4-}$	-1,018	-2,349	-1,971
	$\Delta\delta_L$ (ppm)		
Especies	P1/3	P4/6	P5
$[Mg(HL)]^{7-}$	0,030	0,888	-0,056
$[Mg(H_2L)]^{6-}$	-1,152	-2,582	-2,019
$[Mg(H_3L)]^{5-}$	-4,284	-1,502	-3,672
$[Mg(H_4L)]^{4-}$	-4,873	-3,743	-3,509

El complejo $[Mg(HL)]^{7-}$ presenta, inesperadamente, valores positivos de $\Delta\delta_{compl}$. El gran valor de P4/6 logra explicarse a partir de un desplazamiento del protón que en HL^{9-} mayoritariamente se ubica entre ambos fosfatos, hacia los grupos

emplazados encima del anillo, P1/3 y P5. Dado que se espera que el desplazamiento químico de las señales disminuya con la complejación y protonación, es probable que P4/6 se mantenga al margen de ambos procesos. No obstante, $\Delta\delta_{compl}$ continúa siendo positivo, aunque pequeño, para los grupos sobre C1, C3 y C5. Esto podría originarse por efectos contrapuestos de aumento y disminución del campo; el primero debido a la ganancia del protón y el ion magnesio, mientras que el segundo se podría asociar al efecto de desblindaje que sufren los fosfatos no directamente unidos al centro metálico. Siguiendo este razonamiento, una posible estructura del complejo $[Mg(HL)]^{7-}$ (5a1e) involucraría los grupos P1/3 y P5 compartiendo por encima del anillo un ion magnesio y un protón, mientras que P4/6 se ve polarizado a distancia (figura 10.13B).

El segundo proceso de protonación está relacionado con la transición conformacional, provocando una alteración importante en los valores de $\Delta\delta_L$, a la vez que los correspondientes $\Delta\delta_{compl}$, determinados a partir de la especie del ligando en el mismo estado conformacional (1a5e), son sensiblemente menores. En el proceso $[Mg(HL)]^{7-} \rightarrow [Mg(H_2L)]^{6-}$, los grupos más afectados son P4/6 y P5, los que presentan los menores valores de $\Delta\delta_{prot}$. Asimismo, también presentan los $\Delta\delta_{compl}$ más bajos. Es posible que el ion magnesio esté asociado a ambos grupos ecuatoriales (figura 10.13B), y que uno de los protones, que en la microespecie mayoritaria H_2L^{8-}(46) se encontraba sobre P4 ó P6, se desplace hacia P1 ó P3 ($\Delta\delta_{compl}$ negativo).

La formación de la especie $[Mg(H_3L)]^{5-}$ está asociada a un valor muy negativo de $\Delta\delta_{prot}$ para P1/3 y P5, mientras que P4/6 se ve desblindado. Una posible explicación podría ser que el tercer protón que ingresa genere un rearreglo interno de los protones y el metal. De esta manera, ocurriría la formación de una nueva microespecie compleja, con un patrón de coordinación diferente al descrito. En detalle, el protón entrante se situaría sobre P5 ($\Delta\delta_{prot} < 0$), desplazando al magnesio hacia el hueco P1/3-P4/6 (figura 10.13B). Este fenómeno daría cuenta de la importante disminución del desplazamiento químico de la señal de P1/3 con la complejación y protonación. Para analizar en detalle este arreglo, en la figura 10.15A se muestra el modelado molecular de este posible microestado. Los resultados muestran que con esta redistribución, P4/6 tiende a alejarse del ion metálico, explicando el alto valor de su $\Delta\delta_{prot}$.

Este efecto es bastante notorio; el átomo de fósforo P1 se encuentra a 2,8 Å del magnesio, mientras que P6 se aleja hasta 3,4 Å. Esta menor participación en el enlace de P4/6 causa, asimismo, que el valor ajustado de su $\Delta\delta_{compl}$ sea significativamente más pequeño que el resto.

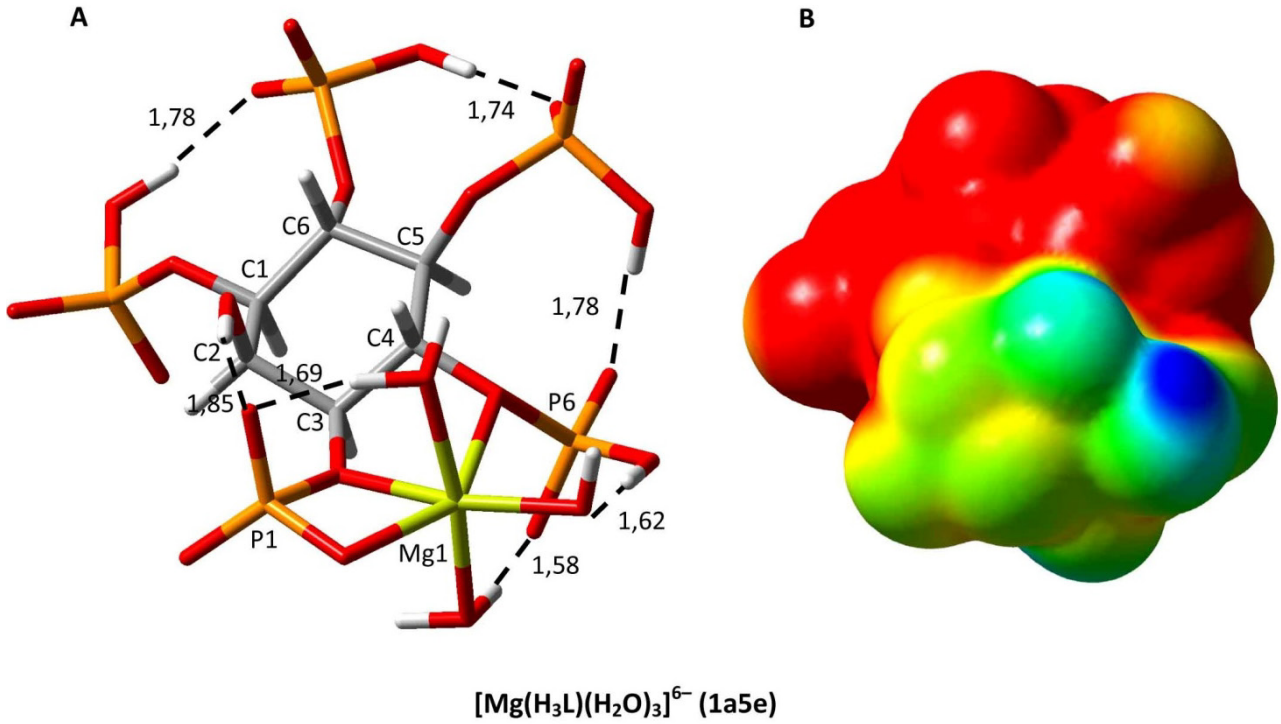


Figura 10.15. (A) Geometría RB3LYP/6-31+G* optimizada en fase gaseosa para la especie $[Mg(H_3L)]^{5-}$. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas con la distancia correspondiente en Å. En (B) se representa el potencial electrostático molecular sobre una superficie de isodensidad (0,0004 e). Las zonas en rojo implican acumulación de carga negativa, mientras que las zonas en azul representan lo contrario.

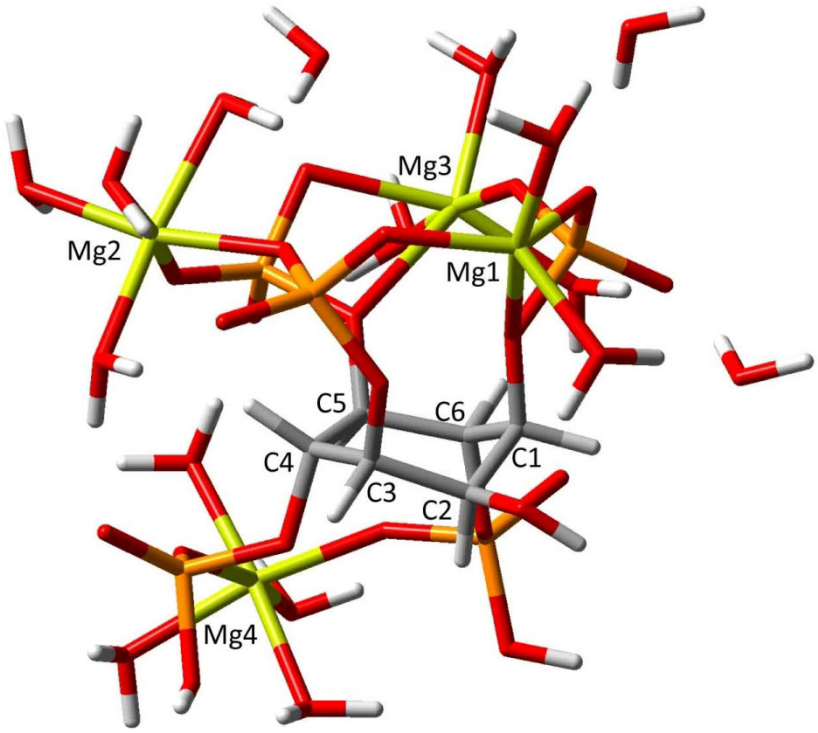
El complejo $[Mg(H_3L)]^{5-}$, representado en la figura 10.15, es relevante frente al resto ya que constituye una de las formas predominantes del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en condiciones citosólico-nucleares. El ion magnesio estaría coordinado en un entorno octaédrico distorsionado, con participación de dos grupos fosfato, uno de manera monodentada y otro bidentada, y tres aguas de coordinación. Un aspecto interesante es que ambos fosfatos, como se mencionó en el párrafo anterior, no tienen la misma contribución en la unión del metal, haciendo que el esquema de coordinación sea diferente para cada uno. La formación de la

especie compleja trae acarreado un efecto que surgía en el marco de la discusión estructural de la mayoría de los complejos InsP_6-M(II/III). Los enlaces de hidrógeno varían entre la especie del ligando (figura 10.3D) y el complejo correspondiente (figura 10.15A). Esto explica que los valores de $\Delta\delta_{compl}$ sean, en algunos casos, difíciles de interpretar, ya que suponen pequeños rearreglos internos del esquema de protonación que modulan sus magnitudes. Finalmente, el alejamiento que sufre P4/6 trae aparejada la deprotonación de una molécula de agua coordinada al ion Mg^{2+}. Este fenómeno, no incluido en el análisis hasta el momento, debe ser tenido en cuenta a la hora de la evaluación de los múltiples aspectos que explican finamente los desplazamientos químicos de las señales con la presencia del metal.

En la figura 10.15B se muestra, sobre una superficie de isodensidad, la distribución del potencial electrostático molecular para esta especie. La primera consecuencia de la unión al metal es la disminución de la carga negativa total del ligando. Asimismo, la ubicación del metal entre pares de fosfatos responde a la necesidad de aumentar la atracción electrostática metal-ligando, optimizar los enlaces alrededor del centro metálico y disminuir la repulsión entre los grupos ionizables. En consecuencia, la distribución de carga se ve bastante afectada, por lo que cualquier proteína o estructura celular que reconozca a este complejo como su sustrato deberá presentar una zona electrostática complementaria, que acompase el comportamiento bifásico que exhibe el potencial electrostático.

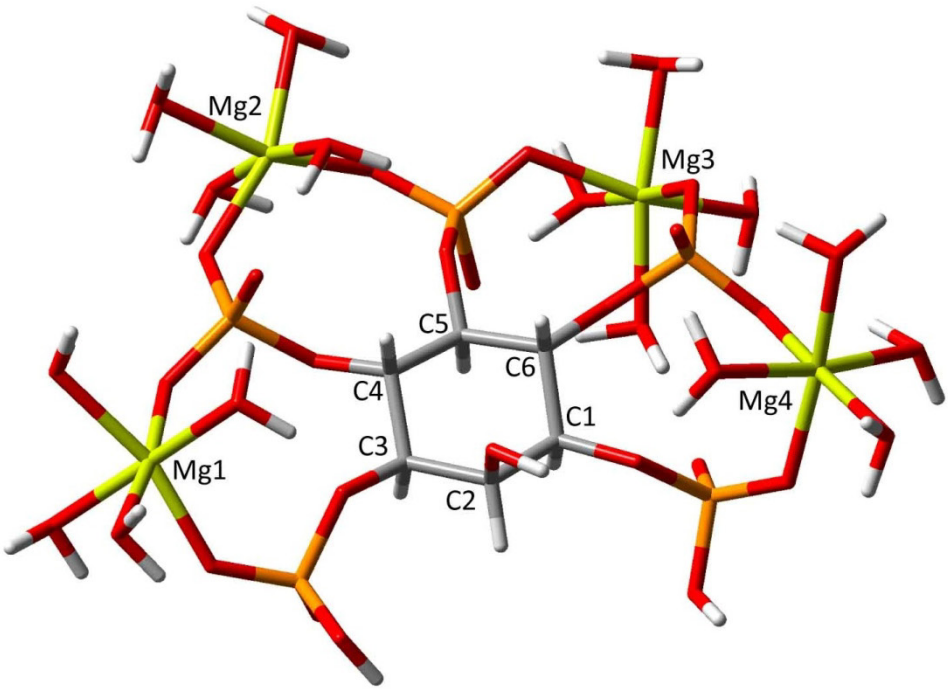
El cuarto protón se uniría al fosfato en C4 ó C6 (figura 10.13B), siendo compartido mayoritariamente con P1 ó P3 (bajos valores de $\Delta\delta_{prot}$). Sin embargo, dado que existe un gran número de protones además del ion metálico en $[Mg(H_4L)]^{4-}$, el análisis estructural se vuelve muy complejo. Debido a los múltiples enlaces de hidrógeno presentes en H_4L^{6-} (ver figura 10.3E), no es de sorprender que la coordinación afecte directa o indirectamente a todos los grupos fosfatos, haciendo que los valores de $\Delta\delta_{compl}$ sean bastante negativos. El grupo menos afectado con la coordinación es P1/3, debido a que la unión del metal se ve compensada en cierto grado por el desplazamiento protónico (las microespecies mayoritarias con n = 4 contienen a P1 y P3 ambos protonados, mientras que P4/6 y P5 lo están sólo parcialmente).

A



$[Mg_4(H_2L)(H_2O)_{16}]^{6-}$ (5a1e)

B



$[Mg_4(H_2L)(H_2O)_{16}]^{6-}$ (1a5e)

Figura 10.16. Geometrías RB3LYP/6-31+G* optimizada en fase gaseosa para la especie $[Mg_4(H_2L)]$. (A) Conformación 5a1e, (B) conformación 1a5e.

Resta por analizar los aspectos estructurales relacionados con la especie $[Mg_4(H_2L)]$, de la cual no se cuenta con datos espectroscópicos por RMN. Para esto, el modelado molecular resulta muy útil, permitiendo la revisión de los patrones de coordinación metálica y los requerimientos geométricos relacionados con la interacción ligando-metal. Se procedió entonces al cálculo de la geometría en fase gaseosa de este complejo polinuclear para ambos estados conformacionales. Se consideraron geometrías de partida donde cada ion metálico se ubicó entre pares de grupos fosfatos, completando el resto de las posiciones de coordinación con moléculas de agua. Los resultados se muestran en la figura 10.16.

Los cálculos teóricos convergen a mínimos en la superficie de energía potencial cuyas geometrías asociadas contienen a cada centro metálico fuertemente anclado a pares de fosfatos, los cuales actúan como "pinzas" con carga negativa. Los resultados no hacen más que confirmar el patrón de complejación asociativo metal-ligando, donde, en general, cada ion magnesio se une a varios grupos fosfato y viceversa. En apariencia, con la disposición adyacente de sus grupos ionizables, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 posee gran afinidad por los iones metálicos y el H^+, los que son capaces de ingresar en los "huecos" negativos preformados. De todas formas, el proceso conlleva una adaptación de estas "cavidades" al tamaño del ion en particular, que el ligando ejecuta sin mayores trastornos de su estructura, por lo que no constituye un agente secuestrante sustancialmente selectivo al tamaño del ion. De acuerdo con esto, los valores de constantes complejación ajustados para iones de la misma carga resultaron bastante altos y similares en todos los sistemas analizados (capítulo 9).

En la tabla 10.10 se muestran algunos indicadores relacionados con aspectos estructurales y energéticos de ambos estados conformacionales. Según los valores de ΔG del cambio conformacional, a diferencia de lo que ocurría con la especie H_2L^{8-} del ligando, el estado 5a1e se estabiliza en solución para el complejo $[Mg_4(H_2L)]$. Este comportamiento encuentra explicación en dos factores principales. Por un lado, se alivia la tensión en el anillo en mucho mayor grado para la conformación axial, la cual en la especie H_2L^{8-} se encontraba sustancialmente distorsionada (figura 10.3J).

Tabla 10.10. Parámetros estructurales y energéticos relacionados con las especies H_2L^{8-} (geometría RHF/3-21+G*) y $[Mg_4(H_2L)]$ (geometría RHF/6-31+G*).

	$\Delta\theta_{axial\text{-}axial}$ (°) [a]		ΔG (kcal/mol) [b]
Especies	1a5e	5a1e	1a5e → 5a1e
H_2L^{8-}	8	44	2,09
$[Mg_4(H_2L)]$	5	19	-14,0

[a] Desviación promedio, desde el valor esperado de 180°, de todos los ángulos diedros formados por los grupos axiales de carbonos adyacentes en °. [b] Variación en la energía libre asociada al cambio conformacional (1a5e)→(5a1e).

En segundo lugar, como se advierte a partir de la figura 10.16, los iones magnesio se unen más fuertemente a los fosfatos en la conformación 5a1e que en la 1a5e, liberando moléculas de agua que terminan acoplándose a la especie compleja por enlaces de hidrógeno.

4. Conclusiones

Se expuso en este capítulo el estudio químico-estructural del comportamiento del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en ausencia y presencia de los iones Na^+ y Mg^{2+}, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y temperatura.

El perfil espectral del ligando en el RMN de ^{31}P consistió en tres señales, integrando 2:2:1, de acuerdo con los tres conjuntos de grupos fosfato simétricamente equivalentes: P1/3, P4/6 y P5. No se observaron mesetas claras en las curvas de desplazamiento químico en función del pH (figura 10.1B), por lo que no existen especies ampliamente mayoritarias, sino varias formas del ligando en distinto grado de protonación que coexisten en el sistema. A partir del ajuste de los datos de desplazamiento químico con el pH, fue posible el análisis de las primeras 7 reacciones de protonación, cuyas constantes globales determinadas siguen el orden esperado y son consistentes con reportes anteriores. A pH cercano al fisiológico, las especies predominantes resultaron ser H_4L^{6-} y H_3L^{7-}.

Se analizaron en detalle los equilibrios de protonación, mediante la determinación de su secuencia y las probabilidades de las microespecies

involucradas. Los valores de $\Delta\delta_{prot}$ y el modelado teórico de las especies presentes proveyeron, además, de información sobre los requerimientos geométricos del proceso de protonación. Como análisis adicional, se evaluaron los factores estructurales que modulan la energía de las especies en solución, y con ello, la conformación preferida del ligando en cada caso. La separación media de los átomos de fósforo de los grupos fosfato ubicados en carbonos adyacentes es siempre mayor en la conformación 5a1e, por lo que es el estado preferido desde el punto de vista energético para L^{10-} y HL^{9-}. Con el agregado de más protones, los grupos fosfato comienzan a interactuar entre sí a través de enlaces de hidrógeno, lo que provoca una alteración estructural menos acentuada para el confórmero ecuatorial. Esto lo estabiliza para las especies más protonadas del ligando, desde H_2L^{8-} hasta $H_{10}L$.

Se realizó el estudio espectroscópico del sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ por RMN de ^{31}P. Las señales sufrieron un incremento del desplazamiento químico por la unión del ion alcalino a los grupos fosfato, diferente para cada señal, el que evidencia complejación. El ajuste de los datos espectroscópicos permitió detectar complejos polinucleares de fórmula general $[M_i(H_jL)]^{(10-i-j)-}$ con *i:j* = (2:2), (3:1) y (4:0). A pH cercano al del citosol y núcleo celulares, se predice la presencia de las especies H_4L^{6-}, H_3L^{7-} y $[M_2(H_2L)]^{6-}$.

Se caracterizó estructuralmente la secuencia de complejación a través del análisis de los valores de Δδ y los resultados del modelado de los complejos. Se evaluaron en este sentido los distintos determinantes geométricos y conformacionales del proceso de intercambio Na^+ - H^+. Todos los complejos Ins(1,3,4,5,6)P_5-Na^+ poseen un carácter importante de par iónico, en donde los grupos fosfato unen a los diversos cationes mediante la formación de huecos negativos, mientras que el solvente hidrata a las especies aniónicas como un todo. El estado ecuatorial es más estable para $[Na_2(H_2L)]^{6-}$, permitiendo minimizar la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno y la tensión sobre el anillo carbonado. A medida que el ligando se deprotona y se asocia progresivamente a más iones Na^+, el factor relacionado con la formación de fuertes enlaces de hidrógeno comienza a tener menor peso relativo, mientras que se hacen más importantes las interacciones fosfatos-iones Na^+. En este sentido, el estado 5a1e logra estabilizarse, dando lugar a “cavidades aniónicas”

que envuelven a los iones, separando más eficientemente los grupos altamente cargados y disminuyendo al mínimo la tensión estructural.

Se procedió finalmente a ejecutar un análisis específico de los complejos del sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-Mg^{2+}. La comparación entre las curvas de desplazamiento químico en función del pH, en presencia y ausencia de magnesio, evidencia los múltiples procesos de complejación y desplazamiento de protones, los que afectan de manera inversa al valor de δ. Se detectaron especies de estequiometría 1:1 metal:ligando, muy estables y altamente cargadas, de fórmula general $[Mg(H_jL)]^{(10-2-j)-}$ con $1 \leq j \leq 4$.

Mediante el análisis de las medidas espectroscópicas y los datos proporcionados por herramientas de modelado molecular, se caracterizaron estructuralmente las especies metálicas presentes, permitiendo resolver los detalles topológicos de los procesos de complejación y protonación. En particular, en el complejo $[Mg(H_3L)]^{5-}$, una de las formas predominantes del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en condiciones citosólico-nucleares, el ion magnesio se predice coordinado en un entorno octaédrico distorsionado, con participación de dos grupos fosfato y tres aguas de coordinación. El grupo P4/6 sufre un alejamiento del centro metálico, lo que trae aparejado la deprotonación de una molécula de agua coordinada al ion Mg^{2+}. En consecuencia, la distribución de carga se comporta de forma dual; característica sobresaliente a la hora de evaluar los pormenores de la afinidad entre este complejo y cualquier estructura celular adaptada a su reconocimiento.

5. Referencias bibliográficas

1. Mernissi-Arifi, K.; Wehrer, C.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1994,** *55*, 263-277.
2. Felemez, M.; Ballereau, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *New Journal of Chemistry* **2000,** *24*, 631-638.
3. Felemez, M.; Marwood, R. D.; Potter, B. V. L.; Spiess, B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999,** *266*, 334-340.
4. Dozol, H.; Blum-Held, C.; Guedat, P.; Maechling, C.; Lanners, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Molecular Structure* **2002,** *643*, 171-181.
5. Riley, A. M.; Trusselle, M.; Kuad, P.; Borkovec, M.; Cho, J.; Choi, J. H.; Qian, X.; Shears, S. B.; Spiess, B.; Potter, B. V. L. *ChemBioChem* **2006,** *7*, 1114-1122.
6. Borkovec, M.; Koper, G. J. M. *Analytical Chemistry* **2000,** *72*, 3272-3279.
7. Volkmann, C. J.; Chateauneuf, G. M.; Pradhan, J.; Bauman, A. T.; Brown, R. E.; Murthy, P. P. N. *Tetrahedron Letters* **2002,** *43*, 4853-4856.
8. Bebot-Brigaud, A.; Dange, G.; Fauconnier, N.; Gérard, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999,** *75*, 71-78.

Capítulo 11

Estudios del Ins(1,3,4,5,6)P_5 al estado sólido

Se exponen en este capítulo los detalles de la síntesis y caracterización estructural de los complejos sólidos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con Mg^{2+} y Ca^{2+}. Se procede, con esta información, a la determinación de las constantes de producto de solubilidad de los equilibrios de precipitación asociados, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura. Estos datos permitirán acoplar, de forma explícita, los diversos procesos de precipitación a aquellos en solución considerados hasta el momento dentro del modelo, permitiendo dar una visión completa de la reactividad química del ligando en presencia de ambos iones +2 y evaluar su capacidad secuestrante relativa al estado sólido.

1. Introducción

Los dos capítulos precedentes han abordado el estudio químico y estructural de los procesos de protonación y complejación establecidos entre especies solubles del Ins(1,3,4,5,6)P_5 y algunos iones mono, di y trivalentes. No obstante, la química de este inositol fosfato no se restringe a sistemas en solución. Como era previsible dada la alta carga de sus especies, este InsP_5, al igual que el InsP_6, da lugar a procesos de precipitación dependientes del pH y la relación metal:ligando, los que alteran profundamente la distribución de las especies solubles.

Hasta el momento, no existe reporte alguno en la literatura referente a la caracterización de estas fases sólidas o de los equilibrios de precipitación asociados. Esta información permitiría, en primer término, avanzar en el estudio fisicoquímico de los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-M^{n+}, mediante la extensión del rango de análisis hacia condiciones de alto pH y relación metal:Ins$P$, donde se ha observado que efectivamente operan los procesos de

formación de complejos sólidos. Sin embargo, estos datos tienen aplicación más allá del terreno estrictamente académico. Existen sistemas biológicos, como los eritrocitos de algunas aves y tortugas, donde este inositol fosfato se ha detectado en concentraciones extremadamente altas, del orden milimolar[1]. Por otra parte, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se ha reportado presente en el plasma de rata[2], donde los niveles de algunos iones como Mg^{2+} y Ca^{2+} son muy altos. Estas condiciones podrían dar lugar, a pH fisiológico, a procesos de formación de sólidos o, por el contrario, a sistemas completamente solubles. Esta información es difícil de obtener mediante ensayos sobre los sistemas biológicos. Un estudio fisicoquímico riguroso del sistema requiere la caracterización completa de las fases solidas formadas, a través de la determinación de su composición química y solubilidad. Los resultados derivados brindarían información específica de las especies existentes, relacionadas en gran extensión con el rol biológico de este InsP_5.

En vista del contexto planteado, se presenta en este capítulo la síntesis y caracterización de los complejos sólidos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con Mg^{2+} y Ca^{2+}. Se determina, asimismo, su solubilidad en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas, y se analizan las consecuencias que estos procesos de precipitación tienen en la especiación química del ligando en presencia de exceso de iones metálicos.

2. Parte experimental

2.1. Síntesis y medidas de solubilidad de las fases sólidas

Los complejos sólidos se sintetizaron mediante la misma estrategia general presentada en el capítulo 4. Se parte de 5 mL de una solución 8,8 mM de ligando, a la cual se le ajusta el pH entre 10 y 11 utilizando una solución de LiOH 1 M. Se agrega, con agitación, 0,18 mmol de ion metálico disuelto en la mínima cantidad de agua destilada. Se forma inmediatamente una fase sólida, la cual se separa por centrifugación y se lava dos veces con 5 mL de agua destilada y una vez con 5 mL de etanol absoluto. Se deja secar el sólido por varios días.

Las medidas de solubilidad de los complejos de magnesio y calcio fueron ejecutadas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, de acuerdo con las condiciones

presentadas en el capítulo 4. Para cada corrida experimental se utilizaron entre 10 y 40 mg de cada compuesto, y se agregaron alícuotas de una solución patrón de HCl 0,1 M, de forma de alcanzar distintos puntos de equilibrio correspondientes a cantidades medibles de metal en solución. Las suspensiones fueron filtradas a través de filtros de membrana de 0,2 µm de diámetro de poro (Sigma-Aldrich), manteniendo en todo momento el sistema termostatizado a la temperatura de trabajo.

2.2. Dosificación de Ca^{2+} en presencia de Ins(1,3,4,5,6)P_5

Así como se expuso en el capítulo 4, la dosificación de iones metálicos en presencia de Ins(1,3,4,5,6)P_5 se realizó por métodos volumétricos estándar [3-5]. No obstante, con el objetivo de mejorar la exactitud y precisión de los resultados, la cuantificación del calcio en muestras del complejo sólido Ins(1,3,4,5,6)P_5-Ca^{2+} se efectuó a través de un procedimiento gravimétrico adaptado al sistema en particular, similar al aplicado para el InsP_6.

Se pesa ≈ 15 mg del sólido y se lo disuelve en 1 mL de HCl 2 M. Se agrega 5 mL de una solución de ácido oxálico 0,054 M y se trasvasa cuantitativamente la solución a un tubo previamente pesado. Se agrega gota a gota una solución de NH_3 7 M hasta que el pH de la solución se encuentre entre 1,5 y 3 (aprox. 0,3 mL), lo que permite el máximo porcentaje de recuperación del metal y evita la precipitación simultánea del complejo Ins(1,3,4,5,6)P_5-Ca^{2+}. Se centrifuga la suspensión y se lava el sólido obtenido con dos porciones de 5 mL de agua desionizada. Se centrifuga nuevamente y se seca en estufa a 70 °C por 24 horas. Se pesa el tubo con el sólido y se determina el contenido de calcio a partir de la masa obtenida de $CaC_2O_4 \cdot H_2O$.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización química de las fases sólidas

En condiciones de exceso de ion metálico se obtienen fases sólidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 de aspecto amorfo, cuya composición química se resume en la tabla 11.1. Los análisis elemental y termogravimétrico de los complejos concuerdan con fórmulas del tipo $M_4(H_2L) \cdot xH_2O$, con x = 23 para magnesio y 16 para calcio. De esta manera, estos sólidos poseen la misma estequiometría que

la especie neutra soluble [$M_4(H_2L)$] detectada para ambos cationes en solución (capítulo 9). Al igual que en el caso de los sistemas conteniendo fitato, los apartamientos leves observados entre los valores teóricos y experimentales se deben, esencialmente, a la muy baja solubilidad de las sales (que impide una purificación eficiente por recristalización) y a la alta hidratación de las mismas.

Tabla 11.1. Resultados del análisis elemental, rendimientos y composición química de las fases sólidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con los iones Mg^{2+} y Ca^{2+}.

Fórmula	Peso fórmula	% experimentales (calculados)				% Rend.
		C	H	Metal	H_2O	
$Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$	1083,56	6,30 (6,66)	5,04 (5,12)	9,5 (9,0)	38,4 (38,2)	63
$Ca_4(H_2L)\cdot 16H_2O$	1020,54	6,81 (7,06)	3,99 (4,05)	15,2 (15,7)	28,1 (28,2)	56

En la figura 11.1 se muestran los termogramas de ambas fases sólidas. Las curvas decaen de forma continua hasta los 250 °C, temperatura por encima de la cual comienza la descomposición del compuesto. No se observa en ningún caso mesetas o saltos definidos correspondientes a procesos de pérdida de masa específicos. Por el contrario, la disminución de masa empieza de forma acentuada a valores de temperaturas bastante bajos (50 °C), lo que sugiere la presencia de un número grande de moléculas de H_2O retenidas débilmente en el sólido. Al igual que ocurría para los sistemas InsP_6-$M^{2+/3+}$, la curva de TGA muestra una discontinuidad a aproximadamente 80°C, la que se corresponde con un mínimo de la derivada primera correspondiente (DTG). Es posible en este punto calcular la pérdida de moléculas de agua, y asignar tentativamente a las mismas como aquellas que se mantienen más débilmente retenidas en la estructura. Los resultados se detallan en la tabla 11.2.

Tabla 11.2. Porcentaje de disminución de masa y número de moléculas de agua de hidratación perdidas y restantes en los experimentos termogravimétricos a las temperaturas indicadas, para las fases sólidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con los iones Mg^{2+} y Ca^{2+}.

Metal	T(°C)	% masa perdida a T	Nº H_2O perdidas a T	Nº H_2O restantes	Nº H_2O totales
Mg	80	28,8	17,2	5,8	23
Ca	80	20,6	11,7	4,3	16

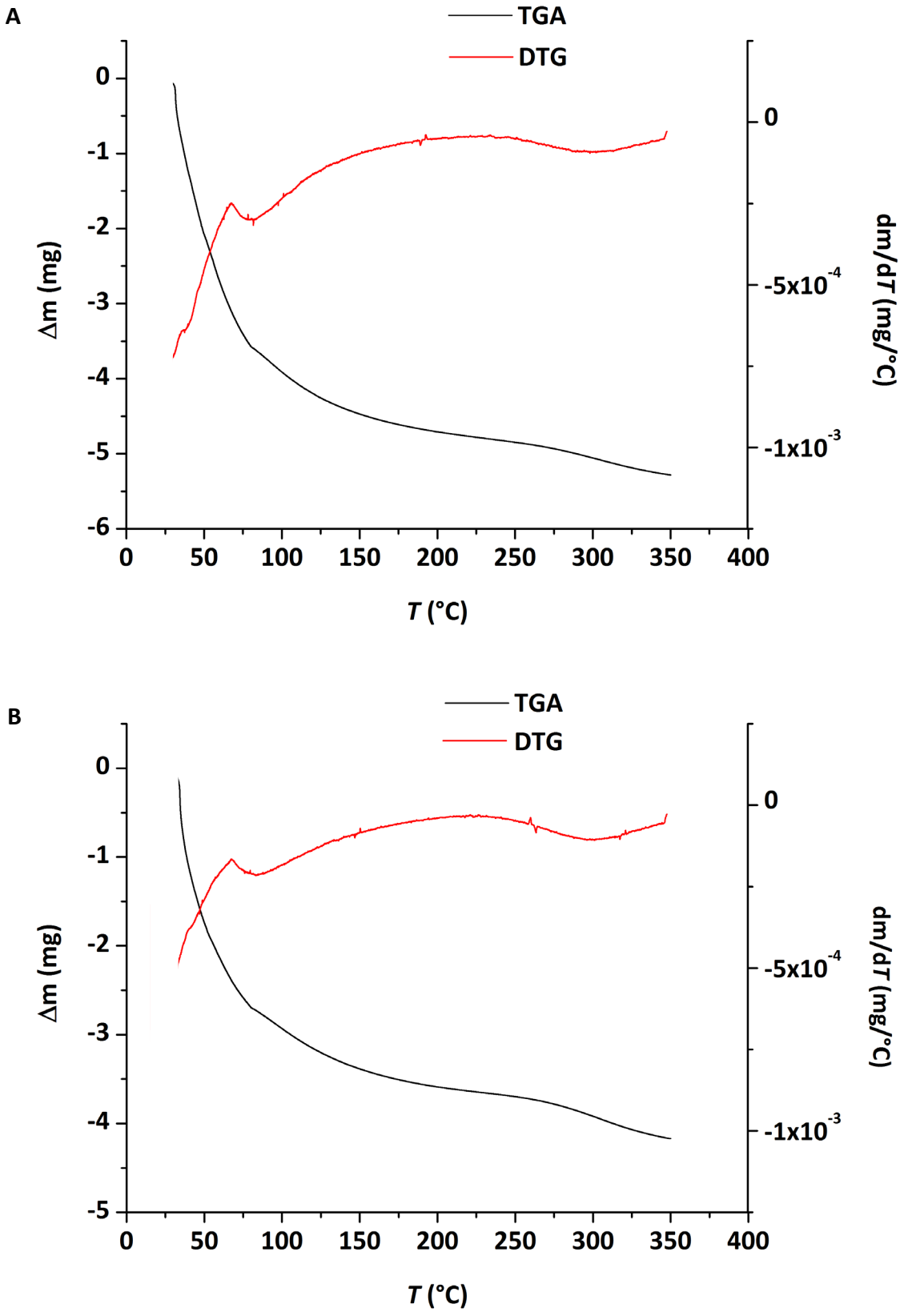


Figura 11.1. Resultados del análisis termogravimétrico (TGA) para los sólidos $Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$ (A) y $Ca_4(H_2L)\cdot 16H_2O$ (B). En ambos casos se muestra en rojo la derivada primera de la curva de TGA (DTG).

De la gran cantidad de moléculas de agua de hidratación que poseen los compuestos, la mayoría se liberan, en las condiciones de los experimentos termogravimétricos, con un aumento de temperatura en el rango 50 - 250 °C. El resto, 6 en el caso del sólido de Mg^{2+} y 4 para el de Ca^{2+}, es factible que se encuentren asociadas a cada catión. Estos resultados son compatibles con un modelo estructural donde no más de 2 moléculas de H_2O estarían coordinadas a cada centro metálico.

3.2. Caracterización estructural por espectroscopía infrarroja

Como paso previo en el estudio estructural de los complejos Ins(1,3,4,5,6)P_5-M^{2+} al estado sólido, se analiza el espectro infrarrojo de la sal del ligando $(NH_4)_6(H_4L)$ (figura 11.2A). Dado que en este sistema existen cinco grupos fosfato y cuatro protones ácidos, y en consideración de la gran tendencia hacia la compartición de protones que muestran las diferentes especies protonadas del ligando (capítulo 10), se puede asumir que todos los grupos ionizables están asociados al menos a un hidrogenión. De acuerdo con esto, el perfil espectral obtenido puede analizarse, como primera aproximación, teniendo en cuenta el correspondiente al anión $H_2PO_4^-$ [6]. De forma de asistir al proceso de asignación, en la misma figura se muestra superpuesto en azul el espectro teórico del ligando en base a la especie H_4L^{6-} (1a5e), analizada en el capítulo 10.

Las bandas correspondientes a los estiramientos de los enlaces O-H y N-H aparecen como señales anchas y muy intensas en la región 2500 - 3600 cm^{-1} (tabla 11.3) [6-8]. El espectro teórico de la especie H_4L^{6-} (1a5e) muestra además un pico muy intenso a 2000 cm^{-1}, asociado al modo ν(O-H), el cual no se registra a nivel experimental. Esta discrepancia es debida a que los enlaces de hidrógeno intramoleculares, y por tanto la frecuencia de los modos normales asociados al estiramiento O-H de los grupos fosfato, están afectados en gran extensión por interacciones al estado sólido ligando-NH_4^+. Dado que las mismas no se contabilizan dentro del modelo en fase gaseosa, éste resulta poco eficiente en la predicción de algunas de estas vibraciones. Los picos asociados a los modos normales ν(C-H) también se registran en esta zona, aunque se predicen teóricamente con mucho menor intensidad. En efecto, en el espectro se observan como pequeños hombros e irregularidades sobre la curva.

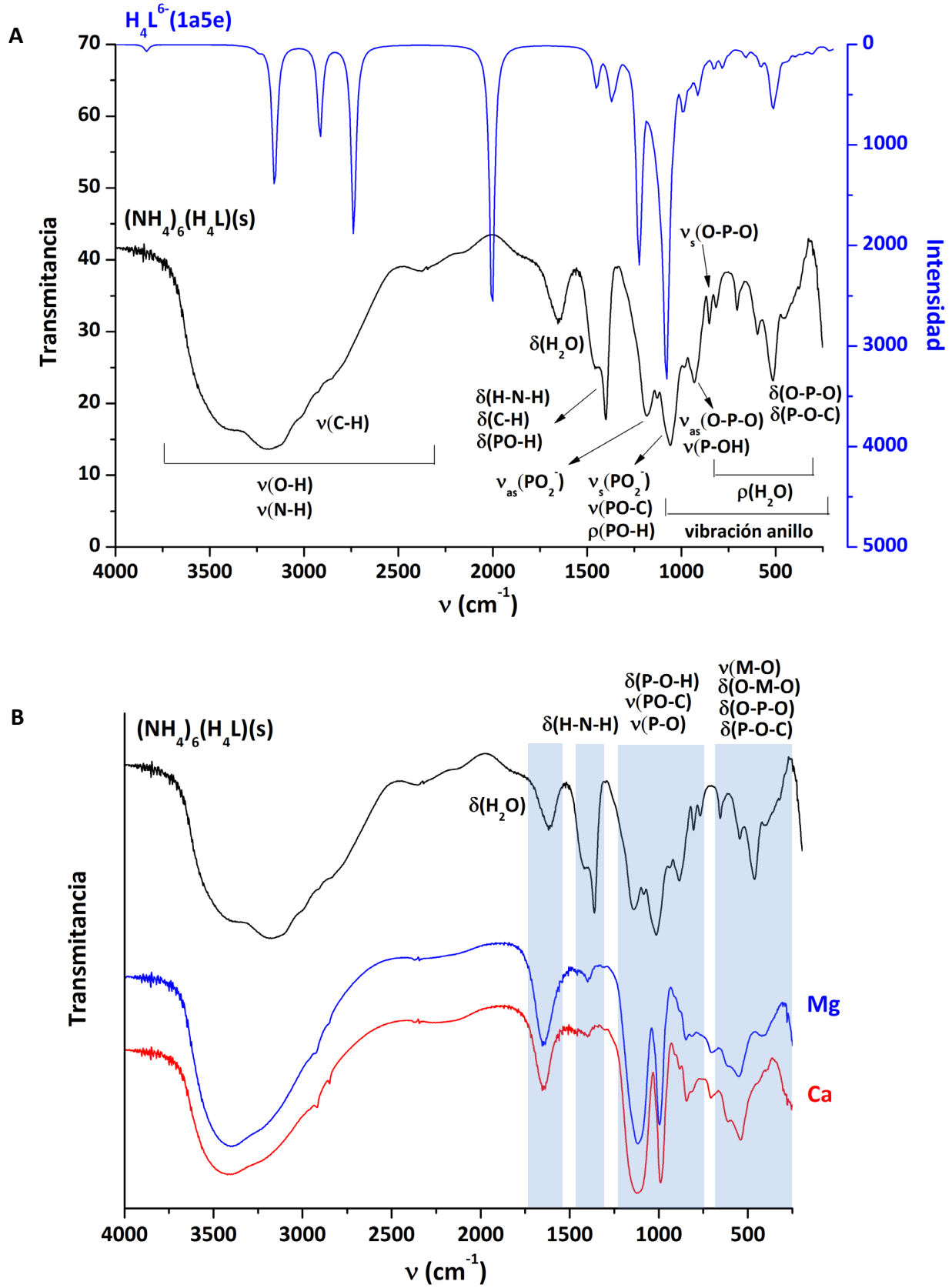


Figura 11.2. Espectros infrarrojo de la sal $(NH_4)_6(H_4L)$ (A) y los correspondientes a los complejos $Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$ y $Ca_4(H_2L)\cdot 16H_2O$ (B). En (A) se muestra en azul el espectro teórico calculado del ligando en base a la geometría optimizada RHF/3-21+G* de la especie H_4L^{6-} (1a5e) (ancho de banda a la mitad de la altura de pico = 15 cm^{-1}).

Tabla 11.3. Bandas seleccionadas de los espectros infrarrojos para las fases sólidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con los iones Mg^{2+} y Ca^{2+}.

	Bandas del IR (cm^{-1})							
Compuesto	ν(O-H) ν(C-H) ν(N-H)	δ(NH_2)	$\nu_{as}(PO_2^-)$	$\nu_s(PO_2^-)$ ν(PO-C)	ν_{as}(O-P-O)	ν(P-OH)	ν_s(O-P-O)	δ(O-P-O)
$(NH_4)_6(H_4L)$	2500-3600	1401	1183 1128	1058	981 932	960-980	850 812	514
$Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$	2600-3600	---	1119	996	---	847	---	551
$Ca_4(H_2L)\cdot 16H_2O$	2600-3600	---	1123	990	---	844	---	540

Por debajo de 1750 cm^{-1} se observa la banda característica de la deformación del enlace O-H-O del agua, cuyas particularidades fueron discutidas en el capítulo 8. La baja intensidad de la misma evidencia un bajo contenido de moléculas de agua de hidratación en el sólido. Entre 1400 y 1500 cm^{-1} se espera la aparición de bandas asociadas a los modos δ(C-H) y δ(PO-H). Experimentalmente, ambas aparecen superpuestas con el pico muy intenso y fino del modo δ(H-N-H)[8]. Las vibraciones de los grupos fosfato del ligando dominan el perfil espectral por debajo de 1250 cm^{-1}. Una banda ancha e intensa en el rango 1250 - 800 cm^{-1}, resuelta parcialmente en siete picos principales, contiene fundamentalmente los modos normales relacionados con el estiramiento de los enlaces P-O y PO-C (figura 11.2A y tabla 11.3). Las señales correspondientes a 1058, 1128 y 1183 cm^{-1} pueden ser asignadas, según los cálculos teóricos, a los estiramientos asimétricos y simétricos del grupo PO_2^-, de acuerdo con datos ya reportados [6]. Por otra parte, los modos ν_{as}(O-P-O) y ν_s(O-P-O) se esperan y observan a 980, 932, 850 y 812 cm^{-1} [6]. Aportando en general al ancho de banda, los datos computacionales y bibliográficos señalan la aparición en esta zona de los modos normales ν(PO-C), ν(P-OH) y ρ(PO-H) [8].

En detalle, es posible analizar las contribuciones de los diversos grupos fosfato usando como modelo el estudio de la sal dodecasódica del fitato realizado por He *et al* [9]. Asumiendo que existen dos conjuntos de fosfatos, aquellos sobre C1 y C3 aportarán principalmente a las bandas en 812 y 932 cm^{-1}, mientras que las señales a 850 y 981 cm^{-1} pueden ser asociadas, fundamentalmente, con los grupos esterificados sobre C4, C5 y C6. En total acuerdo con la estructura del

ligando, las bandas originadas por el grupo en C2 no se encuentran presentes en el espectro de la figura 11.2A.

Un análisis minucioso de la bandas por debajo de 750 cm^{-1} es dificultoso, ya que no existen modos totalmente definidos, y los cálculos teóricos predicen el acople de vibraciones debidas al anillo de inositol. No obstante, es posible asignar el pico de gran intensidad a 514 cm^{-1} a la deformación de los enlaces O-P-O y P-O-C, en línea con los resultados de estudios anteriores [6].

La formación de los complejos sólidos de magnesio o calcio distorsiona en gran medida el espectro del ligando (figura 11.2B). Este resultado es de esperar, ya que en el proceso el compuesto no sólo pierde los iones NH_4^+ y se hidrata ($(NH_4)_6(H_4L) \rightarrow M_4(H_2L)\cdot xH_2O$), sino que además los grupos ionizables modifican su estado de protonación y se enlazan a los centros metálicos, alterando su simetría y densidad electrónica. En efecto, dado el aumento significativo en el número de moléculas de agua de hidratación, el ancho y la intensidad de la banda δ(H-O-H) se incrementan. Por otra parte, desaparece el pico δ(H-N-H), indicando un intercambio completo NH_4^+-Mg^{2+}/Ca^{2+} durante la síntesis de los complejos. De la misma forma que en los sistemas conteniendo fitato, las bandas asociadas a los grupos fosfato en el rango 1250 - 800 cm^{-1} colapsan a dos señales bien definidas cercanas a 1120 y 990 cm^{-1}, las que en otros sistemas han sido asignadas a los modos normales $\nu_{as}(PO_2^-)$ y $\nu_s(PO_2^-)$ de los grupos fosfato[10]. Por debajo de 700 cm^{-1} el perfil espectral cambia moderadamente, en concordancia con la alteración de los modos de deformación de los enlaces O-P-O y la aparición de bandas metal-ligando[11,12]. Estas características, que implican una pequeña diferencia entre la posición de las vibraciones $\nu_{as}(PO_2^-)$ y $\nu_s(PO_2^-)$, y un corrimiento hacia mayores frecuencias de la correspondiente a δ(O-P-O), han sido anteriormente reportadas como evidencia de un tipo de coordinación bidentada M-O-P [13].

Es interesante notar que los espectros IR de los complejos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con magnesio y calcio son prácticamente iguales (figura 11.2B). Teniendo en cuenta la similitud de su composición química (tabla 11.1), es posible sugerir que ambos compuestos son isoestructurales. Un modelo estructural posible se basa en un mismo esquema de unión metal-ligando, cuya repetición en las tres dimensiones genere una red en donde un número importante de moléculas de agua, dependiente del catión en consideración, se dispongan en los huecos de

la misma. De ellas, sólo unas pocas conseguirían unirse directamente a los centros metálicos, completando las posiciones vacías de la primera esfera de coordinación. Dado que el complejo neutro soluble $[M_4(H_2L)]$, detectado en presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+}, posee la misma estequiometría que las fases sólidas correspondientes, y que coexiste con ellas en condiciones de saturación (ver discusión más adelante), es factible que, estructuralmente, se relacione con el monómero base cuya repetición genera el retículo del sólido. En la figura 11.3 se muestran el espectro IR del compuesto $Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$ y los espectros teóricos calculados a partir de las geometrías optimizadas de ambos confórmeros del complejo $[Mg_4(H_2L)]$, analizadas en el capítulo 10.

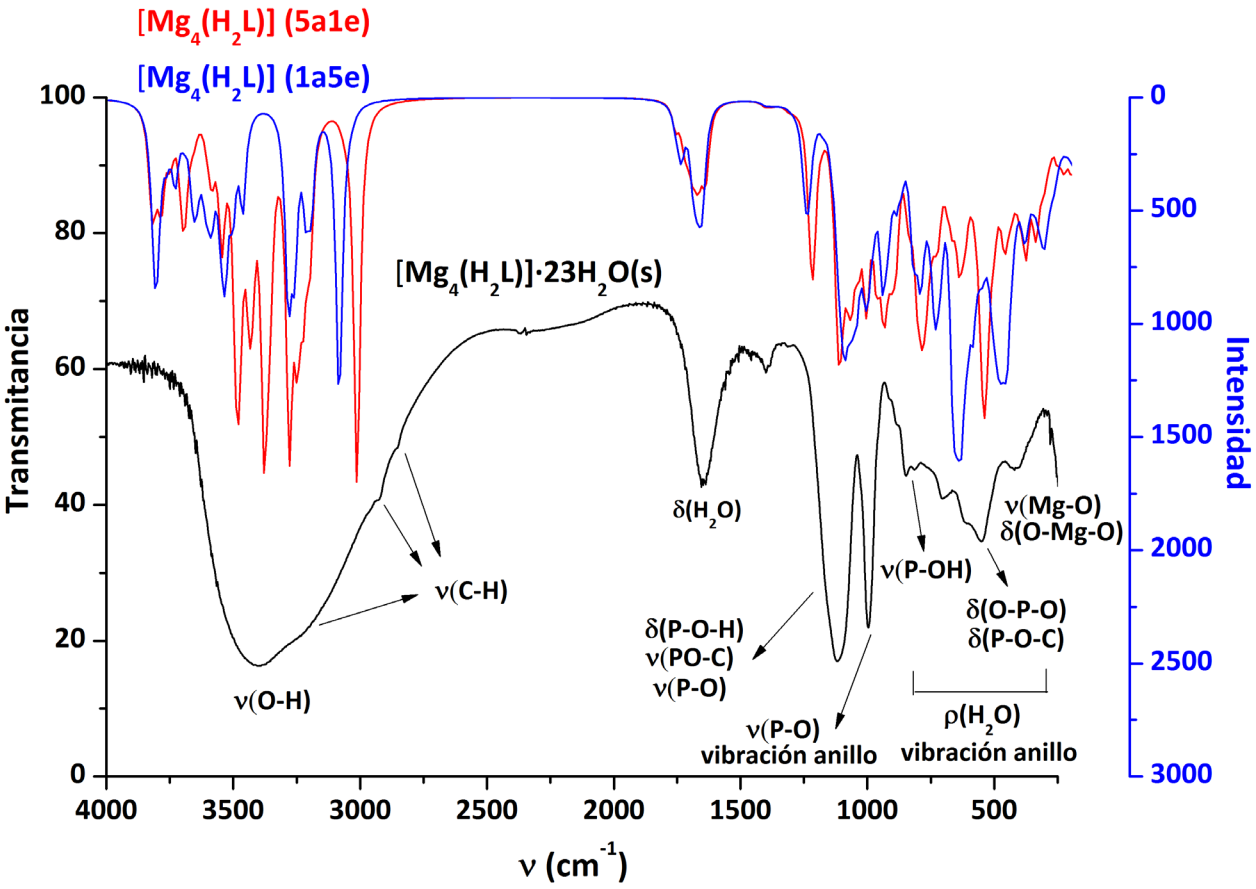


Figura 11.3. Espectro infrarrojo del sólido $Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$. Se muestran en azul y rojo los espectros teóricos calculados en base a las geometrías optimizadas RB3LYP/6-31+G* de ambos confórmeros del complejo $[Mg_4(H_2L)]$ (ancho de banda a la mitad de la altura de pico = 15 cm^{-1}).

El ajuste entre los datos experimentales y teóricos es ampliamente satisfactorio, lo que apoya la hipótesis anterior. Es por tanto probable que estos complejos se agrupen y combinen en el punto de saturación, para dar lugar a un esquema metal-ligando de cierta dimensionalidad al estado sólido. Desafortunadamente, dado que el perfil espectral es muy similar para ambas conformaciones del complejo polinuclear soluble, no es posible por esta vía sugerir la conformación preferida del ligando en la fase sólida. De hecho, podría no existir una conformación preferida o incluso encontrarse el ligando en una conformación distorsionada, como ocurre con el compuesto pentamagnésico del fitato (capítulo 8).

La similitud entre los espectros teóricos y experimentales permite, por primera vez, realizar una asignación precisa del espectro. Como se muestra en la figura 11.3, la identidad y distribución general de las señales es coherente con lo discutido a partir de los espectros de la figura 11.2B, y está de acuerdo con lo analizado para los fitatos sólidos en el capítulo 8. En el rango 3750 - 2500 cm^{-1} predominan las bandas anchas y extremadamente intensas de los modos ν(O-H), las que contienen a otras menos absortivas asociadas a los estiramientos C-H. Por su parte, la deformación de los ángulos de enlace H-O-H de las aguas de hidratación se predice teóricamente cercana a 1750 cm^{-1}, confirmando la asignación realizada hasta el momento para los distintos sólidos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6. La banda doble relacionada con los estiramientos P-O fue asignada tentativamente a los modos $\nu_{as}(PO_2^-)$ y $\nu_s(PO_2^-)$, los cuales han sido reportados anteriormente para el piridoxalfosfato[10]. Sin embargo, como se adelantaba en el capítulo 8, respecto de este último compuesto ambas vibraciones se ven afectadas por la asociación del metal a los oxígenos terminales. La banda correspondiente a 1119 cm^{-1} (tabla 11.3) contiene los modos debidos a la deformación del ángulo P-O-H de los grupos fosfato, y de estiramiento de los enlaces P-O y C-O. Según los resultados obtenidos, estos modos actúan de manera esencialmente independiente y el anillo alifático se mantiene al margen de los movimientos de vibración. La segunda banda, a 996 cm^{-1}, contiene exclusivamente modos ν(P-O), los que en este caso, a diferencia de lo anterior, se acoplan con vibraciones del esqueleto de inositol, dando lugar a una banda relativamente estrecha y muy intensa. A menores frecuencias se encuentran los estiramientos de los enlaces P-OH de ambos fosfatos protonados (847 cm^{-1}) y la deformación de los ángulos O-P-O y P-O-C

(551 cm^{-1}), aunque la asignación es dificultosa por la baja resolución de las señales en esta zona, debido fundamentalmente a la aparición de las bandas ρ(H_2O). Estas últimas son, en los sistemas Ins*P*-M^{2+} analizados, de mediana intensidad y extremadamente anchas, originadas en las múltiples moléculas de agua de hidratación en distintos entornos químicos. Finalmente, se espera la aparición de los modos ν(Mg-O) y δ(O-Mg-O) por debajo de 500 cm^{-1}, lo que explica el cambio observado en esta zona del espectro con la coordinación metálica (figura 11.2B).

3.3. Determinación de la solubilidad de los complejos sólidos

Los sólidos del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con Mg^{2+} y Ca^{2+} resultaron muy poco solubles en agua. Por lo tanto, una descripción completa y biológicamente relevante de ambos sistemas requiere la evaluación de las constantes de producto de solubilidad, $K_{s,0} = [M^{2+}]^4[H_2L^{8-}]$. La determinación de este parámetro necesita, inevitablemente, de la cuantificación de las concentraciones de las especies H_2L^{8-} y M^{2+} en equilibrio con las fases sólidas. Éstas pueden ser calculadas, a su vez, a partir de las constantes de equilibrio ajustadas en esta tesis y los datos analíticos de concentraciones totales de los componentes del sistema en presencia del sólido: ligando, ion metálico y H^+. Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla 11.4.

Tabla 11.4. Constantes de producto de solubilidad y concentraciones totales y en equilibrio de los componentes utilizadas en los ensayos de solubilidad, para las fases sólidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con los iones Mg^{2+} y Ca^{2+}.

Metal	$[M]_{tot.}$ (mM)	$[L]_{tot.}$ (mM)	$[H]_{tot.}$ (mM)	$[M^{2+}]_{libre}$ (mM)	$[H_2L]_{libre}$ (M)	log $K_{s,0}$	Promedio
Mg	1,21	0,30	0,61	0,44	$7,92 \times 10^{-6}$	-18,52	-18,6(1)
	2,57	0,64	2,31	1,96	$1,33 \times 10^{-8}$	-18,71	
Ca	0,93	0,23	0,46	0,28	$2,62 \times 10^{-6}$	-19,79	-20,2(4)
	1,13	0,28	1,08	0,96	$3,03 \times 10^{-9}$	-20,59	

Los valores de $K_{s,0}$ obtenidos son bastante pequeños, lo que refleja la baja solubilidad de ambos sistemas. El ion calcio da lugar a un menor valor de $K_{s,0}$, por lo que forma el complejo con menor solubilidad. Respecto de los resultados presentados en el capítulo 8 para el InsP_6, las fases obtenidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 son varios órdenes de magnitud más solubles, por lo que se necesitarán seguramente condiciones de mayor pH y/o relación metal:ligando para inducir la precipitación de los complejos correspondientes.

Ambas constantes de producto de solubilidad determinadas fueron validadas en su capacidad predictiva. Para esto, en la tabla 11.5 se muestra, en las condiciones utilizadas en algunas de las corridas potenciométricas, el pH al cual se visualizó opalescencia y el valor calculado del mismo a partir de las $K_{s,0}$ obtenidas. Los resultados teóricos y experimentales coinciden muy bien entre sí, con un apartamiento máximo de poco más de una unidad de pH, lo que da cuenta de la capacidad del modelo propuesto en la reproducción del comportamiento del sistema en condiciones cercanas a la saturación.

Tabla 11.5. Valores de pH de precipitación experimentales y calculados para las fases sólidas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 con los iones Mg^{2+} y Ca^{2+}.

	NMe_4Cl 0,15 M, 37,0 °C			
Metal	[M] (mM)	[L] (mM)	pH_{exp} [a]	pH_{teo} [b]
Mg	1,43	0,30	8,6	7,5
Ca	1,43	0,30	7,4	6,2

[a] pH al cual se visualiza opalescencia en las corridas potenciométricas. [b] pH al cual se predice la formación del sólido correspondiente.

La figura 11.4 muestra los diagramas de distribución de especies de los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(II) para soluciones 1 mM de metal y ligando. Como se advierte, en estas condiciones el sistema conteniendo magnesio permanece por debajo de la saturación para valores de pH comprendidos entre 2 y 10. Por el contrario, por encima de la neutralidad se predice la formación del sólido de calcio, cuya presencia genera una discontinuidad en la curva correspondiente al complejo neutro soluble. Esta diferencia en el comportamiento químico de

ambos sistemas enfatiza la menor solubilidad de la sal de calcio respecto de la de magnesio.

El requisito para la precipitación efectiva de los compuestos sólidos es la formación del complejo neutro soluble [$M_4(H_2L)$]. Esto ocurre sólo cuando el pH, la relación metal:ligando y las concentraciones totales de los componentes del sistema son lo suficientemente altos, como para motivar la predominancia del complejo polimetálico frente a las especies 1:1, altamente solubles.

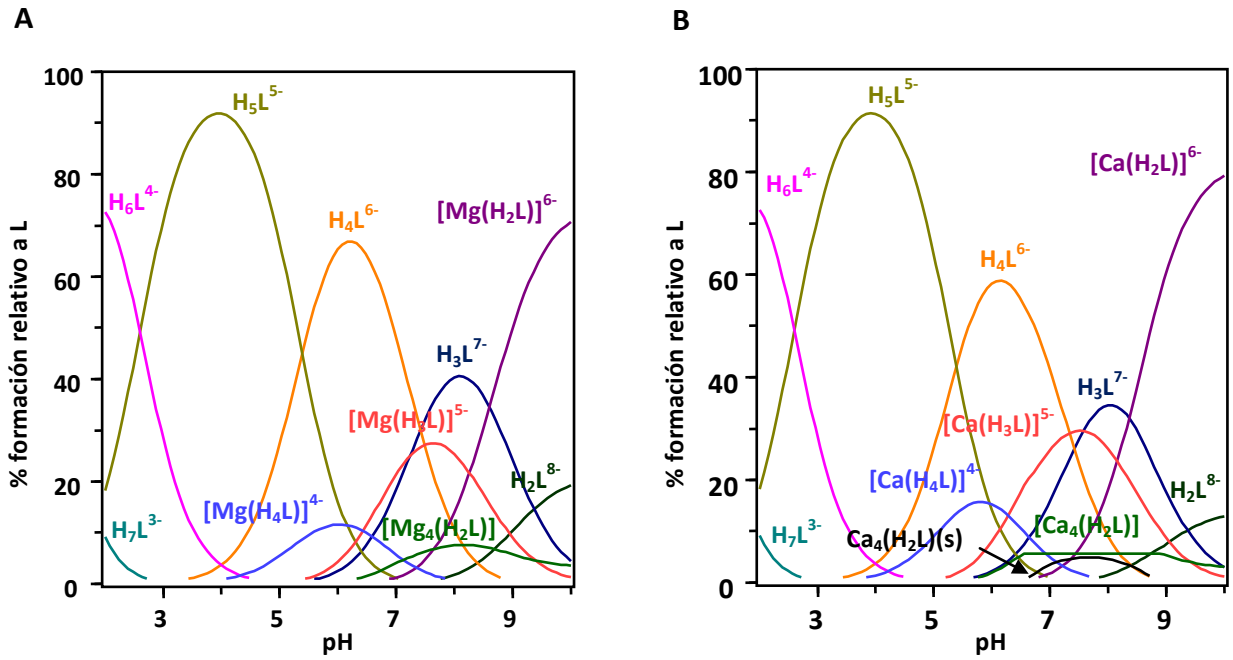


Figura 11.4. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(II), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 1 mM). M = Mg^{2+} (A) y Ca^{2+} (B). Las aguas de hidratación de las fases sólidas se omiten por claridad.

3.4. Descripción completa del comportamiento del Ins(1,3,4,5,6)P_5 frente a los iones Mg^{2+} y/o Ca^{2+}

Las constantes de protonación del Ins(1,3,4,5,6)P_5, en conjunto con las constantes de formación y de producto de solubilidad de los complejos con Mg^{2+} y Ca^{2+}, permiten realizar una descripción completa de la especiación química del ligando en presencia de ambos metales. En términos generales, la conducta del Ins(1,3,4,5,6)P_5 está caracterizada por la predominancia de complejos solubles 1:1 en condiciones de exceso de ligando, mientras que la

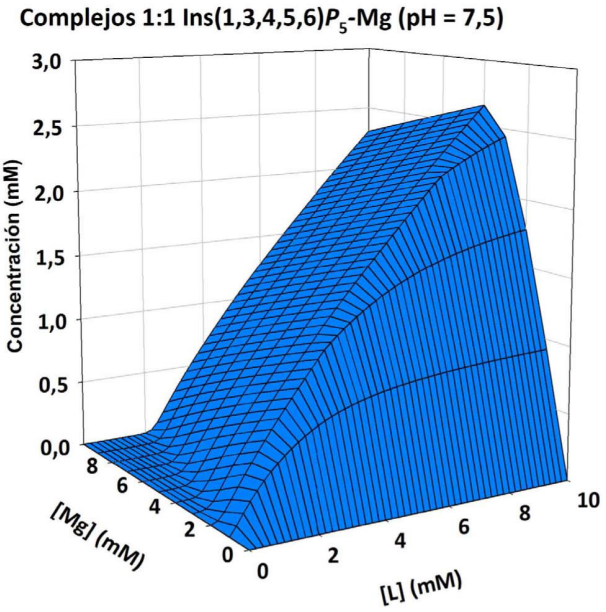
especie tetrametálica neutra $[M_4(H_2L)]$ domina la especiación en condiciones de exceso de ion metálico. La concentración de esta última especie está fijada, como máximo, por el producto de la constante de equilibrio del proceso 4 M^{2+} + H_2L^{8-} $\leftrightarrow$ $[M_4(H_2L)]$ y el correspondiente valor de $K_{s,0}$. Los resultados marcan que el nivel máximo para $[Mg_4(H_2L)]$ es 135 µM y para $[Ca_4(H_2L)]$ es 56 µM; cualquier cantidad de ellos que se forme en exceso respecto de estos niveles motivará la precipitación de la fase sólida respectiva. En consecuencia, en condiciones donde los complejos neutros solubles son predominantes (gran exceso de ion metálico y pH alcalino o neutro), estos dos valores corresponden, en la práctica, a la solubilidad total del ligando en presencia de magnesio o calcio.

El comportamiento del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en presencia de magnesio o calcio se muestra en la figura 11.5. Para una concentración fija de catión, un incremento en la concentración de ligando causa que la abundancia de los complejos 1:1 aumente de forma monótona (figuras 11.5A y D). En contraposición, la predominancia del complejo 4:1 se acrecienta significativamente, aunque para valores mayores de concentración de ligando la misma decrece de forma progresiva. Este fenómeno se debe a que un exceso de Ins(1,3,4,5,6)P_5 altera la posición de los equilibrios establecidos, motivando la formación preferencial de las especies 1:1. Los complejos $[M_4(H_2L)]$ se acumulan inicialmente como especies solubles, pero cuando su solubilidad es superada (ver mesetas en las figuras 11.5B y E) su formación adicional induce la precipitación de la fase sólida de la misma estequiometría (figuras 11.5C y F).

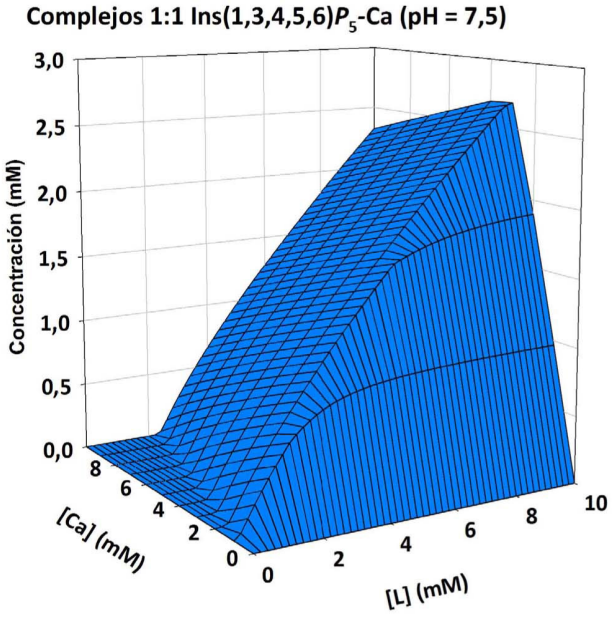
Por otra parte, si se establece una concentración de ligando constante, al incrementarse la concentración del metal se observa al principio un aumento en la abundancia de los complejos 1:1 (figuras 11.5A y D), seguido a posteriori por el crecimiento en la concentración de los complejos 4:1 (figuras 11.5B y E). Finalmente, en presencia de exceso de catión, las especies polimetálicas ven limitada su concentración a un máximo de 135 µM para el magnesio y 56 µM para el calcio, mientras que los complejos 1:1 se transforman gradualmente en favor de ellas. Cuando las concentraciones totales de metal y ligando son tales que generan la formación de las especies $[M_4(H_2L)]$ por encima de estos topes, el sistema desplaza la posición de los equilibrios en favor de la precipitación de los sólidos $Mg_4(H_2L)\cdot 23H_2O$ y $Ca_4(H_2L)\cdot 16H_2O$ (figuras 11.5C y F).

Una comparación entre los gráficos de magnesio y de calcio da cuenta de una pequeña diferencia en el comportamiento químico del Ins(1,3,4,5,6)P_5 frente a ambos metales. La menor solubilidad de la especie $[Ca_4(H_2L)]$ frente a $[Mg_4(H_2L)]$ origina que el sólido de calcio se haga presente en un rango más amplio de condiciones experimentales.

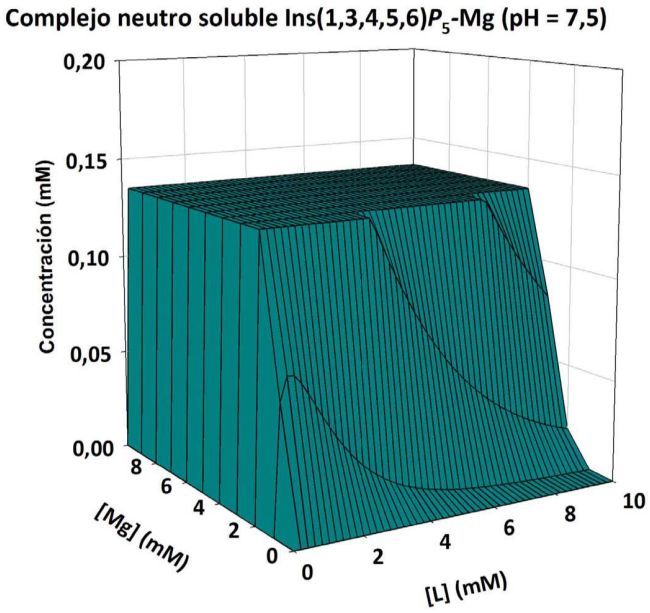
A



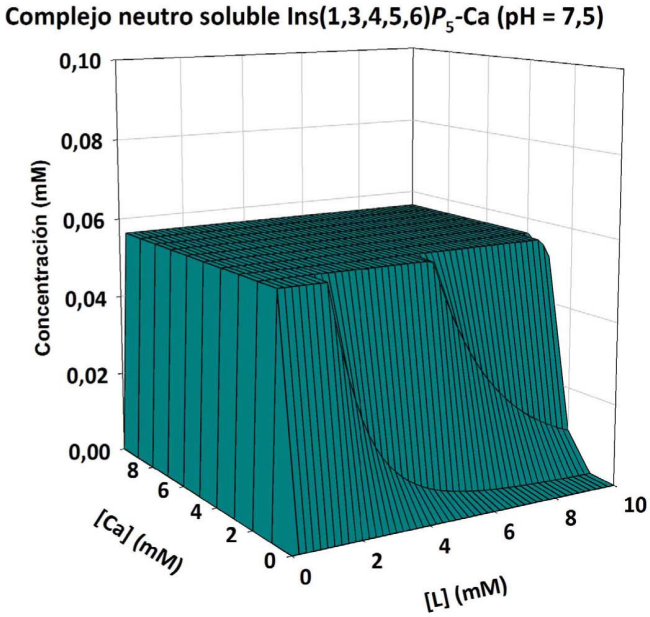
D



B



E



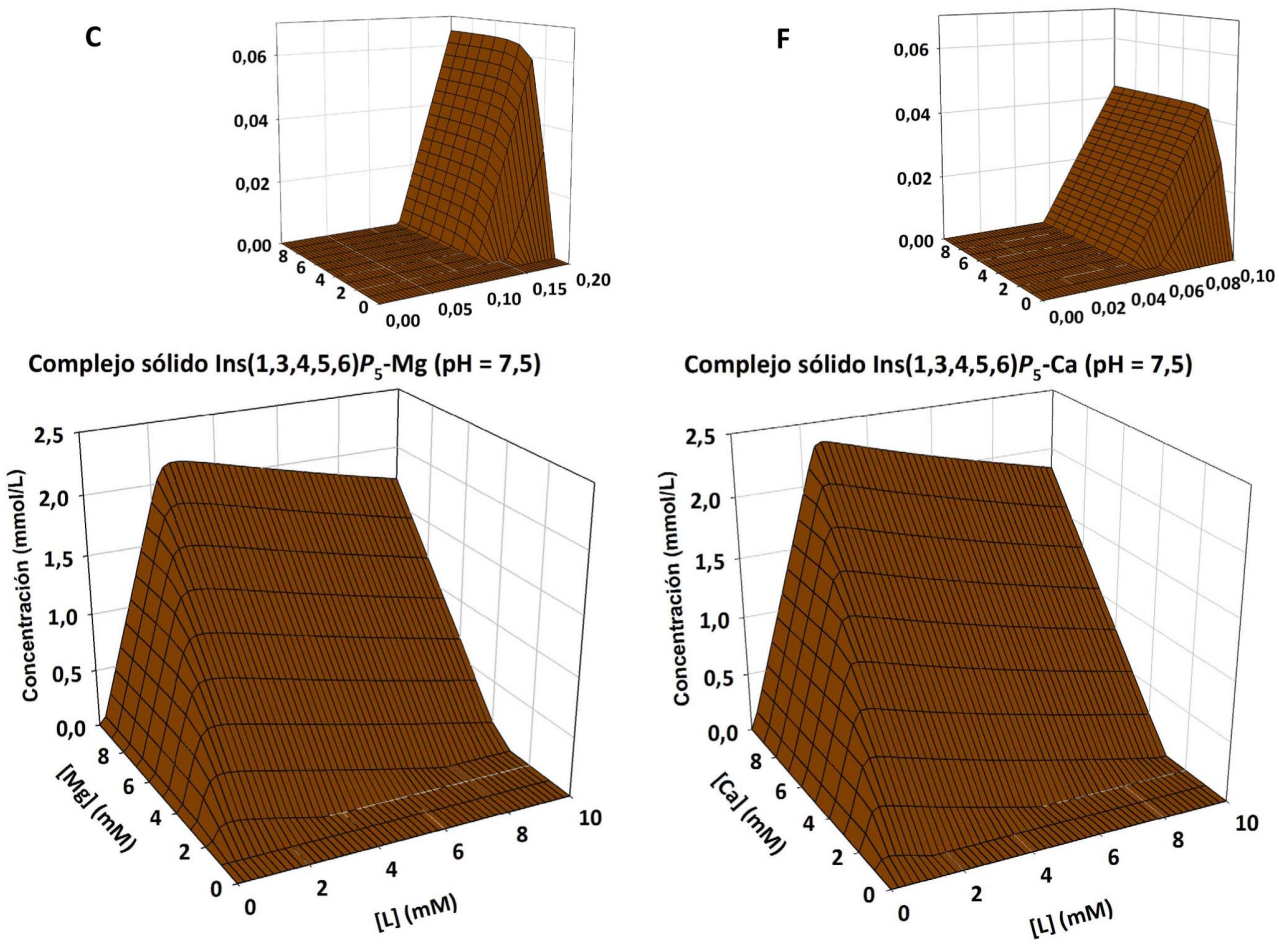


Figura 11.5 Comportamiento del Ins(1,3,4,5,6)P_5 frente al ion Mg^{2+} (A-C) o Ca^{2+} (D-F). Los gráficos muestran la concentración calculada para las especies 1:1 (A y D), el complejo neutro soluble (B y E) y el complejo sólido (C y F). Las figuras insertadas en C y F corresponden a una ampliación del rango para bajas concentraciones totales de ligando. Las predicciones son válidas a pH = 7,5 en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

Cuando ambos cationes están presentes a la vez en concentraciones similares, y asumiendo la ausencia de especies mixtas, el sistema se comporta de la misma manera que lo descrito hasta aquí. En condiciones de exceso de ion metálico, la precipitación del complejo sólido de Ca^{2+} estará favorecida frente a la del compuesto análogo del Mg^{2+}.

En general, este tipo de comportamiento es similar al descrito para el fitato en el capítulo 8, excepto por dos aspectos interesantes. En primer lugar, la estequiometría de los complejos sólidos del InsP_6 es 5:1, por lo que la capacidad secuestrante al estado sólido del fitato supera, por mol de ligando, a la del Ins(1,3,4,5,6)P_5. Segundo, las solubilidades de los complejos $[Mg_4(H_2L)]$ y

$[Ca_4(H_2L)]$ son extremadamente bajas para el InsP_6 (0,0013 pM para el magnesio y demasiado pequeña para ser determinada en el caso del calcio), mientras que para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 ambos valores resultaron similares y del orden micromolar. Afinando el análisis, una diferencia adicional es que, para el fitato, se necesita un menor exceso de catión metálico para una completa predominancia de los complejos polimetálicos; mientras que para los sistemas conteniendo Ins(1,3,4,5,6)P_5 y magnesio o calcio, a relaciones molares metal:ligando cercanas a 4:1 se detecta la presencia de especies mono y polinucleares, a relaciones molares 5:1 metal:ligando el fitato forma exclusivamente los complejos $[M_5(H_2L)]$.

3.5. Capacidad secuestrante del Ins(1,3,4,5,6)P_5 al estado sólido

En la figura 11.6 se representan los gráficos de porcentaje de metal precipitado *vs*. [ion metálico], para soluciones 1 mM de Ins(1,3,4,5,6)P_5 o InsP_6. A pH fisiológico, el ion Mg^{2+} se predice precipitado de forma completa por el fitato desde [Mg] = 0,2 mM. Por el contrario, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 no logra secuestrar al metal en la fase sólida hasta una relación metal:ligando de 1,5; incluso a 2 mM de metal sólo logra precipitar un 30 % del mismo. En presencia de calcio, el panorama es similar. No obstante, dado que para ambos ligandos este ion da lugar a sistemas más insolubles, los porcentajes de metal precipitado se incrementan. A relación metal:ligando 2:1, mientras que el fitato es capaz de retener un 100 % del ion Ca^{2+} en la fase sólida, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 logra hacerlo en un 60 %.

El origen de esta tendencia se basa en dos factores principales. El primero corresponde a las diferentes estequiometrías de los complejos sólidos. Mientras que por cada mol de ligando, el fitato precipita 5 moles de catión divalente, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 asocia 4 moles. En segundo lugar, los valores de $K_{s,0}$ son sustancialmente menores para el Ins(1,3,4,5,6)P_5, por lo que sus compuestos resultan bastante más solubles que los análogos del fitato. Como consecuencia de estas características, la capacidad secuestrante de este InsP_5 al estado sólido es ampliamente menor que la de su congénere hexafosforilado. En apariencia, la pérdida de un grupo fosfato y, con ello, la disminución en dos unidades de carga, genera un aumento en la solubilidad de

los sistemas y, consecuentemente, una disminución en la capacidad secuestrante relativa al estado sólido.

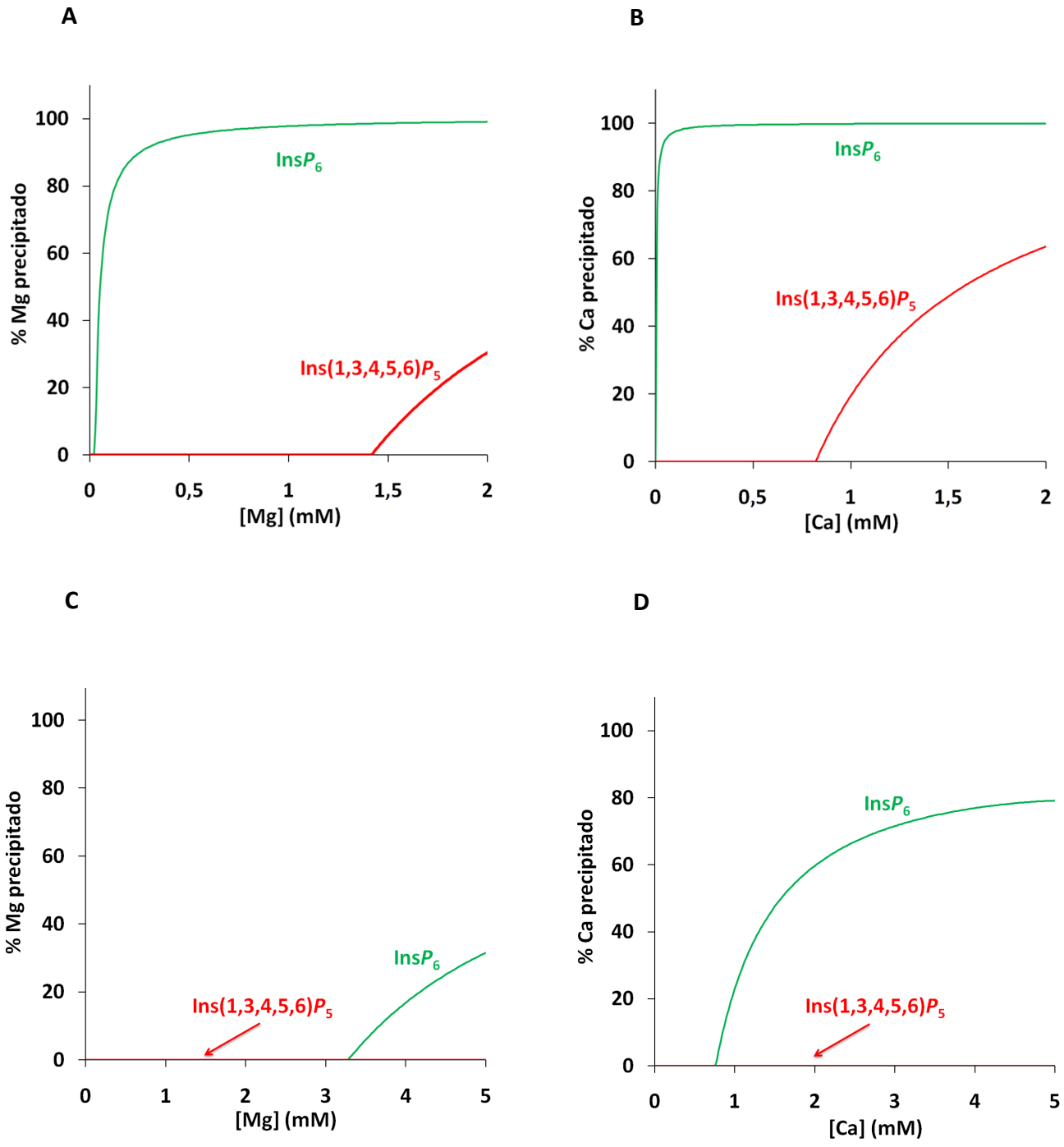


Figura 11.6 Porcentaje de metal precipitado en una solución 1 mM de InsP_6 o Ins(1,3,4,5,6)P_5 en función de la concentración de catión, a pH = 7,5 (A y B) o 3 (C y D), para los iones Mg^{2+} (A y C) o Ca^{2+} (B y D). Las predicciones son válidas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

Al disminuir el pH las conclusiones son similares. Sin embargo, el rango de condiciones de predominancia de los sólidos se limita por la protonación de los ligandos. A pH = 3, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 no es capaz de precipitar ninguno de los dos iones, incluso a relaciones metal:ligando tan altas como 5:1. El fitato, por el contrario, retiene su capacidad secuestrante al estado sólido. En el caso del magnesio, para [M] = 5 mM, el mismo es capaz de precipitar hasta un 30 % del metal. El calcio da lugar a un complejo polimetálico más insoluble, por lo que retiene en esa fase hasta un 80 % del catión para relaciones metal:ligando cercanas a 5:1.

4. Conclusiones

Se presentaron en este capítulo los resultados del estudio químico y estructural de los procesos de precipitación del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en presencia de magnesio o calcio, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas.

Se obtuvieron, en exceso de ion metálico, fases sólidas de aspecto amorfo, cuya composición química es del tipo $M_4(H_2L)\cdot xH_2O$, con x = 23 para magnesio y 16 para calcio. Los perfiles termogravimétricos decaen de forma continua hasta los 250 °C y no se observa en ningún caso mesetas o saltos definidos correspondientes a procesos de pérdida de masa específicos. Dado que la disminución de masa comienza de forma acentuada a 50 °C, es posible sugerir la presencia de un número grande de moléculas de H_2O retenidas débilmente en el sólido. El análisis detallado de las curvas de DTG muestra que existirían no más de 2 moléculas de H_2O coordinadas a cada centro metálico.

Se ha realizado el estudio estructural de los complejos Ins(1,3,4,5,6)P_5-M^{2+} al estado sólido por espectroscopía infrarroja. Surge evidencia de un tipo de coordinación bidentada M-O-P, además de un número importante de moléculas de agua en distintos entornos químicos en la red. El modelo estructural propuesto se basa en un esquema de unión metal-ligando, cuya repetición en las tres dimensiones genere una red en la que las moléculas de agua de hidratación se dispongan esencialmente ocupando huecos o, en menor grado, las posiciones vacías de la primera esfera de coordinación del metal. El ajuste entre los datos infrarrojos experimentales y teóricos resultó ampliamente satisfactorio, lo que además de apoyar la hipótesis anterior

permitió, por primera vez, realizar una asignación precisa de los espectros de los complejos obtenidos.

Los valores de $K_{s,0}$ determinados son bastante pequeños, lo que refleja la baja solubilidad de ambos sistemas. No obstante, el ion calcio da lugar a un menor valor de $K_{s,0}$, por lo que forma el complejo con menor solubilidad. Respecto de los resultados para el InsP_6, las fases obtenidas son varios órdenes de magnitud más solubles.

Las constantes de protonación, complejación y de producto de solubilidad del Ins(1,3,4,5,6)P_5 permitieron realizar una descripción completa de la especiación química del ligando en presencia de magnesio y/o calcio. En términos generales, la conducta del Ins(1,3,4,5,6)P_5 está caracterizada por la predominancia de complejos solubles 1:1 en condiciones de exceso de ligando, mientras que la especie tetrametálica neutra $[M_4(H_2L)]$ domina la especiación en condiciones de exceso de ion metálico. La concentración de esta última especie está fijada, como máximo, en 135 µM para $[Mg_4(H_2L)]$ y 56 µM para $[Ca_4(H_2L)]$. Cualquier cantidad de ellos que se forme en exceso respecto de estos niveles motivará la precipitación de las fases sólidas respectivas.

La habilidad del Ins(1,3,4,5,6)P_5 para secuestrar metales al estado sólido es significativamente menor que la del fitato. La pérdida de un grupo fosfato y, con ello, la disminución en dos unidades de carga, genera un aumento en la solubilidad de las sales, el que da lugar a una disminución en la capacidad secuestrante relativa al estado sólido. El origen de esta tendencia se basa en dos factores principales. El primero corresponde a las diferentes estequiometrías de los complejos sólidos. En segundo lugar, los valores de $K_{s,0}$ son sustancialmente menores para el Ins(1,3,4,5,6)P_5, por lo que sus compuestos resultan más solubles que los análogos del InsP_6.

5. Referencias bibliográficas

1. Gao, Y.; Wang, H. Y. *Journal of Biological Chemistry* **2007,** *282*, 26490-26502.
2. Grases, F.; Simonet, B. M.; Prieto, R. M.; March, J. G. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2001,** *12*, 595-601.
3. Schwarzenwach, G.; Flaschka, H. *Complexometric Titrations;* second ed.; Methuen: London, 1969.
4. Kolthoff, I. M.; Sandell, E. B.; Meetran, E. J.; Bruckenstein, S. *Análisis Químico Cuantitativo;* sexta ed.; Niger: Buenos Aires, 1956.
5. Fischer, R. B.; Peters, D. G. *Análisis Químico Cuantitativo;* segunda ed.; Interamericana: México, 1970.
6. Chapman, A. C.; Thirlwell, L. E. *Spectrochimica Acta* **1964,** *20*, 937-947.

7. Rajkumar, B. J. M.; Ramakrishnan, V. *Spectrochimica Acta Part A* **2001,** *57*, 247-254.
8. Lien-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Graselli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristics Frequencies of Organic Molecules;* Academic Press, Inc.: California, USA, 1991.
9. He, Z.; Honeycutt, C. W.; Zhang, T.; Bertsch, P. M. *Journal of Environmental Quality* **2006,** *35*, 1319-1328.
10. Barlt, F.; Urjasz, H.; Brzezinski, B. *Journal of Molecular Structure* **1998,** *441*, 77-82.
11. Youngme, S.; Phuengphai, P.; Chaichit, N.; Pakawatchai, C.; van Alvada, G. A.; Roubeau, O.; Reedijk, J. *Inorganica Chimica Acta* **2004,** *357*, 3603-3612.
12. Stefov, V.; Soptrajanov, B.; Spirovski, F.; Kuzmanovski, I.; Lutz, H. D.; Engelen, B. *Journal of Molecular Structure* **2004,** *689*, 1-10.
13. Rodrigues-Filho, U. P.; Vaz, J.; Felicissimo, M. P.; Scarpellini, M.; Cardoso, D. R.; Vinhas, R. C. J.; Landers, R.; Schneider, J. F.; McGarvey, B. R.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 1973-1982.

Sección III

myo-inositol(1,2,3)trisfosfato

Capítulo 12

Especiación química del Ins(1,2,3)P_3 en solución

Se presentan en este capítulo los resultados del estudio termodinámico, por potenciometría de alta resolución, de la especiación química del Ins(1,2,3)P_3 en ausencia y en presencia de los iones Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} y Fe^{3+}, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y temperatura. Se analiza, en base a las constantes de equilibrio ajustadas, las características ácido-base y de complejación del ligando, y cómo éstas modulan el comportamiento químico del mismo en presencia de cationes metálicos. Se finaliza la presentación con una evaluación general de la selectividad y eficiencia relativa con las que este inositol fosfato se desempeña como agente secuestrante de iones +1, +2 y +3.

1. Introducción

Actualmente se cree que las células de mamíferos contienen un *pool* de hierro no unido a proteínas, el cual se ha identificado como "lábil", "en tránsito" o "quelable" [1,2]. Este conjunto de especies es muy importante desde el punto de vista biológico, ya que parece mediar en el flujo de este metal entre las grandes reservas proteicas intracelulares, como la ferritina y otras ferroenzimas. El tamaño, los ligandos y las características de compartimentalización del *pool* de hierro lábil continúa siendo hoy un misterio. De igual manera ocurre con el estado de oxidación preferente del hierro, ya que distintos sideróforos pueden formar una amplia variedad de complejos estables tanto con el ion Fe^{2+} como con el ion Fe^{3+}. Este *pool* intracelular ha sido definido operacionalmente a partir de la fracción secuestrada de metal por sondas sensibles al hierro y permeables a las membranas celulares, como la calceína [3,4]. Dependiendo de la sonda utilizada, se han reportado concentraciones de hierro en tránsito entre 1 y 10 µM, siendo un porcentaje mínimo del total del metal a nivel celular [1,2].

Al menos una parte de este hierro lábil se cree unido a ligandos de bajo peso molecular [5], cuya identidad hoy en día no es del todo clara. Entre los sideróforos propuestos se encuentran moléculas como ADP, ATP, citrato, ascorbato, ortofosfato, péptidos, etc. Sin embargo, a este respecto existen dos aspectos que no han sido considerados con la suficiente rigurosidad. En primer lugar, un desempeño satisfactorio en este sentido requiere que cada uno de estos agentes quelantes sean capaces de unir, preferentemente, los iones $Fe^{2+/3+}$ frente al ion Mg^{2+}, mucho más abundante a nivel intracelular. Segundo, estas moléculas deberían unir al hierro de forma "segura", no permitiéndole pivotar entre ambos estados de oxidación, +II y +III. Esta "oscilación redox" es una condición necesaria para la catálisis homogénea efectiva de la reacción de Fenton, cuyos productos son radicales libres fuertemente tóxicos para la célula. Dado que algunos de estos potenciales sideróforos no cumplen con esta última condición[6-9], se asume en general que el riesgo citotóxico es un precio que la célula debe pagar inevitablemente para movilizar hierro. Desde un punto de vista evolutivo, no obstante, es difícil creer que los organismos vivos no hayan podido generar vías para inhibir este tipo de degeneración oxidativa.

Existe un conjunto de ligandos de bajo peso molecular capaces de prevenir la catálisis de la reacción de Fenton *in vitro*. Estos son una subfamilia de los inositol fosfatos, compuesta por aquellos miembros fosforilados en las posiciones 1, 2 y 3: Ins(1,2,3)P_3, Ins(1,2,3,5)P_4, Ins(1,2,3,6)P_4, Ins(1,2,3,4,6)P_5, Ins(1,2,3,4,5)P_5 e InsP_6 [10-13]. Su capacidad antioxidante se debe a la gran afinidad que muestran por el hierro, para la cual el arreglo "1,2,3" que comparten parece ser necesario y suficiente. Nuevamente, sin embargo, la competencia del ion magnesio, mucho más abundante, podría desfavorecer a estos ligandos de asociarse al catión hierro *in vivo*. De hecho, un estudio detallado de la química del fitato confirmó recientemente que, en condiciones fisiológicas, el InsP_6 se encuentra asociado completamente a magnesio[14]. Dado que no es evidente que el mismo impedimento sea aplicable a los miembros de menor grado de fosforilación, un estudio fisicoquímico de la capacidad ácido-base y de complejación de los ligandos, en medio fisiológico, se hace indispensable para la racionalización de las bases químicas de este tipo de función biológica.

Según la opinión de expertos en este campo[15], la atención de los investigadores se ha reenfocado actualmente al miembro más simple, el *myo*-inositol(1,2,3)trisfosfato, (Ins(1,2,3)P_3, H_6L, figura 12.1), de función aún desconocida [16,17]. De hecho, si existe un inositol fosfato cuya función primordial sea la de secuestrar de forma "segura" al hierro lábil, es razonable que, desde un punto de vista biológico, sea aquel fosforilado sólo en las posiciones necesarias para una efectiva complejación (C1, C2 y C3).

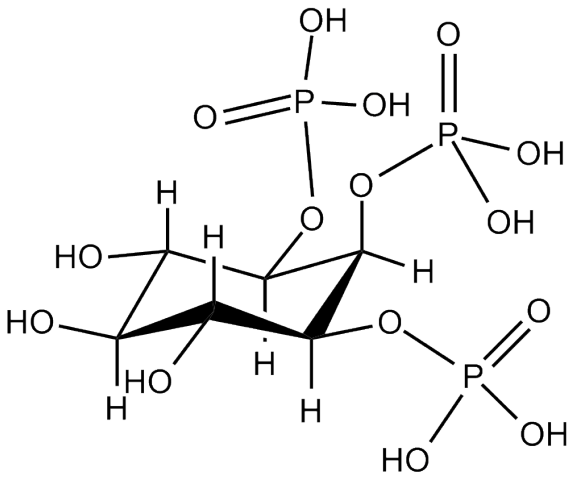


Figura 12.1. Estructura del Ins(1,2,3)P_3 (H_6L).

Hasta el inicio de esta tesis, se había reportado en la bibliografía un único trabajo relativo a las características ácido-base del Ins(1,2,3)P_3 [18]. En el mismo, se analizan los equilibrios de protonación del ligando a nivel macromolecular e inframolecular, mediante potenciometría de alta resolución y espectroscopía de RMN de ^{31}P. Dado que las medidas fueron realizadas en presencia de grandes cantidades de ion potasio (0,2 M de KCl), los complejos de K^+ formados alteran la posición de las señales y oscurecen un posible análisis químico y estructural de la capacidad intrínseca de protonación del InsP_3. Adicionalmente, exceptuando los reportes derivados de esta tesis, no existen datos termodinámicos que caractericen a los equilibrios de formación de especies complejas del Ins(1,2,3)P_3, haciendo imposible una evaluación cuantitativa y sistemática de las propiedades secuestrantes del mismo frente a iones relevantes en sistemas biológicos, como K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} y $Fe^{2+/3+}$.

En consideración de estas circunstancias, se exponen aquí los resultados de la caracterización termodinámica de la química en solución acuosa del Ins(1,2,3)P_3, en ausencia y en presencia de varios iones metálicos, en un medio no interactuante y en condiciones de fuerza iónica y temperatura similares a las fisiológicas.

2. Parte experimental

Las constantes de protonación y de formación de complejos del Ins(1,2,3)P_3 con los iones Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+} y Fe^{3+} fueron determinadas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, de acuerdo con las condiciones detalladas en el capítulo 4. Entre 2 y 7 titulaciones fueron llevadas a cabo para cada sistema, entre pH 2 y 11, para concentraciones de 0,5 a 5 mM de ligando, 60 y 90 mM de metales alcalinos y 0,2 a 2 mM de metales alcalinotérreos y de transición. En estas condiciones, se cubrieron las relaciones molares Ins(1,2,3)P_3:M de 0,01 y 0,02 para metales alcalinos y 0,5 a 3 para metales alcalinotérreos y de transición. En el caso del sistema conteniendo Fe(II) las titulaciones fueron conducidas hasta pH neutro, debido a la oxidación del catión metálico observada experimentalmente. Para el ajuste de las constantes de estabilidad de los complejos con Fe(III), las constantes de hidrólisis determinadas en esta tesis fueron tenidas en cuenta en el cálculo.

3. Resultados y discusión

3.1. Equilibrios de protonación

Dado que es un requerimiento para estudiar los procesos de complejación del ligando, se determinaron primeramente las constantes de protonación del Ins(1,2,3)P_3 (H_6L) en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. Los resultados obtenidos, así como otros datos termodinámicos extraídos de reportes anteriores para éste y otros InsP_3, se muestran en la tabla 12.1. De las seis posibles reacciones de protonación, sólo cuatro pudieron ser caracterizadas de forma precisa en las condiciones de trabajo. Los valores ajustados están de acuerdo con los reportados para el mismo ligando por Dozol *et al.* [18], aunque existen pequeños apartamientos entre los conjuntos de constantes, originados probablemente

en los diferentes electrolitos soporte utilizados para el ajuste de la fuerza iónica (0,2 M en KCl en el mencionado reporte *vs.* NMe_4Cl en este trabajo).

Como se discutió en el capítulo 2, el conjunto de constantes de protonación determinadas en KCl para los miembros mono, bis y trisfosforilados del inositol difiere, significativamente, del determinado en NBu_4Br. En efecto, las K^H obtenidas para los ligandos Ins(1,2,6)P_3 e Ins(1,4,5)P_3 en presencia de exceso de ion K^+ no sólo son menores de forma sistemática, sino además pueden ser determinadas exclusivamente las primeras tres de ellas (tabla 12.1). Dado que ha sido probado que la variación de la fuerza iónica y la temperatura entre ambos medios no explica esta diferencia[19], este fenómeno se ha asociado a la interacción entre el catión K^+ y los distintos Ins*P*, que provoca la formación de complejos metálicos y el desplazamiento consecuente de los protones de las especies del ligando.

Tabla 12.1. Logaritmo de las constantes de protonación ajustadas para el Ins(1,2,3)P_3 en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C (σ = 0,8) [a].

Ligando	log K^H_1	log K^H_2	log K^H_3	log K^H_4	Condiciones	Ref.
Ins(1,2,3)P_3	9,239(4)	7,340(8)	5,37(1)	2,00(1)	NMe_4Cl 0,15 M (37 °C)	Este trabajo
	9,37	7,68	5,43	---	KCl 0,2 M (37 °C)	18
Ins(1,2,6)P_3	9,48	7,22	5,70	2,40	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	19
	8,22	6,38	5,21	---	KCl 0,2 M (37 °C)	
Ins(1,4,5)P_3	8,74	7,02	5,80	2,61	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	20
	7,85	6,40	5,31	---	KCl 0,2 M (37 °C)	
Ins(2,4,6)P_3	8,20	6,84	5,81	2,64	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	21
Ins(1,3,5)P_3	8,05	6,99	6,01	2,63	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	21

[a] Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa. Datos reportados previo a esta tesis para varios *myo*-inositoltrisfosfatos se muestran a modo de comparación.

El Ins(1,2,3)P_3 no sigue esta tendencia. En este caso, los valores de constantes de protonación ajustadas exhiben una dependencia mucho menor con la presencia del ion alcalino. Más aún, los valores aumentan levemente en KCl 0,2

M respecto de los ajustados en NMe_4Cl 0,15 M a la misma temperatura. Este fenómeno da cuenta de una diferencia en la interacción ligando-K^+ entre el Ins(1,2,3)P_3 y sus congéneres trisfosfato. En efecto, como será discutido en la siguiente sección, este miembro es capaz de formar especies complejas un poco menos estables y en un mayor grado de protonación que las análogas de Ins(1,2,6)P_3, neutralizando en cierto grado el efecto debido al desplazamiento de iones H^+ por K^+.

Específicamente en un medio no interactuante, los resultados están de acuerdo con algunos aspectos resaltados por el grupo de B. Spiess. Por una parte, existe una diferencia notoria entre los valores de K^H determinados para el Ins(1,2,3)P_3 (9,239, 7,340, 5,43 y 2,00). Segundo, de ellos solamente los dos primeros son mayores a los correspondientes al Ins(1)P_1 e Ins(2)P_1 (6,50 y 5,83 respectivamente; ver capítulo 2). Estos resultados dan cuenta de dos factores que gobiernan la acidez de los grupos ionizables: uno que la incrementa, a través de la gran hidrofilia del anión formado, y otro que la disminuye, por formación de fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares [19].

En ausencia de ion metálico y dejando al margen las consideraciones debidas a las diferentes condiciones experimentales adoptadas, la tabla 12.1 marca un orden tentativo de los valores de K^H_1 para los distintos isómeros: Ins(1,2,6)P_3 > Ins(1,2,3)P_3 > Ins(1,4,5)P_3 > Ins(2,4,6)P_3 > Ins(1,3,5)P_3. Esto evidencia, en línea con lo discutido en el capítulo 2, que el primer protón que ingresa interacciona más fuertemente con aquellos miembros cuyos grupos fosfatos se encuentran situados en carbonos adyacentes. La intensidad de esta interacción decrece, asimismo, a medida que los grupos ionizables se separan. Por otra parte, la configuración donde los grupos adyacentes se encuentran mayoritariamente en posición ecuatorial parece optimizar la fuerza de la unión L^{6-}-H^+.

En la figura 12.2 se presenta el diagrama de distribución de especies para una solución 1 mM de ligando en las condiciones elegidas para el estudio. Al aumentar el pH desde 2, el Ins(1,2,3)P_3 se deprotona en forma sucesiva. A pH cercano al del citosol y núcleo celulares y en ausencia de iones metálicos, las formas predominantes del ligando son HL^{5-} y H_2L^{4-}. La alta carga que exhiben estas especies permite sugerir que las interacciones de tipo electrostático con cationes del medio serán significativas en sistemas biológicos.

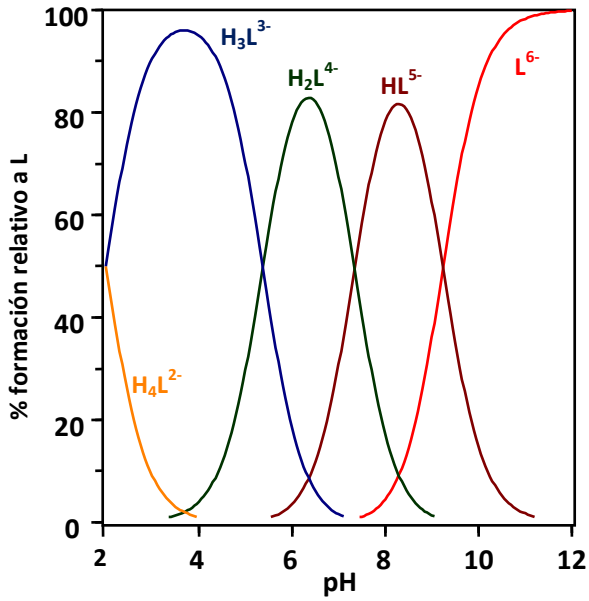


Figura 12.2. Diagrama de distribución de especies para una solución 1 mM de Ins(1,2,3)P_3, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

3.2. Interacción del Ins(1,2,3)P_3 con iones alcalinos

Desde un punto de vista fisicoquímico, se espera que las interacciones del Ins(1,2,3)P_3 con iones alcalinos sean, seguramente, más débiles que las correspondientes a iones metálicos multivalentes. No obstante, las altas concentraciones de iones Na^+ y K^+ presentes en medios biológicos hace necesario el análisis de la especiación química de los sistemas Ins(1,2,3)P_3-M^+. Las estequiometrías y constantes de estabilidad ajustadas de los complejos de sodio y potasio se muestran en la tabla 12.2. Se detectaron mayoritariamente especies 1:1 del tipo $[M_i(H_jL)]^{(6-i-j)-}$ con *i:j* = (1:0), (1:1) y (1:2), y un complejo neutro polinuclear de fórmula general $[M_2(H_4L)]$.

Las constantes de formación de complejos son relativamente grandes para especies metálicas involucrando iones alcalinos, un hecho reportado previamente para el Ins(1,2,6)P_3 [19]. A modo de comparación, para el EDTA las constantes de formación de los complejos 1:1 con Li^+, Na^+, K^+, Rb^+ y Cs^+, en condiciones similares, son 2,90, 1,84, 0,80, 0,59 y 0,15 respectivamente[22]. Respecto de los complejos 1:1, para un catión monovalente la neutralización de la carga de las especies del ligando por protonación provoca una disminución en la estabilidad de los complejos (tabla 12.2), lo que da cuenta de la competencia de los iones H^+ por los grupos ionizables del ligando. La fuerza del

enlace metal-ligando parece estar modulada, en parte, por la carga de las especies del ligando, en concordancia con un modelo de unión esencialmente electrostático.

Tabla 12.2. Logaritmo de las constantes de formación de complejos del Ins(1,2,3)P_3 con iones alcalinos, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

Metal	Equilibrio	log *K* (Ins(1,2,3)P_3)[a]	σ	log *K* (Ins(1,2,6)P_3)[b]
Na(I)	$Na^+ + L^{6-} \leftrightarrow [NaL]^{5-}$	**1,82(4)**	0,4	2,32
	$Na^+ + HL^{5-} \leftrightarrow [Na(HL)]^{4-}$	**1,21(4)**		1,81
	$Na^+ + H_2L^{4-} \leftrightarrow [Na(H_2L)]^{3-}$	**0,73(5)**		1,23
	$2\,Na^+ + H_4L^{2-} \leftrightarrow [Na_2(H_4L)]$	**1,95(1)**		---
	$2\,Na^+ + L^{6-} \leftrightarrow [Na_2L]^{4-}$	**---**		3,49
K(I)	$K^+ + L^{6-} \leftrightarrow [KL]^{5-}$	**1,70(5)**	0,5	2,58
	$K^+ + HL^{5-} \leftrightarrow [K(HL)]^{4-}$	**1,21(5)**		1,98
	$K^+ + H_2L^{4-} \leftrightarrow [K(H_2L)]^{3-}$	**0,79(6)**		1,36
	$2\,K^+ + H_4L^{2-} \leftrightarrow [K_2(H_4L)]$	**2,35(3)**		---
	$2\,K^+ + L^{6-} \leftrightarrow [K_2L]^{4-}$	**---**		3,84

[a] Este trabajo. Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa. [b] Datos para el Ins(1,2,6)P_3 tomados de una referencia externa[22] en NBu_4Br 0,1 M a 25 °C.

Para el Ins(1,2,6)P_3 el modelo de especies reportado muestra las mismas especies 1:1, aunque los valores correspondientes de log *K* de estabilidad son sensiblemente mayores que los del Ins(1,2,3)P_3 (tabla 12.2). En conclusión, la interacción metal-InsP_3 es más intensa en el primer caso, lo que, seguramente, está relacionado con la disposición espacial de los grupos fosfato y el patrón de protonación macro e inframolecular de las especies disponibles de ambos ligandos. Por otra parte, mientras que para el Ins(1,2,3)P_3 se detecta el complejo $[M_2(H_4L)]$, altamente protonado y predominante en medio ácido (ver más adelante), el Ins(1,2,6)P_3 forma la especie dinuclear $[M_2L]^{4-}$, donde el ligando se encuentra completamente deprotonado. Estos resultados marcan una diferencia en la naturaleza de la interacción ligando-metal entre ambos InsP_3; mientras que el Ins(1,2,3)P_3 forma especies complejas estables en un

amplio grado de protonación, el Ins(1,2,6)P_3 sólo lo hace a partir de H_2L^{4-} o formas menos protonadas. Todos estos aspectos brindan una posible explicación a la diferente dependencia que tienen las constantes de protonación de ambos miembros con la naturaleza del electrolito soporte.

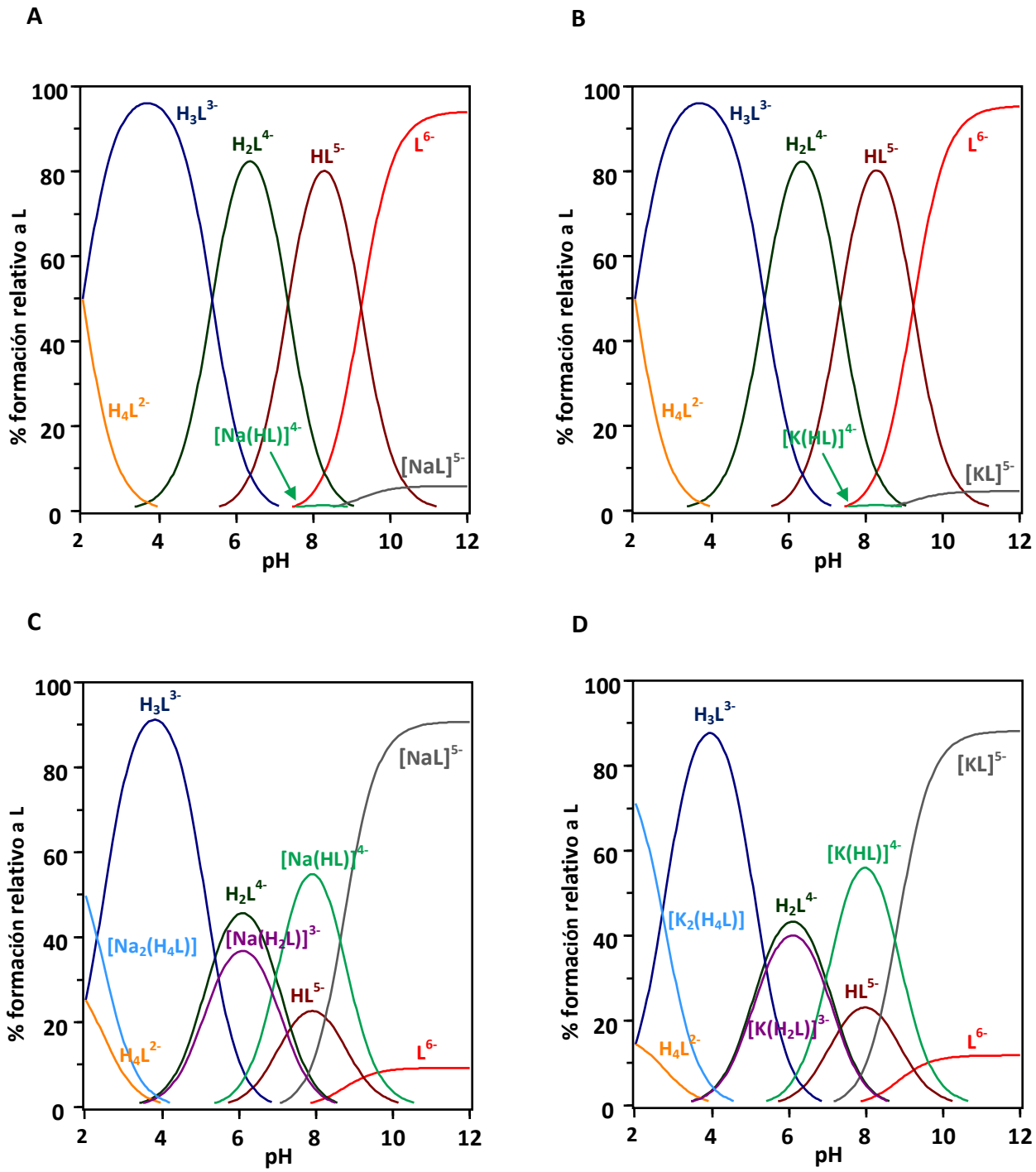


Figura 12.3. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Ins(1,2,3)P_3-M(I), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C. [L] = 1 mM, [M] = 1 mM (A y B) ó 150 mM (C y D). M = Na^+ (A y C) y K^+ (B y D).

Las figuras 12.3A y B muestran la distribución de especies en una solución 1 mM de Ins(1,2,3)P_3 y 1 mM de ion sodio o potasio. El ligando no parece exhibir selectividad alguna frente a los iones alcalinos, de acuerdo con lo discutido en el capítulo 2 para el Ins(1,2,6)P_3. Aunque las estabilidades de las especies son altas para complejos con metales alcalinos, no son grandes en términos absolutos, por lo que en condiciones equimolares de ligando y metal el porcentaje de Ins(1,2,3)P_3 asociado a los iones M^+ es muy pequeño; por debajo del 1 % para valores de pH menores a 7,6, y menos de un 5 % a cualquier pH.

En presencia de concentraciones fisiológicas de Na^+ o K^+, la distribución y predominancia de las especies cambia significativamente (figuras 12.3C y D). El Ins(1,2,3)P_3 se predice asociado al metal monovalente en todo el rango de pH analizado, como consecuencia de la formación del complejo polinuclear altamente protonado por debajo de pH = 4, y las especies 1:1 de estabilidad y predominancia crecientes en el rango de pH 4 - 10. En condiciones fisiológicas simuladas, las especies complejas predominantes son, en ambos casos, $[M(H_2L)]^{3-}$ y $[M(HL)]^{4-}$.

3.3. Interacción del Ins(1,2,3)P_3 con iones divalentes

Los resultados de la caracterización de los equilibrios de complejación del Ins(1,2,3)P_3 en presencia de iones M^{2+} se resumen en la tabla 12.3. Se detectan complejos 1:1 de fórmula general $[M(H_jL)]^{(6-2-j)-}$, con j = 1 y 2 para Mg(II), Ca(II) y Cu(II) y j = 1, 2 y 3 para Fe(II). Se logra, asimismo, el ajuste con la formación de complejos neutros polimetálicos del tipo $[M_3L]$ para Mg(II), Ca(II) y Cu(II), y $[M_2(H_2L)]$ para Fe(II). Por comparación entre las constantes de formación de las tablas 12.2 y 12.3, la estabilidad de los complejos 1:1 es significativamente mayor que la determinada para estas especies en los sistemas Ins(1,2,3)P_3-M^+. Además, para un catión divalente dado, la disminución de la carga de las especies reactivas del ligando provoca una disminución en la estabilidad de los complejos. Estos aspectos apoyan la idea de un modelo de enlace en esencia electrostático, cuya fuerza sea modulada por el potencial iónico del catión y la carga de las especies aniónicas del ligando.

Tabla 12.3. Logaritmo de las constantes de formación de complejos del Ins(1,2,3)P_3 con cationes +2 y +3, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C.

Catión	Equilibrio	log *K* (Ins(1,2,3)P_3)[a]	σ	log *K* (Ins(1,2,6)P_3)[b]
Mg^{2+}	$Mg^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [MgL]^{4-}$	**4,30(2)**	0,3	5,61
	$Mg^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Mg(HL)]^{3-}$	**3,28(1)**		4,02
	$Mg^{2+} + H_2L^{4-} \leftrightarrow [Mg(H_2L)]^{2-}$	---		2,71
	$3\ Mg^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [Mg_3L]$	**9,94(5)**		11,28
Ca^{2+}	$Ca^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [CaL]^{4-}$	**4,25(2)**	0,3	5,80
	$Ca^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Ca(HL)]^{3-}$	**3,00(2)**		4,09
	$Ca^{2+} + H_2L^{4-} \leftrightarrow [Ca(H_2L)]^{2-}$	---		2,63
	$2\ Ca^{2+} + H_2L^{4-} \leftrightarrow [Ca_2(H_2L)]$	---		5,45
	$3\ Ca^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [Ca_3L]$	**10,66(3)**		11,58
Fe^{2+}	$Fe^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [FeL]^{4-}$	**6,7(1)**	0,3	5,81
	$Fe^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{3-}$	**5,21(8)**		4,11
	$Fe^{2+} + H_2L^{4-} \leftrightarrow [Fe(H_2L)]^{2-}$	**3,76(8)**		---
	$2\ Fe^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [Fe_2L]^{2-}$	---		9,92
	$2\ Fe^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Fe_2(HL)]^{-}$	---		7,92
	$2\ Fe^{2+} + H_2L^{4-} \leftrightarrow [Fe_2(H_2L)]$	**7,4(1)**		---
Cu^{2+}	$Cu^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [CuL]^{4-}$	**7,69(4)**	0,7	7,91
	$Cu^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Cu(HL)]^{3-}$	**5,67(3)**		5,66
	$2\ Cu^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Cu_2(HL)]^{-}$	---		9,43
	$3\ Cu^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [Cu_3L]$	**15,9(1)**		---
	$Cu^{2+} + L^{6-} + H_2O \leftrightarrow [CuL(OH)]^{5-} + H^{+}$	---		-1,39
Fe^{3+}	$Fe^{3+} + L^{6-} \leftrightarrow [FeL]^{3-}$	**19,04(4)**	0,6	13,75
	$Fe^{3+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{2-}$	**14,36(6)**		10,52
	$2\ Fe^{3+} + L^{6-} \leftrightarrow [Fe_2L]$	---		22,21
	$Fe^{3+} + L^{6-} + H_2O \leftrightarrow [FeL(OH)]^{4-} + H^{+}$	**12,73(2)**		---

[a] Este trabajo. Entre paréntesis se detalla el valor estimado de la desviación estándar de la última cifra significativa. [b] Datos para el Ins(1,2,6)P_3 tomados de referencias externas[19,21] en NBu_4Br 0,1 M a 25 °C.

Los resultados obtenidos son similares a aquellos reportados (en diferentes condiciones) para el Ins(1,2,6)P_3 [19,21]. No obstante, para las especies en común, este último presenta valores de log *K* mayores, por lo que, al igual que ocurría con los iones M^+, la interacción metal-ligando se intensifica cuando los grupos ionizables se ubican en carbonos adyacentes en un esquema "C1-C2-C6". De forma interesante, este esquema de coordinación surgía, independientemente, a partir de los datos experimentales de RMN de ^{31}P para los complejos 1:1 del fitato con iones M^{2+} (capítulo 7).

Un análisis en conjunto de los datos de la tabla 12.3 revela que el Ins(1,2,3)P_3 interacciona de forma muy similar con ambos iones alcalinotérreos, por lo que no exhibe selectividad alguna en este sentido. De acuerdo con esto, los diagramas de distribución de especies derivados son muy similares (figuras 12.4A y B). A concentraciones 1 mM de ligando y metal, se espera que los procesos de complejación se establezcan por encima de pH = 6, con la aparición de los complejos mononucleares predominantes y el complejo trinuclear minoritario. A pH = 7,4, las especies relevantes son $[Mg(HL)]^{3-}$ y $[Ca(HL)]^{3-}$ para magnesio y calcio respectivamente. Dado que la deprotonación de la forma H_2L^{4-} induce la unión M^{2+}-ligando, es factible que sea necesaria la formación de dos grupos ionizables con carga -2 para una efectiva complejación del catión metálico.

Por su parte, los dos iones de transición incluidos en el análisis dan lugar a modelos de especies distintos entre sí, lo que complica una evaluación comparativa. Las figuras 12.4C y D muestran la distribución de especies para soluciones 1 mM de ligando y metal. En presencia de Cu^{2+}, se detectan para el Ins(1,2,3)P_3 especies complejas de la misma estequiometría que para los cationes alcalinotérreos. No obstante, respecto de estos últimos la estabilidad de las especies es sustancialmente mayor, dando lugar, a partir de pH = 4, a la formación de especies metálicas mononucleares y polinucleares, predominantes en medio básico. A pH fisiológico, los resultados indican que los complejos predominantes del cobre son $[Cu(HL)]^{3-}$ y $[CuL]^{4-}$. Por otra parte, el ion Fe^{2+} forma con el Ins(1,2,3)P_3 especies 1:1 y 2:1 metal:ligando, las cuales se predicen en el rango de pH 2 - 7, asociando más de la mitad del ion metálico a partir de pH = 4. En las condiciones empleadas en las corridas potenciométricas la oxidación del hierro(II), evidenciada a simple vista por la aparición de una

coloración amarilla de la solución, ocurre en medio básico, por lo que las predicciones realizadas se restringen, estrictamente, a medio ácido-neutro. Para ambos iones 3d, la pérdida de un protón de H_3L^{3-} gatilla la formación de los complejos, por lo que en estos casos es necesaria la existencia de un grupo ionizable completamente deprotonado para una unión efectiva metal-ligando.

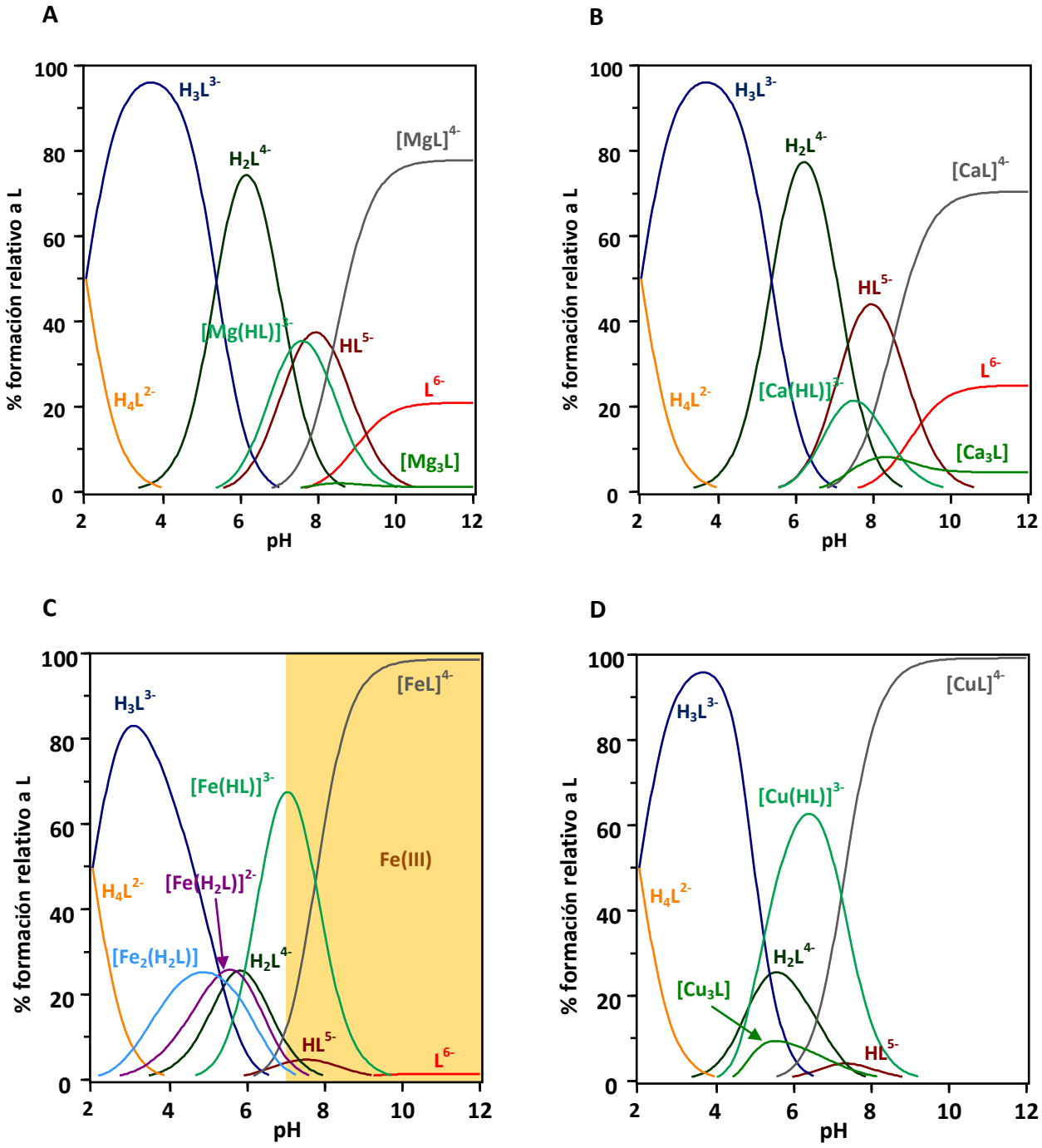


Figura 12.4. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Ins(1,2,3)P_3-M(II), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, [M] = 1 mM). M = Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Fe^{2+} (C) y Cu^{2+} (D). En (C) se resalta la zona en donde ocurre la oxidación del ion Fe(II).

3.4. Visión completa del comportamiento del Ins(1,2,3)P_3 frente a iones M^{2+}

Las constantes ajustadas de protonación y complejación del Ins(1,2,3)P_3 con iones divalentes permiten realizar una descripción completa de la especiación química del ligando en presencia de los cationes M^{2+}. A modo de ejemplo, en la figura 12.5 se muestra, a pH fisiológico, el comportamiento que exhibe el Ins(1,2,3)P_3 en presencia de los iones magnesio(II) o cobre(II), en función de la concentración de ligando y metal. En términos generales, el patrón de reactividad química del inositol fosfato está caracterizado por la predominancia de complejos solubles 1:1 en condiciones de exceso de ligando (figuras 12.5A y B), y el dominio de la especie trimetálica neutra $[M_3L]$ en condiciones de exceso de ion metálico (figuras 12.5C y D).

En ambos sistemas, para una concentración fija de catión, un incremento en la concentración de ligando causa la formación significativa del complejo polinuclear (figuras 12.5C y D). Dado que la estequiometría indica que por cada mol de ligando se asocian 3 moles de ion metálico, esta especie une una buena parte del metal total. Con un aumento ulterior de la concentración de Ins(1,2,3)P_3, la abundancia de los complejos 1:1 aumenta de forma monótona hasta coordinar todo el metal inicial (figuras 12.5A y B). En este sentido, un exceso de ligando altera la posición de los equilibrios, dirigiéndolos hacia la formación preferencial de las especies 1:1. Por otra parte, si se establece una concentración de ligando constante, al incrementarse la concentración del metal se observa, inicialmente, un aumento acentuado de la abundancia de los complejos 1:1 (figuras 12.5A y B). Cuando la relación metal:ligando comienza a ser mayor que 1:1, las especies mononucleares se transforman de forma progresiva, dando paso a la formación de los complejos 3:1 metal:ligando (figuras 12.5C y D).

La comparación entre los gráficos derivados de ambos sistemas evidencia una mayor concentración de los complejos 1:1 y 3:1 en el caso del ion Cu^{2+}. Esto se origina en la mayor estabilidad de las especies metálicas de cobre frente a la de los complejos de los iones alcalinotérreos. Este fenómeno tiene repercusiones, asimismo, en el rango de coexistencia de ambos tipos de especies. El ion Cu^{2+} da lugar a complejos 1:1 y 3:1 cuyas condiciones de predominancia son bastante definidas, haciendo que la transición entre ambos tipos de especies se dé en un rango de [L] y [M] muy estrecho. Por el contrario, el ion Mg^{2+} forma

compuestos mono y polinucleares de estabilidad más similar entre sí, haciendo que ambos coexistan en un rango de condiciones más amplio, y definiendo, de forma más gradual, la transición entre ellos.

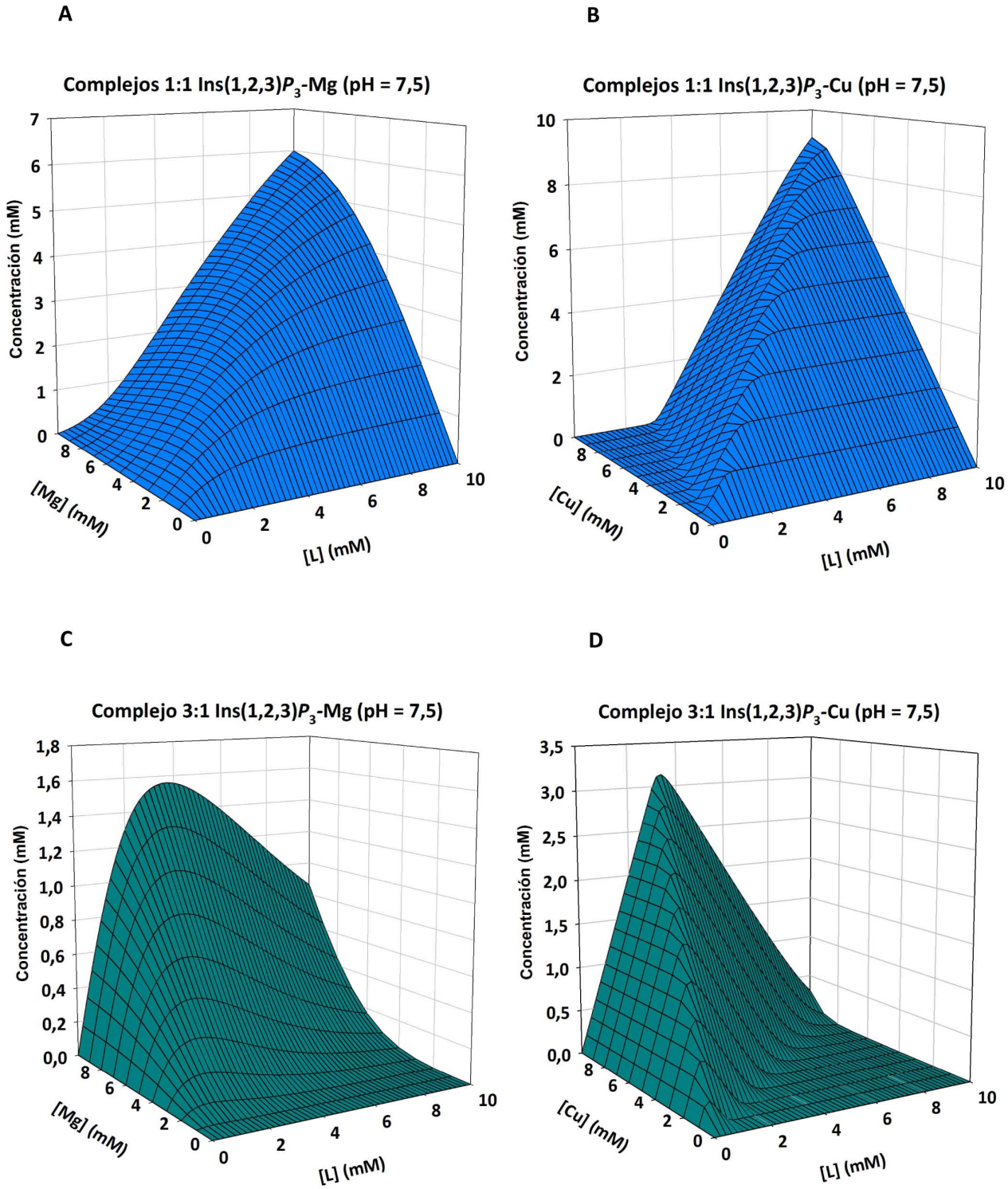


Figura 12.5 Comportamiento del Ins(1,2,3)P_3 frente al ion Mg^{2+} (A y C) o Cu^{2+} (B y D). Los gráficos muestran la concentración de las especies 1:1 (A y B) y el complejo neutro soluble (3:1) (C y D). Las predicciones son válidas a pH = 7,5 en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C.

3.5. Interacción del Ins(1,2,3)P_3 con el ion Fe^{3+}

En la tabla 12.3 se detallan los resultados del estudio potenciométrico del sistema conteniendo Fe^{3+} e Ins(1,2,3)P_3. En comparación con los iones divalentes, los complejos detectados muestran una estabilidad mucho mayor. Las estequiometrías determinadas corresponden a complejos 1:1 metal:ligando, de fórmulas $[Fe(HL)]^{2-}$, $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$, cuya predominancia se extiende, según el diagrama de la figura 12.6, en todo el rango de pH de estudio. Específicamente a pH cercano al fisiológico, las especies predominantes son $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$.

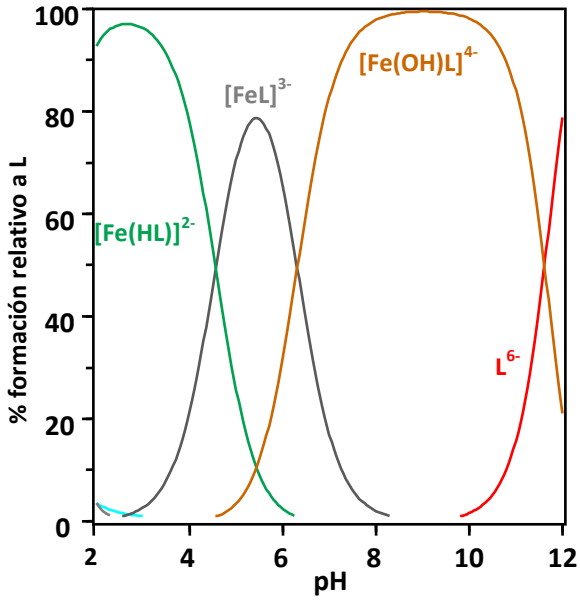


Figura 12.6. Diagrama de distribución de especies para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+}, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, $[Fe^{3+}]$ = 1 mM).

La mayor carga que exhibe el catión metálico, en comparación con los iones divalentes y monovalentes, provoca un aumento significativo en la fuerza de la interacción metal-ligando y, con ello, una mayor estabilidad y grado de deprotonación del ligando en las especies complejas. Las consecuencias de este fenómeno son relevantes. En efecto, en contraste con lo discutido para los iones divalentes, las especies detectadas son más estables que las análogas de otros InsP_3. Por ejemplo, para la especie $[FeL]^{3-}$, los logaritmos de las constantes de formación son 19,04 para el Ins(1,2,3)P_3, 13,75 para el Ins(1,2,6)P_3, 12,86 para el Ins(1,2,5)P_3 y 13,52 para el Ins(2,4,6)P_3 (tabla 12.3 y

referencia[23]). Esto brinda apoyo experimental a la idea de que el arreglo 1,2,3-trisfosfato es particularmente adecuado para una efectiva complejación del ion Fe^{3+}. En este sentido, la interacción metal-ligando posee dos características principales. En primer lugar el enlace presentaría un componente direccional importante, en contraste con la interacción de tipo electrostático entre el Ins(1,2,3)P_3 y los iones alcalinos y alcalinotérreos, la cual resulta sensible, mayoritariamente, a la carga total del catión y ligando. Segundo, la disposición espacial de los grupos ionizables concentraría la carga negativa, direccionando a la misma directamente hacia el ion Fe^{3+}.

Antes de finalizar esta sección es necesario precisar que la menor carga del Ins(1,2,3)P_3, respecto del Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6, provoca que los sistemas conteniendo Ins(1,2,3)P_3 e iones metálicos di y trivalentes sean más solubles. En efecto, no fue detectada la precipitación de fases sólidas del Ins(1,2,3)P_3 durante los experimentos potenciométricos en presencia de $M^{2+/3+}$.

3.6. Ins(1,2,3)P_3 como agente secuestrante

A partir de la información termodinámica presentada hasta aquí, es posible evaluar la selectividad y la eficiencia relativa del Ins(1,2,3)P_3 como agente secuestrante de iones metálicos. De la misma forma que se estableció para el InsP_6 e Ins(1,3,4,5,6)P_5, el desempeño del ligando estará gobernado, esencialmente, por la variación de su capacidad quelante con la naturaleza del ion en consideración, el pH y la relación metal a ligando.

La interacción Ins(1,2,3)P_3-M^{n+} es dependiente, básicamente, de la carga del ion metálico. Así, el ligando interacciona débilmente con los iones alcalinos, moderadamente con los alcalinotérreos y +2 de transición, y muy fuertemente con el ion Fe^{3+}. En detalle, para los iones M^+ se detectan especies mono y polinucleares predominantes sólo en condiciones de gran exceso de metal. En cambio para los iones +2 el comportamiento del sistema es dual, presentando especies mono y polinucleares cuya predominancia relativa es dependiente del pH y la relación M/L. A diferencia de lo observado para el Ins(1,3,4,5,6)P_5, la presencia de electrones *d* en los iones divalentes no tiene repercusiones directas en la nuclearidad de los complejos. De todos los iones +2 estudiados, el Fe(II) se aparta levemente de la tendencia, dando lugar a un modelo de

especies ligeramente diferente. El hierro(III), por su parte, da preferencia a complejos del tipo 1:1 metal:ligando muy estables.

Estos detalles de los modelos de especies, que establecen la naturaleza de la interacción metal-ligando, tienen directa repercusión en la selectividad que el Ins(1,2,3)P_3 exhibe frente a los diversos cationes. En la figura 12.7 se muestra la concentración de metal que el ligando deja libre en función del pH, para una solución 1 mM de ligando y metal.

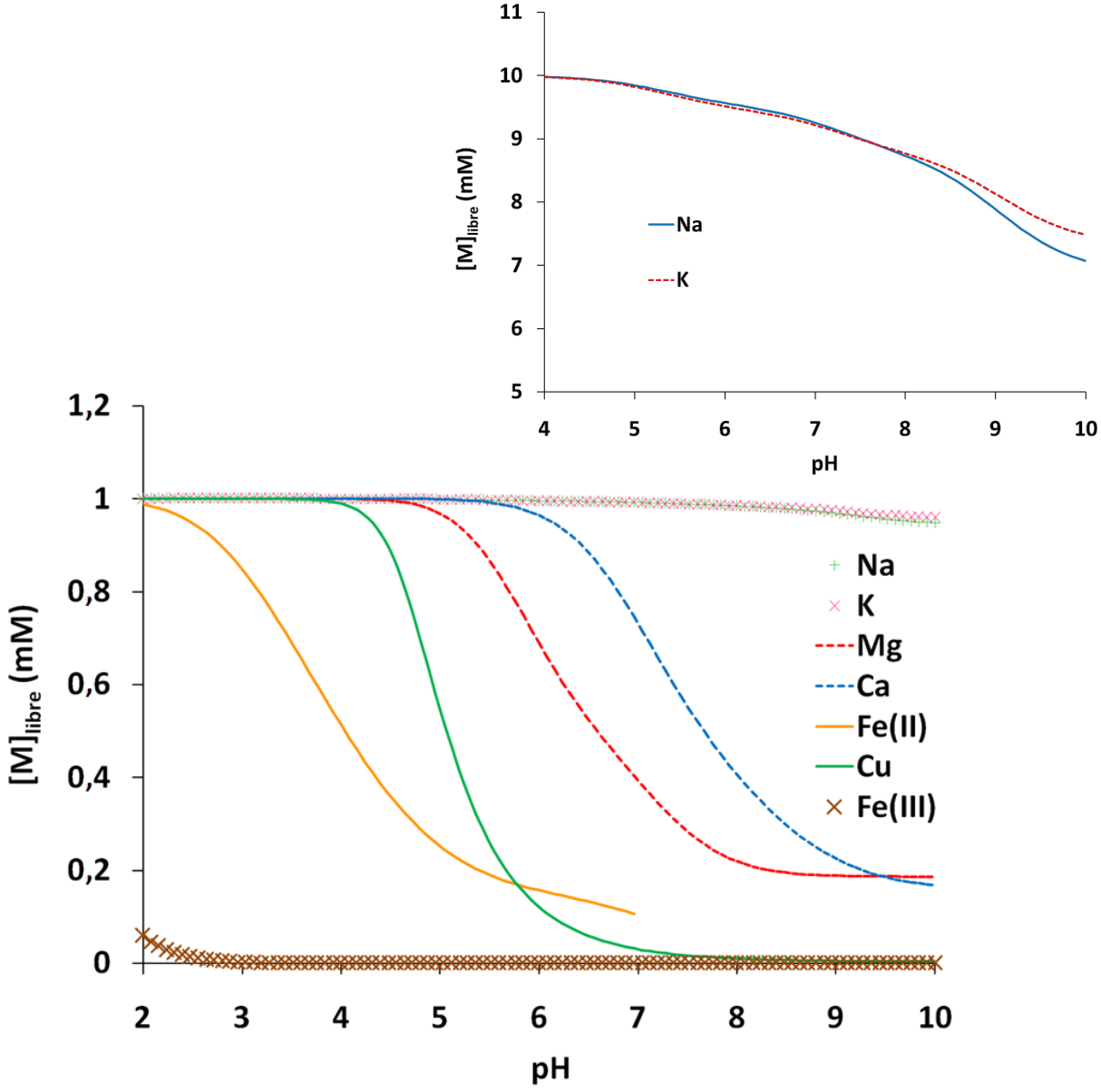


Figura 12.7. Concentración de metal libre en mM para los sistemas Ins(1,2,3)P_3-iones +1, +2 y +3, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = 1 mM, $[M^{+/2+/3+}]$ = 1 mM). La figura incrustada corresponde a los resultados obtenidos empleando [L] = $[M^+]$ = 10 mM.

En el caso de los iones Na^+ y K^+ la concentración de metal complejado es prácticamente nula en todo el rango de pH. Esto es coherente con la baja capacidad que tienen estos iones monovalentes para competir con el protón por los grupos ionizables. Si se aumenta 10 veces la concentración de ligando y metal, el gráfico incrustado de la figura muestra que, a este nivel, se observan diferencias en la concentración de metal libre a pH > 5, en donde el ligando interacciona siguiendo el orden $Na^+ > K^+$.

Respecto de los iones +2 y +3, el nivel de metal libre varía sustancialmente en el rango de pH 2 - 10. La concentración de magnesio libre en solución se ve incambiada hasta pH ≈ 5, ya que en medio ácido las formas protonadas del ligando son incapaces de complejar apreciablemente a este catión (figura 12.4A). A partir de este punto, se forman dos complejos 1:1 y un complejo trimetálico, que asocian de manera progresiva al metal alcalinotérreo (figura 12.7). Como resultado, la capacidad secuestrante del ligando en estas condiciones es máxima a pH superior a 8, en donde se predice un 80 % del magnesio asociado a este InsP_3. El calcio se comporta de manera muy similar, aunque dado que sus complejos son levemente menos estables, los procesos de complejación se evidencian por encima de pH = 6 (figura 12.4B).

En el caso del ion Cu^{2+}, el comportamiento sigue los mismos parámetros generales expuestos para los metales alcalinotérreos. Sin embargo, el aumento en la estabilidad de los complejos 1:1 y 3:1 provoca un incremento sustancial en la capacidad secuestrante del ligando. En las mismas condiciones, el Ins(1,2,3)P_3 comienza a ser activo frente a la complejación a pH ≈ 4, con la aparición de los complejos $[Cu(HL)]^{3-}$ y $[Cu_3L]$. Un aumento ulterior de pH desencadena la formación de la especie 1:1 $[CuL]^{4-}$, cuya gran estabilidad y predominancia causa una asociación cuantitativa del metal en medio básico (figuras 12.4D y 12.7). El hierro(II), en cambio, se comporta frente al Ins(1,2,3)P_3 de manera diferente. Dado que para este ion se detecta la presencia de las especies $[Fe_2(H_2L)]$ y $[Fe(H_2L)]^{2-}$ en medio ácido, la concentración de metal libre disminuye significativamente por encima de pH ≈ 2. La capacidad secuestrante del ligando se hace máxima en medio neutro, donde se predice complejado más de un 80 % del metal total inicial.

Los niveles de ion Fe^{3+} libres determinados son muy bajos, por lo que el mismo será secuestrado en un 100 % a partir de pH = 3. Esto es consecuencia, como se

mencionó previamente, de la gran interacción Fe^{3+}-Ins(1,2,3)P_3, la cual permite a este inositol fosfato desempeñarse como un excelente agente secuestrante de hierro(III) en las condiciones de medida.

Las curvas de la figura 12.7 dejan en evidencia la gran diferencia de estabilidad que existe entre las especies complejas de los cationes con distinta carga. Como consecuencia directa de este fenómeno, en concentraciones del orden milimolar, el ligando muestra buena selectividad hacia los diversos iones ensayados. A pH = 7, por ejemplo, el Ins(1,2,3)P_3 se une a los cationes mono y multivalentes en un amplio grado: Na^+ (0 %), K^+ (0 %), Mg^{2+} (60 %), Ca^{2+} (75 %), Fe^{2+} (89 %), Cu^{2+} (97 %) y Fe^{3+} (100 %).

Mediante la combinación de la información presentada en éste y otros capítulos anteriores, es posible evaluar la eficiencia relativa del Ins(1,2,3)P_3 como ligando secuestrante frente a otros inositol fosfatos, como Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6. Los resultados de estos estudios para los iones K^+, Mg^{2+} y Fe^{3+} se exponen en las figuras 12.8 y 12.9, donde se muestran los gráficos de porcentaje de metal libre a medida que se varía el pH para soluciones equimolares de metal y ligando.

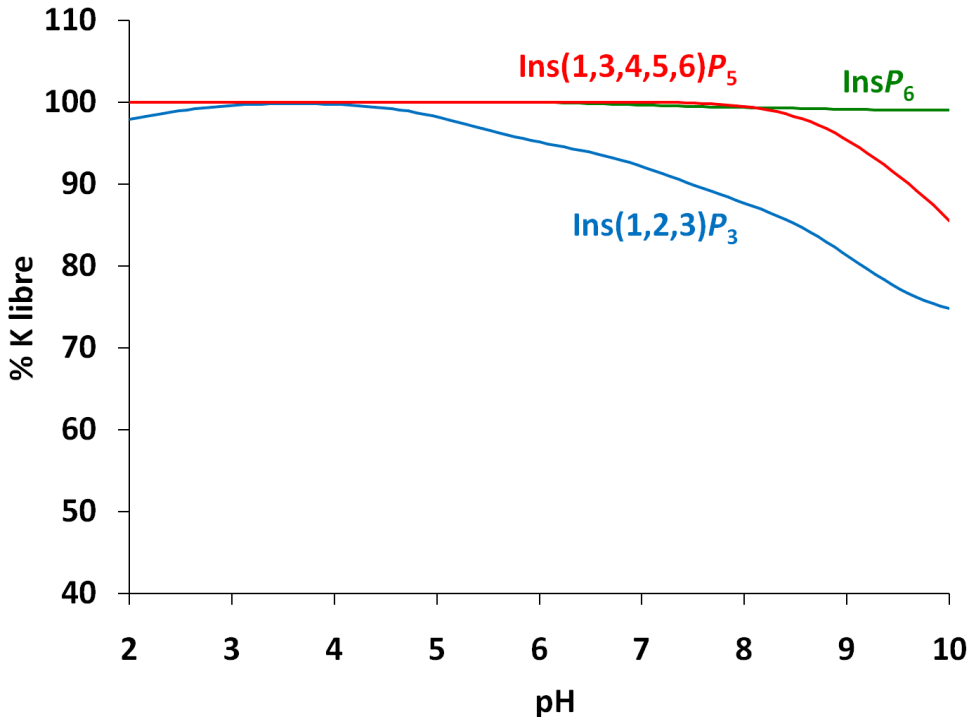


Figura 12.8. Porcentaje de metal libre en función del pH para un sistema conteniendo K^+ e Ins(1,2,3)P_3, Ins(1,3,4,5,6)P_5 o InsP_6, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = [K^+] = 10 mM).

En presencia de cantidades similares de ion K^+, los tres ligandos seleccionados muestran una baja capacidad secuestrante. Aunque la misma aumenta con el pH, incluso a pH = 10 ninguno de los inositol fosfatos es capaz de complejar más del 25 % del total de ion metálico. Por comparación entre las curvas obtenidas, la capacidad secuestrante disminuye en el orden Ins(1,2,3)P_3 > Ins(1,3,4,5,6)P_5 > InsP_6. Paradójicamente, aunque el Ins(1,2,3)P_3 se encuentra en iguales condiciones menos cargado que el fitato (a pH = 7,4 las especies predominantes son HL^{5-} y H_2L^{4-} para el Ins(1,2,3)P_3, y H_4L^{8-} y H_5L^{7-} para el InsP_6), interactúa en mucho mayor extensión con el ion K^+. Una explicación posible a este fenómeno reside en la distribución de carga del ligando. Como será discutido en el capítulo siguiente, mientras que el fitato distribuye sus 4 o 5 cargas negativas sobre los grupos ionizables dispuestos sobre todo el anillo de inositol, el Ins(1,2,3)P_3 las localiza hacia un extremo del mismo, disminuyendo de forma significativa el potencial electrostático molecular en la zona entre los grupos P1, P2 y P3 y maximizando la interacción Ins$P$-M^+.

Frente al ion Mg^{2+} el comportamiento químico de los tres ligandos es bastante diferente. En este caso la fracción de metal no complejado varía significativamente con el pH y, además, lo hace de manera particular para cada uno de los Ins$P$ considerados (figura 12.9A). A valores de pH menores a 5, el metal presenta preferencia exclusiva por el InsP_6. De hecho, este miembro es el único capaz de generar especies complejas en un alto grado de protonación, estables en medio ácido. Los dos inositol fosfatos restantes se encuentran en un grado de protonación lo suficientemente alto como para que su capacidad complejante se vea inhibida de forma significativa. Un aumento de pH por encima de 5 provoca la deprotonación del Ins(1,2,3)P_3 e Ins(1,3,4,5,6)P_5, los que forman entonces complejos de estequiometría 1:1, 3:1 y 4:1 predominantes en medio neutro a ácido. A partir de este punto, los tres Ins$P$ se asocian al metal en grado similar, aunque en medio neutro la capacidad secuestrante de los ligandos disminuye según InsP_6 > Ins(1,2,3)P_3 > Ins(1,3,4,5,6)P_5. A pH = 10, por el contrario, la serie anterior se altera, siguiendo el orden de disminución de la carga total del ligando: InsP_6 > Ins(1,3,4,5,6)P_5 > Ins(1,2,3)P_3. Por lo tanto, el fitato surge como el agente secuestrante de magnesio de mayor eficiencia respecto de los ligandos considerados. Esta característica tiene consecuencias a nivel intracelular, en donde como fuera

reportado el InsP_6 se espera asociado completamente a magnesio en condiciones citosólico-nucleares[14,24].

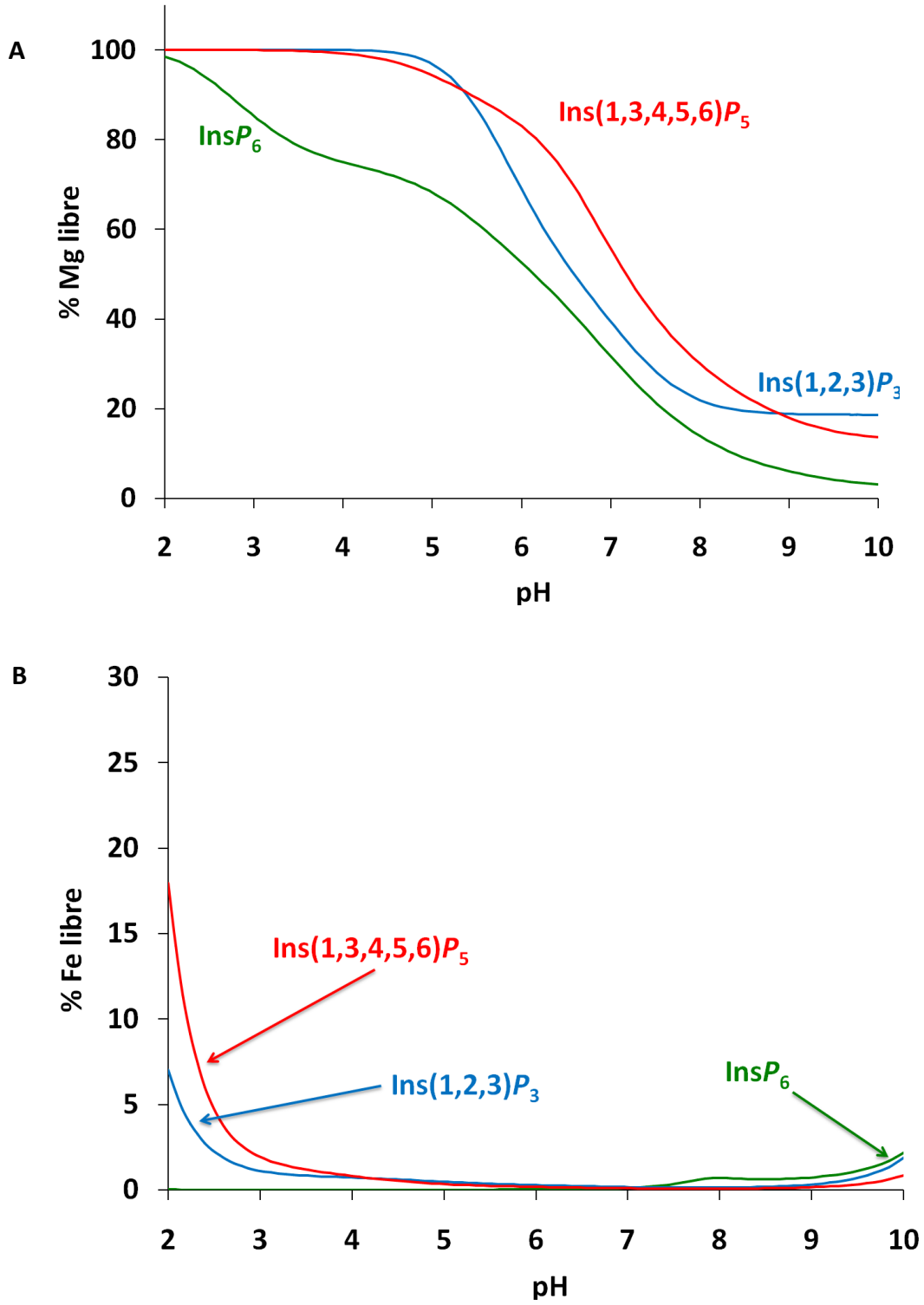


Figura 12.9. Porcentaje de metal libre en función del pH para los sistemas conteniendo Mg^{2+} (A) ó Fe^{3+} (B) en presencia de Ins(1,2,3)P_3, Ins(1,3,4,5,6)P_5 o InsP_6, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = [M] = 1 mM).

En presencia de Fe^{3+}, la figura 12.9B muestra que los tres Ins*P* interaccionan fuertemente con el ion metálico. En general, la capacidad secuestrante es óptima a valores de pH entre 5 y 8. Por encima de pH = 8, el fitato libera una mínima parte del ion metálico por competencia con los procesos de hidrólisis, mientras que a valores de pH menores que 5 la protonación de los ligandos pentakis y trisfosforilados les inhibe levemente de participar en reacciones de formación de complejos.

En este contexto, el Ins(1,2,3)P_3 se establece como un quelante de Fe(III) excepcionalmente eficiente. Este aspecto se evidencia en términos cuantitativos simples en la tabla 12.4, donde se detalla, para el Ins(1,2,3)P_3 y otros agentes complejantes, los valores de pFe para soluciones 10 µM de ligando y metal, a pH = 7,4.

Tabla 12.4. pFe determinado para el Ins(1,2,3)P_3 y otros agentes complejantes [a].

Ligando	pFe	Condiciones	Ref.
Ins(2,4,6)P_3	6,05	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	21
Ins(1,3,5)P_3	6,35	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	
Ins(1,2,6)P_3	7,66	NBu_4Br 0,1 M (25 °C)	19,21
Ins(1,2,3)P_3	11,5	NMe_4Cl 0,15 M (37 °C)	Este trabajo
Ins(1,3,4,5,6)P_5	11,8	NMe_4Cl 0,15 M (37 °C)	
InsP_6	14,9	NMe_4Cl 0,15 M (37 °C)	
EDTA	14,4	$NaClO_4$ 0,1 M (25 °C)	25,26
Citrato	10,4	NaCl 0,15 M (25 °C)	27,28
Calceína	12,3	$NaClO_4$ 0,1 M (25 °C)	29

[a] Soluciones 10 µM de ligando y metal a pH = 7,4. No se consideran en el cálculo los procesos de hidrólisis del metal.

Como se aprecia, el Ins(1,2,3)P_3 exhibe una gran afinidad por el ion Fe^{3+}, comparable incluso con la del Ins(1,3,4,5,6)P_5, el citrato y la calceína. Por encima, se encuentran ligandos altamente cargados como el fitato y agentes secuestrantes de gran afinidad como el EDTA. Según se deriva de los valores de la tabla 12.4, el Ins(1,2,3)P_3 constituye, dentro de los miembros trisfosforilados, el isómero con mayor capacidad quelante de hierro(III). Nuevamente, surge

evidencia de que el patrón de fosforilación 123 es muy adecuado para la complejación del ion Fe^{3+}, brindando al Ins(1,2,3)P_3 una ventaja significativa frente al resto de sus congéneres InsP_3.

A diferencia de lo discutido para el Fe^{3+}, a valores de pH correspondientes al citosol y núcleo celulares (7,4) o a los compartimentos vesiculares ácidos (4,5 - 6,5), la eficiencia con la que el Ins(1,2,3)P_3 secuestra al ion magnesio es sensiblemente menor respecto del fitato (figura 12.9A y B). Por tanto, es factible en este marco que las características químicas particulares del Ins(1,2,3)P_3 (muy alta afinidad por el Fe(III) y moderada por el Mg(II)) hagan posible que el mismo sea adecuado como ligando intracelular "seguro" del *pool* de hierro lábil. Este aspecto será abordado en detalle en el capítulo 14 de esta tesis.

4. Conclusiones

En este capítulo fueron presentados los resultados del estudio termodinámico de la química en solución acuosa del Ins(1,2,3)P_3, en ausencia y en presencia de varios iones metálicos +1, +2 y +3, en un medio no interactuante y en condiciones fisiológicas simuladas de fuerza iónica y temperatura.

Se determinaron las primeras 4 constantes de protonación del Ins(1,2,3)P_3, las que están de acuerdo con valores reportados en KCl 0,2 M a 37 °C para el mismo ligando. A diferencia de sus isómeros trisfosforilados, los valores de constantes de protonación ajustadas del Ins(1,2,3)P_3 exhiben una mínima dependencia con la presencia del ion alcalino. Este fenómeno es originado, probablemente, en que este miembro es capaz de formar especies complejas menos estables y en un mayor grado de protonación que las análogas de otros InsP_3. En ausencia de ion metálico, el orden de los valores de K^{H}_{1} para los distintos isómeros trisfosfato evidencia que el primer protón que ingresa interacciona más fuertemente con aquellos miembros cuyos grupos fosfatos se encuentran situados en carbonos adyacentes.

Se realizó un análisis de la especiación química de los sistemas Ins(1,2,3)P_3-Na^+/K^+. Se detectaron mayoritariamente especies 1:1 del tipo $[M_i(H_jL)]^{(6-i-j)-}$ con *i:j* = (1:0), (1:1) y (1:2), y un complejo neutro polinuclear de fórmula general $[M_2(H_4L)]$. Las constantes de formación resultaron relativamente grandes para

especies metálicas involucrando iones alcalinos, aunque aquellas correspondientes a las especies 1:1 son menores que las reportadas para el Ins(1,2,6)P_3. Para un catión monovalente dado la neutralización de la carga de las especies del ligando por protonación provoca una disminución en la estabilidad de los complejos, por lo que la fuerza del enlace metal-ligando parece estar modulada por la carga de las especies reactivas del ligando. La interacción con ambos cationes alcalinos es muy similar, y los complejos formados son predominantes sólo en exceso de metal. En presencia de concentraciones fisiológicas de Na^+ o K^+ y a pH = 7,4 las especies complejas predominantes son, en ambos casos, $[M(H_2L)]^{3-}$ y $[M(HL)]^{4-}$.

Los resultados de la caracterización de los equilibrios de complejación del Ins(1,2,3)P_3 en presencia de iones M^{2+} muestran que el ligando forma complejos 1:1 de fórmula general $[M(H_jL)]^{(6-2-j)-}$, con j = 1 y 2 para Mg(II), Ca(II) y Cu(II) y j = 1, 2 y 3 para Fe(II). Se logra, asimismo, el ajuste de la formación de complejos neutros polimetálicos del tipo $[M_3L]$ para Mg(II), Ca(II) y Cu(II), y $[M_2(H_2L)]$ para Fe(II). La estabilidad de los complejos 1:1 es significativamente mayor que la determinada para estas especies en los sistemas Ins(1,2,3)P_3-M^+. Además, para un catión divalente dado, la disminución de la carga de las especies reactivas del ligando provoca una disminución en la estabilidad de los complejos. Estos aspectos apoyan la idea de un modelo de enlace en esencia electrostático, cuya fuerza sea modulada por el potencial iónico del catión y la carga de las especies aniónicas del ligando. Por comparación con los resultados reportados para el Ins(1,2,6)P_3, la interacción metal-ligando se intensifica cuando los grupos ionizables se ubican en carbonos adyacentes en un esquema "C1-C2-C6", patrón de coordinación que fue propuesto en capítulos anteriores para los complejos 1:1 del fitato con iones M^{2+}. Las constantes ajustadas de protonación y complejación del Ins(1,2,3)P_3 con iones divalentes permitieron realizar una descripción completa de la especiación química del ligando en presencia de los cationes M^{2+}. En términos generales, el patrón de reactividad química del inositol fosfato está caracterizado por la predominancia de complejos solubles 1:1 en condiciones de exceso de ligando y el dominio de la especie trimetálica neutra $[M_3L]$ en condiciones de exceso de ion metálico.

Se ejecutó, asimismo, el estudio potenciométrico del sistema Fe^{3+}-Ins(1,2,3)P_3. Las estequiometrías determinadas corresponden a complejos 1:1

metal:ligando, de fórmulas $[Fe(HL)]^{2-}$, $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$, cuya predominancia se extiende en todo el rango de pH de estudio. Específicamente a pH cercano al fisiológico, las especies predominantes son $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$. La mayor carga que exhibe el catión metálico provoca un aumento significativo en la fuerza de la interacción metal-ligando y, con ello, una mayor estabilidad y grado de deprotonación del ligando en las especies complejas. Las especies detectadas son más estables que las análogas de otros InsP_3. Esto está de acuerdo con la idea de que el motivo 1,2,3-trisfosfato es particularmente adecuado para una efectiva complejación del ion Fe^{3+}. El enlace metal-ligando presentaría un componente direccional importante, en contraste con la interacción de tipo electrostático entre el Ins(1,2,3)P_3 y los iones alcalinos y alcalinotérreos, la cual resulta sensible, mayoritariamente, a la carga total del catión y ligando.

A partir de la información termodinámica recabada en este trabajo fue posible evaluar la selectividad y la eficiencia relativa del Ins(1,2,3)P_3 como agente secuestrante de iones metálicos. Los resultados del análisis dejan en evidencia la gran diferencia de estabilidad que existe entre las especies complejas de los cationes con distinta carga. Como consecuencia, en concentraciones del orden milimolar, el ligando muestra buena selectividad frente a los diversos iones testeados. Respecto del Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6, la eficiencia secuestrante del Ins(1,2,3)P_3 depende en gran medida del catión considerado. En presencia de cantidades equimolares de ion K^+ e Ins$P$, los tres ligandos muestran una baja capacidad secuestrante y la misma disminuye en el orden Ins(1,2,3)P_3 > Ins(1,3,4,5,6)P_5 > InsP_6. Aunque el Ins(1,2,3)P_3 se encuentra en iguales condiciones menos cargado que el fitato, interactúa en mucho mayor extensión con el ion K^+. Una explicación posible se basa en que, mientras que el fitato extiende sus 4 o 5 cargas negativas a lo largo de todo el anillo de inositol, el Ins(1,2,3)P_3 las localiza hacia un extremo del mismo, maximizando la interacción Ins$P$-M^+. Frente al ion Mg^{2+}, por el contrario, a valores de pH menores a 5 el metal presenta preferencia exclusiva por el InsP_6. Los dos inositol fosfatos restantes se activan frente a la complejación a pH por encima de 5, aunque, de todas formas, el fitato se predice como el agente secuestrante de mayor eficiencia respecto de los ligandos considerados. En presencia de Fe^{3+}, los tres Ins$P$ interaccionan fuertemente con el ion metálico. En general, la capacidad secuestrante es óptima a valores de pH entre 5 y 8.

Una conclusión muy importante derivada de los resultados de este trabajo es que, incluso con una menor carga total, el Ins(1,2,3)P_3 se establece como un quelante de Fe(III) excepcionalmente eficiente. Los valores de pFe muestran que su afinidad por el ion trivalente es comparable incluso con la del Ins(1,3,4,5,6)P_5, el citrato y la calceína. Además, el Ins(1,2,3)P_3 constituye dentro de los miembros trisfosforilados el isómero con mayor capacidad quelante de hierro(III), evidenciando un rol esencial del patrón de fosforilación "123" en la complejación efectiva del ion Fe^{3+}. Dado que a valores de pH correspondientes al citosol, núcleo y otros compartimentos intracelulares, el Ins(1,2,3)P_3 exhibe una muy alta afinidad por el Fe(III) y moderada por el Mg(II), es posible que el mismo sea adecuado como uno de los ligandos intracelulares "seguros" del *pool* de hierro lábil.

5. Referencias bibliográficas

1. Kakhlon, O.; Cabantchik, Z. I. *Free Radical Biology and Medicine* **2002,** *33*, 1037-1046.
2. Petrat, F.; de Groot, H.; Sustmann, R.; Rauen, U. *Biological Chemistry* **2002,** *383*, 489-502.
3. Domaille, D. W.; Que, E. L.; Chang, C. J. *Nature Chemical Biology* **2008,** *4*, 168-175.
4. Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research products;* Molecular Probes Inc.: Eugene, Oregon, 2002.
5. Zhan, H.; Gupta, R. K.; Weaver, J.; Pollack, S. *European Journal of Haematology* **1990,** *44*, 125-131.
6. Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1984,** *259*, 3620-3624.
7. Engelmann, M. D.; Bobier, R. T.; Hiatt, T.; Cheng, I. F. *BioMetals* **2003,** *16*, 519-527.
8. Richter, Y.; Fischer, B. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2006,** *11*, 1063-1074.
9. Vile, G. F.; Winterbourn, C. C.; Sutton, H. C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1987,** *259*, 616-626.
10. Graf, E.; Empson, K. L.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1987,** *262*, 11647-11650.
11. Hawkins, P. T.; Poyner, D. R.; Jackson, T. R.; Letcher, A. J.; Lander, D. A.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1993,** *294*, 929-934.
12. Phillippy, B. Q.; Graf, E. *Free Radical Biology and Medicine* **1997,** *22*, 939-946.
13. Spiers, I. D.; Barker, C. J.; Chung, S. K.; Chang, Y. T.; Freeman, S.; Gardiner, J. M.; Hirst, P. H.; Lambert, P. A.; Michell, R. H.; Poyner, D. R.; Schwalbe, C. H.; Smith, A. W.; Solomons, K. R. H. *Carbohydrate Research* **1996,** *282*, 81-99.
14. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
15. Irvine, R. F. *Journal of Physiology* **2005,** *566*, 295-300.
16. Barker, C. J.; French, P. J.; Moore, A. J.; Nilsson, T.; Berggren, P. O.; Bunce, C. M.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **1995,** *306*, 557-564.
17. Barker, C. J.; Wright, J.; Hughes, P. J.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **2004,** *380*, 465-473.
18. Dozol, H.; Blum-Held, C.; Guedat, P.; Maechling, C.; Lanners, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Molecular Structure* **2002,** *643*, 171-181.
19. Bieth, H.; Jost, P.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990,** *39*, 59-73.
20. Schmitt, L.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1991,** *1075*, 139-140.
21. Mernissi-Arifi, K.; Wehrer, C.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1994,** *55*, 263-277.

22. Bieth, H.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1991,** *41*, 37-44.
23. Mernissi-Arifi, K.; Bieth, H.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1995,** *57*, 127-133.
24. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.
25. Bottari, E.; Anderegg, G. *Helvetica Chimica Acta* **1967,** *50*, 2349-2356.
26. Chinea, E.; Domínguez, S.; Mederos, A. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1995,** *34*, 1579-1587.
27. Kiss, T.; Buglyo, P.; Sanna, D.; Micera, G. *Inorganica Chimica Acta* **1995,** *239*, 145-153.
28. Martin, R. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1986,** *28*, 181-187.
29. Thomas, F.; Serratrice, G.; Beguin, C.; Saint Aman, E.; Pierre, J. L.; Fontecave, M.; Laulhere, J. P. *Journal of Biological Chemistry* **1999,** *274*, 13375-13383.

Capítulo 13

Estudio estructural en solución de los sistemas Ins(1,2,3)P_3-H^+/$M^{+/2+/3+}$

Este capítulo profundiza el estudio de los sistemas Ins(1,2,3)P_3-H^+/M^{n+} comenzado en el capítulo anterior, mediante un análisis espectroscópico (RMN de ^{31}P), voltamperométrico y computacional de las especies formadas en ausencia y en presencia de los iones Na^+, Mg^{2+} y Fe^{3+}. Siguiendo un abordaje estructural y energético del problema, se discuten dos grandes aspectos del comportamiento del Ins(1,2,3)P_3 en solución. Por una parte se evalúa su capacidad de protonación, haciendo especial énfasis en los sitios de unión más probables de los protones y las microespecies derivadas. En segundo término, a partir de la información anterior se revisan los parámetros estructurales más importantes de las especies complejas, principalmente aquellas que predominan en condiciones intracelulares. Puntualizando en datos de interés como probables esquemas de coordinación, geometrías, estados de oxidación, conformación y distribución de carga, se brinda una visión general a nivel molecular de los detalles químico-estructurales asociados a la capacidad quelante intrínseca de este InsP_3.

1. Introducción

Entre los trabajos reportados referentes al estudio de la química de los sistemas conteniendo inositol fosfatos y cationes metálicos, sólo unos pocos abordan directamente el análisis de los diversos aspectos estructurales que caracterizan la interacción metal-ligando. En particular para el Ins(1,2,3)P_3, una molécula cuyas funciones biológicas siguen siendo controversiales, han sido reportados algunos datos sobre sus propiedades ácido-base a nivel microscópico[1], aunque los experimentos fueron conducidos en presencia de una gran cantidad de K^+, el cual interactúa sustancialmente con el ligando. Este fenómeno altera las señales en los espectros de RMN de ^{31}P, y

consecuentemente las macro y microconstantes ajustadas. En detalle, es posible que las especies del tipo $[K_x(H_yL)]^{(6-x-y)-}$ se encuentren "ocultas" bajo estas constantes efectivas, oscureciendo un análisis estructural detallado.

En adición a esto, varios trabajos científicos han establecido que el Ins(1,2,3)P_3 y otros inositol fosfatos fosforilados en las posiciones 123 poseen una capacidad complejante notable hacia el hierro[2-5]. Los resultados derivados de este trabajo de tesis han demostrado que el Ins(1,2,3)P_3 posee tres características básicas para ser considerado un sideróforo intracelular "seguro" de bajo peso molecular. Estas son (i) la capacidad de asociarse completamente con el hierro(III) en condiciones de fuerza iónica y temperatura similares a las fisiológicas, (ii) una afinidad comparativa menor hacia el magnesio en las mismas condiciones, y (iii) la estabilización sustancial del estado de oxidación +3 del hierro, lo cual explica la oxidación espontánea del catión +2 durante los experimentos potenciométricos por encima de pH = 7, en un medio exento de oxígeno. Esta última propiedad es trascendental, ya que permite a esta subfamilia encabezada por el Ins(1,2,3)P_3 la posibilidad de coordinar al hierro(III) de forma "segura", anulando la oscilación entre los estados de oxidación +2 y +3, y por tanto inhibiendo la generación de radicales libres citotóxicos por el ciclo redox de Haber-Weiss [6].

La conformación con la cual el Ins(1,2,3)P_3 coordina al hierro y, en consecuencia, la orientación espacial de los grupos fosfatos, es clave para una complejación metálica no citotóxica. La conformación 1a5e del ligando ha sido reportada al estado sólido en la sal de ciclohexilamonio [7], así como en solución [8]. Por otra parte, utilizando una sonda fluorescente, se ha demostrado que el Ins(1,2,3)P_3 sufre un cambio conformacional en presencia del catión hierro(III) [9,10]. Estos últimos resultados son consistentes con la estructura propuesta anteriormente, en donde el centro metálico hexacoordinado se encuentra unido a dos oxígenos terminales de cada grupo fosfato del ligando, en su conformación 5a1e[11]. No obstante, este modelo fue establecido en base a la creencia de que la inhibición de las reacciones radicalarias catalizadas por el hierro son debidas, exclusivamente, a la ocupación de todas sus posiciones de coordinación por parte del Ins$P$ [6]. Esto último puede no ser estrictamente necesario. En efecto, los resultados experimentales son completamente

compatibles con un modelo que contemple moléculas de agua de coordinación no sustituibles. En suma, aún hoy no se tiene una idea clara de la geometría del o los complejos relevantes a nivel biológico, así como de las características estructurales específicas del entorno de coordinación.

A la luz de lo expuesto, se plantea aquí un estudio estructural y energético en solución acuosa, complementario al potenciométrico desarrollado en el capítulo anterior. El mismo se enfoca en aquellas especies de relevancia biológica, y por tanto las medidas fueron llevadas a cabo en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y temperatura. Se incluyeron en el análisis los cationes K^+, Mg^{2+} y Fe^{3+}, y se utilizó como electrolito soporte una sal no interactuante, la que permitirá analizar por separado las propiedades ácido-base intrínsecas del ligando y su capacidad complejante.

2. Parte experimental

Los sistemas Ins(1,2,3)P_3-H^+/M(I,II,III) fueron analizados a 37,0 °C en NMe_4Cl 0,15 M. Los espectros de RMN de ^{31}P a diferentes valores de pH fueron registrados y tratados de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 4. Se utilizaron concentraciones y relaciones ligando-metal que permitieron obtener buenas relaciones señal/ruido: Ins(1,2,3)P_3-H^+ ([L] = 5,11 mM), Ins(1,2,3)P_3-K^+ ([L] = 5,04 mM, [K] = 500 mM), Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} ([L] = 2,43 y 2,68 mM, [Mg] = 12,1 y 1,48 mM), Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} ([L] = 2,88 mM, [Fe] = 3,16 mM). La asignación de las señales para todos los sistemas se realizó en base a la integración de los picos. Para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) se usaron al momento del ajuste las constantes de hidrólisis determinadas en esta tesis. La especie neutra $Fe(OH)_3$ no se incluyó en el modelo, ya que los resultados que se obtienen considerando su formación no reproducen el comportamiento de los datos experimentales en las condiciones de estudio. Para el sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ se analizaron además los equilibrios de microprotonación a través del uso del método de “expansión de clúster” [12].

El estudio voltamétrico del sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe(II/III) se realizó de acuerdo con las condiciones establecidas en el capítulo 4. Se emplearon soluciones 1 mM en metal y ligando, y la fuerza iónica fue ajustada a 0,15 M utilizando

$NaClO_4$ como electrolito soporte. El pH de las soluciones fue ajustado a 3,0, 5,0, 7,0 y 9,0 mediante el agregado de soluciones de NaOH o H_2SO_4.

Todas las optimizaciones de las geometrías moleculares se realizaron en las condiciones expuestas en el capítulo 4. Para el estudio teórico de la secuencia de protonación del ligando, se realizaron optimizaciones con el método RHF/3-21+G* sobre ambos estados conformacionales de las especies L^{6-}, HL^{5-}, H_2L^{4-}, H_3L^{3-}, H_4L^{2-} y H_6L. Las geometrías iniciales se construyeron a partir de la forma completamente deprotonada, agregando un protón por vez según la información derivada del ajuste de los datos espectroscópicos por RMN de ^{31}P. En base a las estructuras de mínima energía en cada caso, se realizaron cálculos puntuales de energía con los métodos RB3LYP/3-21+G*, IPCM y CPCM.

Para el tratamiento computacional de las especies Ins(1,2,3)P_3-K^+, se construyeron varias geometrías iniciales mediante mecánica molecular (campo de fuerza MM+), utilizando como base las estructuras optimizadas para las especies del ligando, la distribución del potencial electrostático molecular en ellas y la información estructural derivada del análisis espectroscópico por RMN de ^{31}P. Las mismas fueron optimizadas en fase gaseosa con el método RB3LYP/LANL2DZ. Se realizó posteriormente el mismo modelado, considerando dos y tres moléculas de agua de coordinación por cada ion metálico en los complejos 1:1 y 2:1 metal:ligando respectivamente. Este procedimiento se aplicó a ambos estados conformacionales de los cuatro complejos detectados.

En el caso de los complejos con magnesio $[MgL]^{4-}$, $[Mg(HL)]^{3-}$ y $[Mg_3L]$, se optimizaron las geometrías moleculares de ambos estados conformacionales, utilizando el método RB3LYP/6-31+G*. Para el primero, la geometría inicial se construyó de acuerdo con la información derivada del análisis de los espectros de RMN, haciendo uso del método de mecánica molecular (MM+). Se tuvo en cuenta a posteriori el efecto del solvente mediante la aplicación de un modelo discreto de dos moléculas de agua de coordinación. A partir de aquí y por protonación de las geometrías anteriores (según los datos espectroscópicos por RMN), se construyeron los puntos de partida para ambas conformaciones de la especie $[Mg(HL)]^{3-}$. En particular para el complejo polimetálico, se generó mediante mecánica molecular (MM+) un arreglo en donde los tres iones Mg^{2+} fueron ubicados entre pares de grupos fosfato adyacentes, en ambos estados

conformacionales de la especie L^{6-}. Luego del estudio en fase gaseosa (RB3LYP/6-31+G*), se completaron el resto de las posiciones de coordinación con 2 moléculas de agua y se optimizó el sistema en las mismas condiciones.

Los complejos con hierro(III) tenidos en cuenta en el análisis computacional fueron $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$, por ser éstos predominantes en las condiciones de los compartimentos citosólico-nuclear y vesiculares. Se comenzó con diferentes estructuras iniciales MM+ de la especie $[FeL]^{3-}$, construidas de forma de cubrir las diversas posibilidades de coordinación metálica. El efecto del solvente se tuvo en cuenta en este caso mediante un modelo discreto de moléculas de agua, de forma de completar el entorno octaédrico de coordinación del centro metálico (una para el estado 5a1e, y dos y tres para el estado 1a5e). Estas configuraciones fueron exploradas de forma primaria a través del uso del método UB3LYP/LANL2DZ, para un arreglo de alto espín para el hierro. Las geometrías más estables que retienen a la mayoría de los grupos fosfatos coordinados al metal se refinaron, finalmente, mediante el método UB3LYP/6-31+G*. Los datos de entrada para el modelado del complejo $[Fe(OH)L]^{4-}$ fueron generados a partir de la deprotonación de las geometrías más estables de la especie $[FeL]^{3-}$.

3. Resultados y discusión

3.1. Sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+

3.1.1. Análisis de los equilibrios de protonación por RMN de ^{31}P

En la figura 13.1A se muestran los espectros de RMN de ^{31}P del sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+. Se observan dos señales, las que integran en un patrón 2:1, asociadas a los grupos ionizables P1/3 y P2. Con un incremento del pH, las bandas se desplazan hacia campos menores. La complejidad del movimiento de las señales y la ausencia de mesetas claras en las curvas de δ *vs.* pH (figura 13.1B), sugiere la coexistencia de varias especies con un esquema cooperativo de unión H^+-ligando, a través de fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares que provoquen la alteración de ambas señales a la vez.

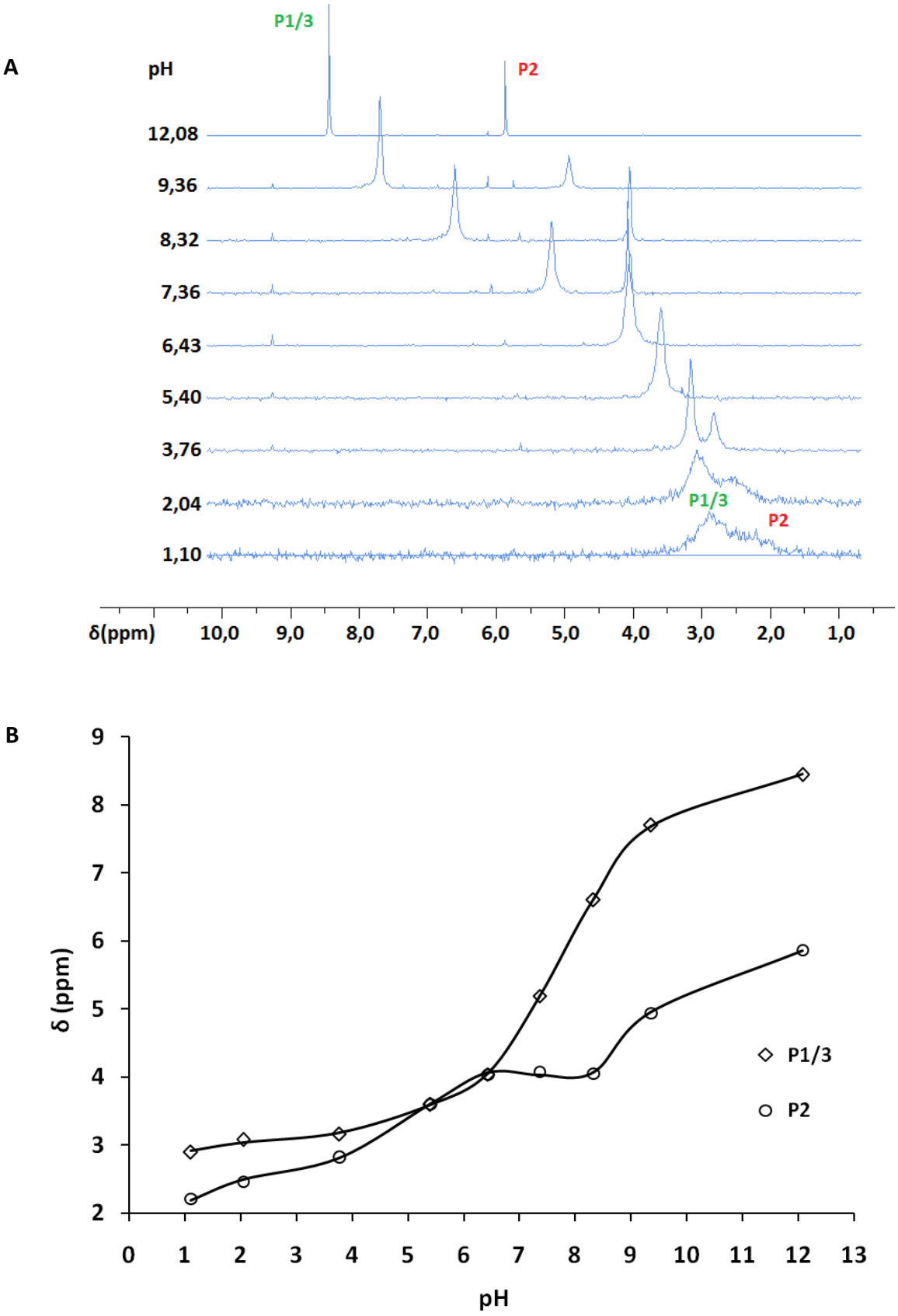


Figura 13.1. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ en función del pH, en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 5,11 mM). (B) Ajuste de los valores de δ *vs.* pH. La curva continua corresponde al modelo teórico.

El Ins(1,2,3)P_3 es un ácido poliprótico que contiene seis protones ionizables, H_6L. Mediante el ajuste del desplazamiento químico de las señales en función del pH es posible la caracterización termodinámica del proceso de protonación del ligando. Las primeras cuatro constantes de protonación del anión L^{6-} pudieron ser determinadas de forma precisa a través de esta estrategia. Las dos restantes permanecen fuera del rango de aplicación de la técnica potenciométrica, por estar asociadas a especies fuertemente ácidas (H_5L^- y H_6L). Los valores obtenidos se detallan en la tabla 13.1, junto con los equilibrios de protonación correspondientes.

Tabla 13.1. Logaritmo de las constantes globales ajustadas para el sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (σ = 0,01).

Equilibrio	log *K*
$L^{6-} + H^+ \leftrightarrow HL^{5-}$	9,27(3)
$L^{6-} + 2\ H^+ \leftrightarrow H_2L^{4-}$	16,71(5)
$L^{6-} + 3\ H^+ \leftrightarrow H_3L^{3-}$	21,94(8)
$L^{6-} + 4\ H^+ \leftrightarrow H_4L^{2-}$	23,8(2)

Aunque no se espera que los valores de log *K* determinados por RMN posean la exactitud de aquellos obtenidos por potenciometría (capítulo 12), ambos conjuntos de constantes son muy similares entre sí. Los datos reportados previamente por Dozol, en KCl 0,2 M a 37 °C, son 9,37(3), 17,05(3) y 22,48(3) para las primeras tres protonaciones de L^{6-} [1]. La influencia de la interacción del ligando con el ion alcalino en exceso explica las diferencias observadas entre este *set* de valores y los especificados en la tabla 13.1, obtenidos en un medio no interactuante a la misma temperatura. La curva de titulación del Ins(1,2,3)P_3 por RMN de ^{31}P se muestra en la figura 13.1B. El conjunto de constantes de protonación de la tabla 13.1 permite un ajuste muy bueno del comportamiento de los datos experimentales, dando cuenta de la bondad del modelo termodinámico propuesto dentro del rango de pH analizado.

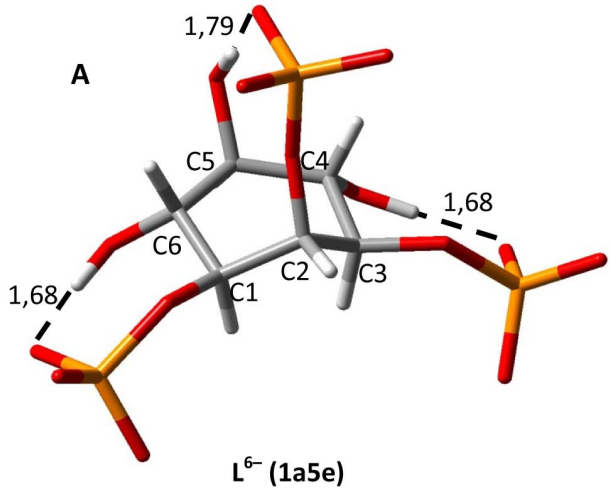
3.1.2. Una mirada en detalle al proceso de protonación del Ins(1,2,3)P_3

Los desplazamientos químicos determinados a partir de los datos experimentales para los átomos de fósforo en cada especie química se listan en la tabla 13.2. Nuevamente se observa aquí que las señales se ven afectadas de forma significativa por la protonación, lo que sugiere una compartición importante de los protones entre los grupos fosfato mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares.

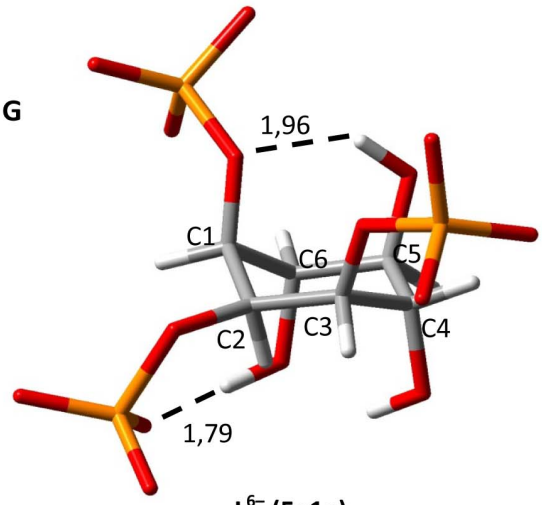
Es posible determinar el orden en el cual los grupos ionizables se protonan, mediante el análisis de los valores de $\Delta\delta_{prot}$ de la tabla 13.2. Partiendo de la suposición de que el patrón de protonación de los microestados más estables que componen cada macroestado es relativamente similar, los valores de $\Delta\delta_{prot}$ brindan datos estructurales genéricos de las diversas formas protonadas del ligando. A partir de esta información fue posible el modelado teórico de las especies presentes en el sistema, el cual aporta datos estructurales complementarios y asiste en la evaluación de los diversos factores geométricos que modulan desde un punto de vista energético la secuencia de protonación. En este sentido, la figura 13.2 detalla los resultados obtenidos en fase gaseosa para ambos estados conformacionales de algunas de las especies relevantes en las condiciones de trabajo.

Tabla 13.2. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ para el sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

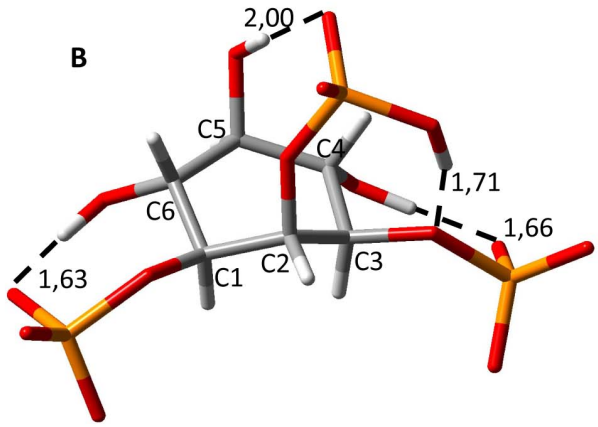
	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			$\Delta\delta_{prot}$ (ppm)	
Especies	P1/3	P2		P1/3	P2
L^{6-}	8,452	5,860		---	---
HL^{5-}	6,777	3,856		-1,676	-2,004
H_2L^{4-}	3,846	4,170		-2,930	0,314
H_3L^{3-}	3,165	2,771		-0,681	-1,399
H_4L^{2-}	2,873	2,104		-0,292	-0,667



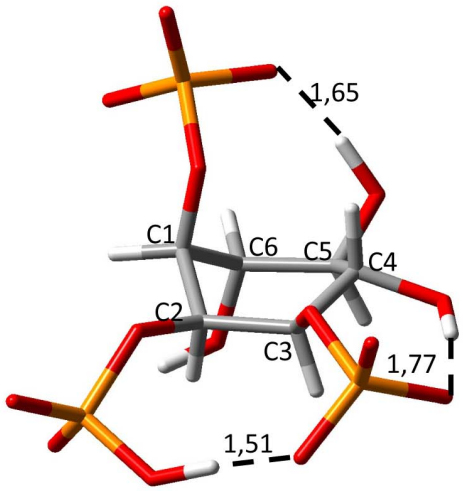
L^{6-} (1a5e)



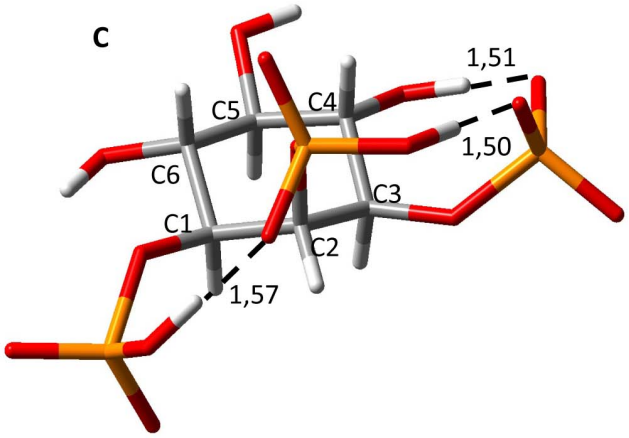
L^{6-} (5a1e)



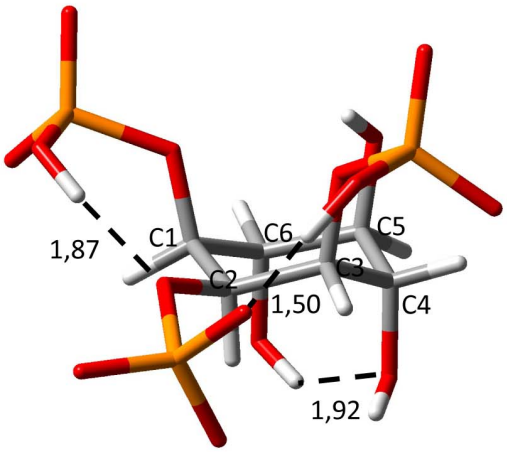
HL^{5-} (1a5e)



HL^{5-} (5a1e)



H_2L^{4-} (1a5e)



H_2L^{4-} (5a1e)

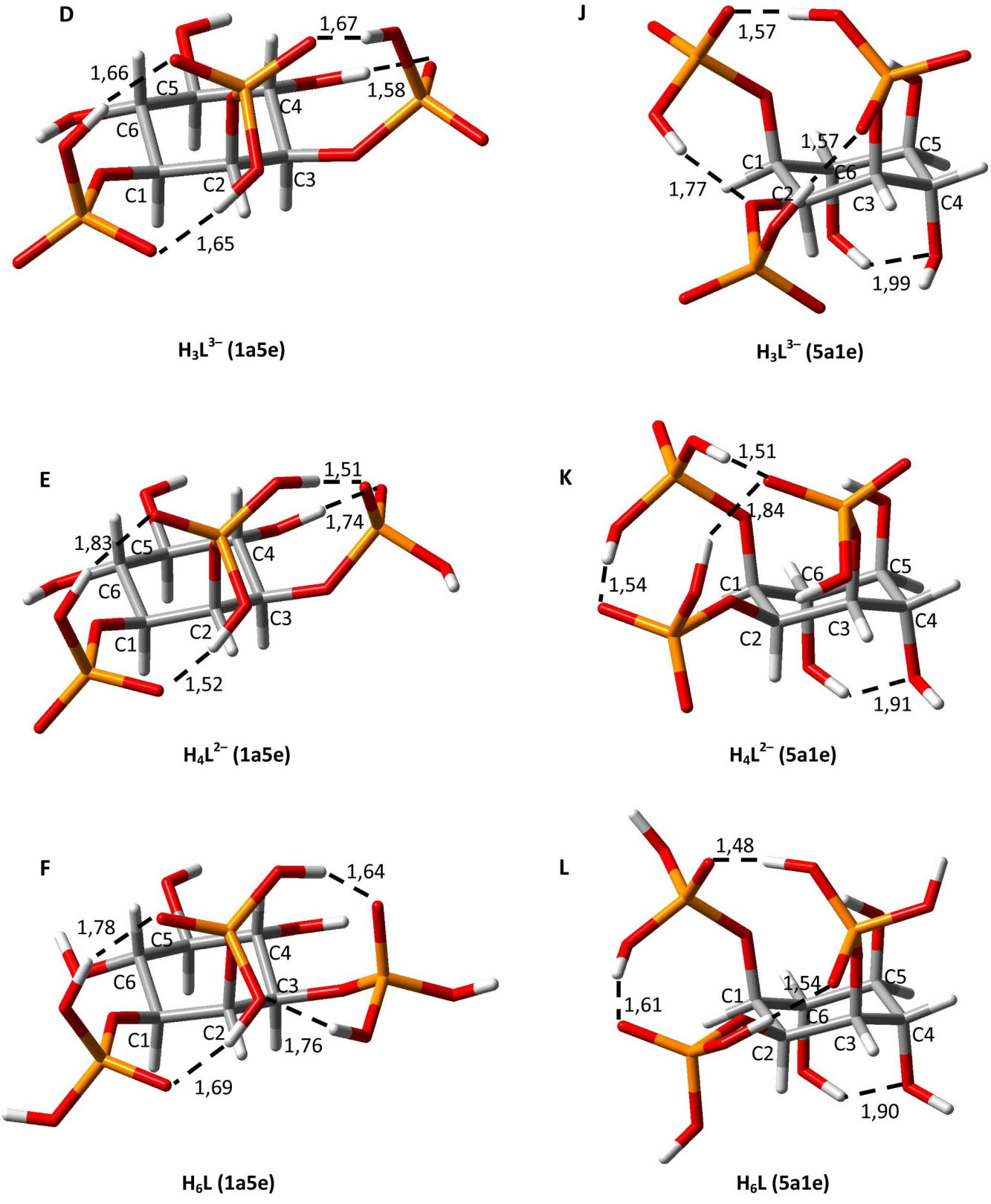


Figura 13.2. Geometrías RHF/3-21+G* optimizadas en fase gaseosa para ambos estados conformacionales de algunas de las especies protonadas del Ins(1,2,3)P_3. L^{6-}(A,G), HL^{5-}(B,H), H_2L^{4-}(C,I), H_3L^{3-}(D,J), H_4L^{2-}(E,K), H_6L(F,L). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas con la distancia correspondiente en Å.

Se ha supuesto que el primer protón se une al fosfato sobre C2, ya que la señal del mismo se ve influida en mayor proporción respecto de la correspondiente a P1/3 (ver figuras 13.2B y H y tabla 13.2). Adicionalmente, la proximidad de los grupos P2 y P1/3 permite la compartición de este protón, explicando la disminución observada en el valor de $\delta_{P1/3}$. El segundo protón causa una reducción considerable en $\delta_{P1/3}$, mientras que δ_{P2} aumenta levemente, indicando que luego de la segunda protonación los H^+ se encuentran de alguna manera más cerca de P1/3, pero compartidos a mayor distancia con P2 (figuras 13.2C e I). La estructura optimizada para H_2L^{4-}, en el estado 1a5e, explica satisfactoriamente esta afirmación. En esta especie, un protón ha migrado desde P1/3 hacia P2, aunque sigue siendo retenido por ambos a través de un enlace covalente y un enlace de hidrógeno bastante fuertes. Es probable que estos rearreglos internos existan en el marco de la dinámica de la solución. En H_3L^{3-}, se espera que los tres protones se unan a cada uno de los tres grupos fosfatos, dando lugar a las geometrías de las figuras 13.2D y J. Esto permite explicar el gran decrecimiento en el desplazamiento químico de P2 desde H_2L^{4-} a H_3L^{3-}. Finalmente, el cuarto protón parece estar predominantemente asociado al fosfato en la posición 2, aunque sigue siendo compartido con el resto de los grupos por enlaces de hidrógeno. En consecuencia, se obtienen estructuras como las que se detallan en las figuras 13.2E y K. Al igual que lo que ocurrió para el estado ecuatorial de la especie H_2L^{4-}, en el estado axial de H_4L^{2-} la estructura modelada se ajusta satisfactoriamente a lo que indican los datos experimentales. Nuevamente aquí ocurre un mínimo desplazamiento de un protón entre un par de grupos fosfatos muy cercanos entre sí en el espacio.

Al margen de los resultados de este análisis, basado en la inspección de los valores de la tabla 13.2, es posible enfocar el problema desde un punto de vista esencialmente cuantitativo, a través de la evaluación de los datos experimentales por el método de expansión de clúster [12]. Dado que el único requerimiento es que cada sitio ionizable una un solo protón, se analizaron los espectros de RMN por encima de pH = 3,7, de forma de tomar en cuenta la formación de las especies L^{6-}, HL^{5-}, H_2L^{4-} y H_3L^{3-}. La aplicación específica a este sistema, así como los resultados derivados, se discuten en detalle en el Anexo A.

Confirmando lo discutido hasta el momento, el esquema de microprotonación obtenido (figura 13.3) así como las constantes de microprotonación ajustadas (tabla 13.3) concuerdan con el análisis previo de la secuencia de protonación detallado en la figura 13.2. Partiendo del Ins(1,2,3)P_3 totalmente deprotonado, el fosfato en posición 2 posee un valor de log *k* mayor que los fosfatos en 1 y 3 (tabla 13.2). Esto hace que la protonación del mismo sea preferencial frente a los fosfatos adyacentes. No obstante, debido a que la protonación de los grupos ionizables en 1 y 3 es la misma por simetría, y cuentan ambos como un único microestado, las probabilidades calculadas marcan que prácticamente la mitad del ligando está protonado en posición 1/3 (figura 13.3). Como se advierte en la figura 13.2B y H, el hidrógeno en P2 se comparte en gran extensión vía enlace de hidrógeno con el fosfato en C1 ó C3, haciendo que ambos microestados (2 y 1/3) estén estructuralmente relacionados y posean una probabilidad similar de ocurrencia.

Tabla 13.3. Logaritmos de las microconstantes de protonación (*k*) para el Ins(1,2,3)P_3 a 37,0 °C. El subíndice *i* representa el sitio que se protona mientras que *p* denota los sitios ya protonados.

Constantes de microprotonación en NMe_4Cl 0,15 M[a]					
i	log k_i	*pi*	log k_{pi}	*ppi*	log k_{ppi}
1/3	8,78	12/32	7,28	123/321	5,91
2	9,05	13/31	7,68	132	5,51
		21/23	7,01		
Constantes de microprotonación en KCl 0,2 M[b]					
i	log k_i	*pi*	log k_{pi}	*ppi*	log k_{ppi}
1/3	8,67	12/32	7,78	123/321	6,04
2	9,16	13/31	8,09	132	5,73
		21/23	7,30		

[a] Datos de este trabajo. [b] Datos reportados por Dozol *et al* [1].

Al agregarse un nuevo protón, la posición 1 ó 3 en el microestado 1/3 posee el valor de log *k* más alto, por lo que la microespecie con n = 2 más importante es la 13. Esto ocurre incluso aunque el microestado con n = 2, 12, correspondería en realidad a la suma de dos microestados simétricamente iguales (12 y 23). Esta distribución, donde el microestado 13 es apenas mayoritario, es lógica desde el punto de vista del reparto equitativo de los protones en el espacio, de forma de aliviar eficientemente la gran repulsión de los grupos fosfato adyacentes. De todas formas, a efectos prácticos, ambos microestados se encuentran presentes en proporción apreciable.

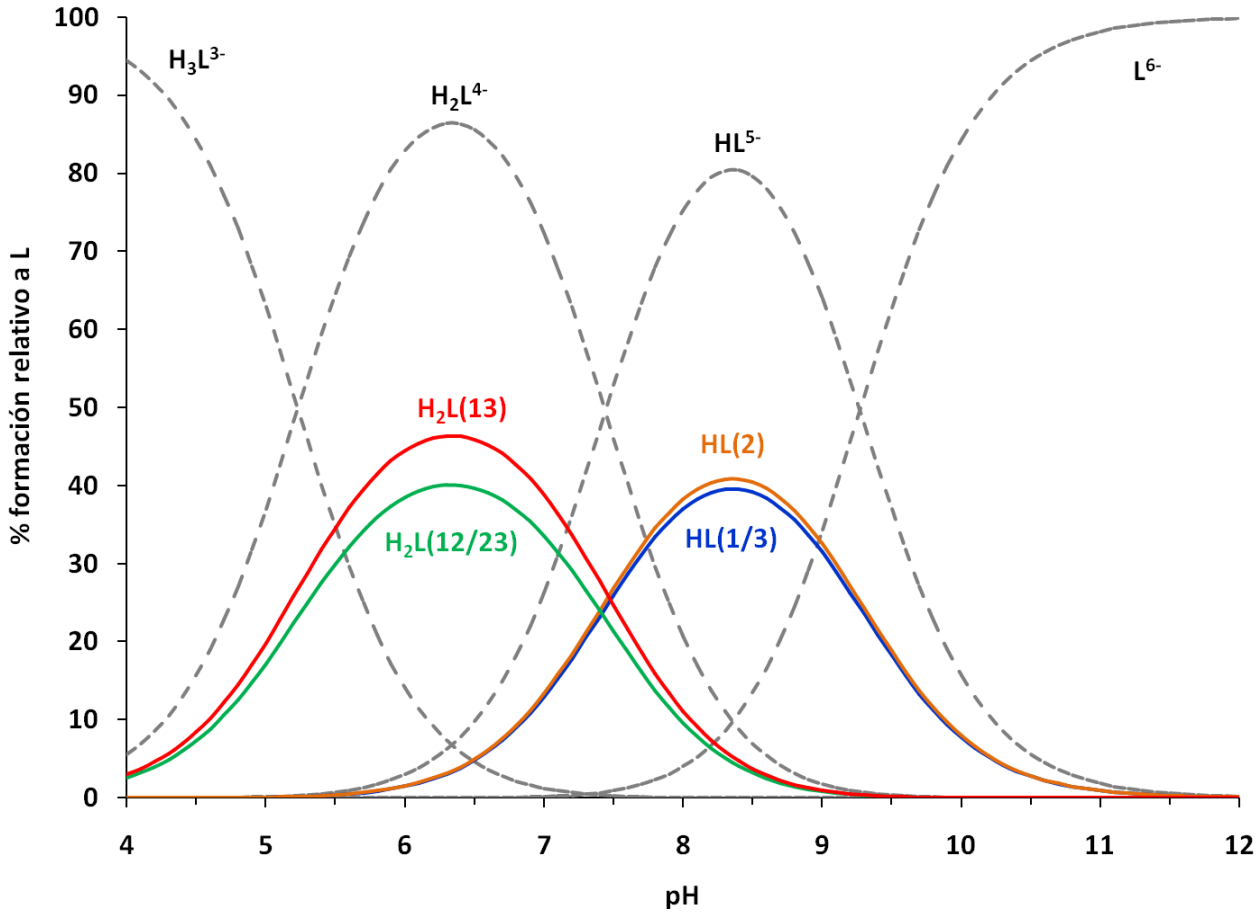


Figura 13.3. Diagrama de distribución de macro y microespecies del sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Se omiten las cargas de las microespecies por claridad.

Todo el análisis teórico-experimental anterior converge a un punto importante: la cooperación existente en el mecanismo de protonación del ligando. Esto ocurre por la formación de fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares,

fenómeno que es consistente con el hecho, discutido en el capítulo anterior, de que el Ins(1,2,3)P_3 posea constantes de protonación más altas que la mayoría de sus isómeros trisfosfato.

Las constantes de microprotonación reportadas por Dozol y su grupo [1], las que se adjuntan a la tabla 13.3 a efectos de comparación, se encuentran en el entorno de las obtenidas en este trabajo de tesis. Sin embargo, algunas diferencias moderadas entre ellas encuentran origen en la formación, en condiciones de exceso de ion alcalino, de especies $[K_x(H_yL)]^{(6-x-y)-}$, las que se "incluyen" dentro de las microespecies caracterizadas por las microconstantes aparentes determinadas en ese reporte.

3.1.3. Preferencias conformacionales *vs.* determinantes estructurales

Como último punto dentro del estudio detallado del sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+, se analizan los factores estructurales que modulan la estabilidad de ambas conformaciones de las especies del ligando en solución. En la figura 13.4 se muestra la diferencia energética entre ambos estados conformacionales (ΔE = E(5a1e) – E(1a5e)) para las estructuras optimizadas de la figura 13.2.

En fase gaseosa (barra fucsia), al nivel 3-21+G* la conformación preferida desde el punto de vista energético es la 1a5e para las especies L^{6-}, HL^{5-}, H_2L^{4-}, H_3L^{3-} y H_4L^{2-}. Esto está en línea con la evidencia experimental existente para los inositol fosfatos de bajo grado de fosforilación[8]. El valor de ΔE disminuye gradualmente a medida que el ligando se protona. En consecuencia, se predice un posible cambio conformacional operativo a valores de pH muy bajos, donde predomina la especie completamente protonada del ligando H_6L. Este fenómeno no es detectado dadas las condiciones experimentales de trabajo.

Dado que la mayoría de las formas del ligando consideradas en el análisis poseen alta carga negativa, se realizaron cálculos DFT simples sobre las geometrías anteriores, de manera de estimar el efecto de la correlación electrónica en las energías computadas. Los resultados, también incluidos en la figura 13.4 (barra azul), son bastante similares a aquellos obtenidos por el método Hartree-Fock, y sólo se observan pequeñas diferencias en aquellos casos donde la carga negativa es importante.

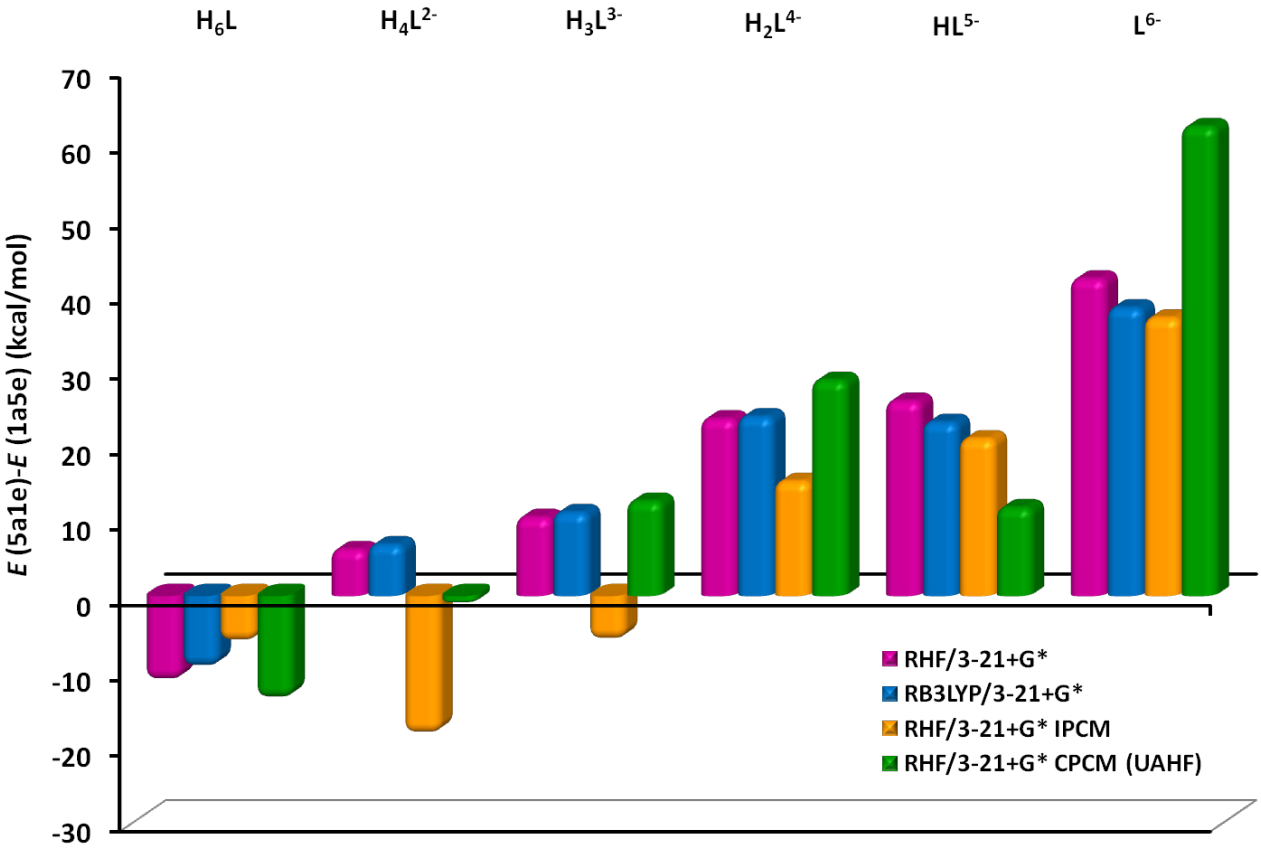


Figura 13.4. Diferencia de energía entre las geometrías optimizadas en fase gaseosa de ambos estados conformacionales para algunas de las especies protonadas del Ins(1,2,3)P_3. Se muestran además los valores obtenidos para el mismo indicador utilizando otros métodos, mediante cálculos puntuales de energía sobre estas geometrías.

Una revisión pormenorizada de todas las geometrías de la figura 13.2 permite racionalizar el origen de la variación de ΔE, a través de la identificación de los factores estructurales más relevantes que influyen en el proceso de protonación. Las geometrías más estables parecen estar determinadas por dos efectos contrapuestos, cuya predominancia es dependiente del grado de protonación de la especie.

i. *Repulsión electrostática y estérica*

Los grupos fosfato altamente cargados tienden a apartarse entre sí, debido a la enorme repulsión electrostática y estérica que sufren. Este fenómeno es

importante en las especies más cargadas, L^{6-}, HL^{5-} y H_2L^{4-} (figuras 13.2A a C y 13.2G a I), y provoca la deformación de las estructuras moleculares por separación de los grupos ionizables. En la tabla 13.4 se resumen algunos parámetros estructurales de las especies de la figura 13.2. Como se advierte al examinar los valores de separación media de los átomos de fósforo, $X_{P\text{-}P}$, la conformación 5a1e fuerza a los fosfatos a colocarse más cerca entre sí respecto de la disposición 1a5e. Es interesante el hecho de que este fenómeno ocurría a la inversa en caso del InsP_6 y el Ins(1,3,4,5,6)P_5. El menor grado de fosforilación y la disposición 1-2-3 ecuatorial-axial-ecuatorial de los grupos fosfatos, hacen que el Ins(1,2,3)P_3 carezca de la repulsión ecuatorial-ecuatorial característica de la conformación 1a5e para los inositol fosfatos más fosforilados. Este es, de hecho, el fundamento químico-estructural que da soporte a la diferencia en el estado conformacional adoptado entre los miembros más y menos fosforilados de esta familia.

Tabla 13.4. Parámetros estructurales de algunas de las especies del sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+ (geometrías RHF/3-21+G*).

Especies	Enlaces de hidrógeno intramoleculares				Distancia P-P	
	$X_{O\text{-}H}$ [a]		X(5a1e)-X(1a5e)		$X_{P\text{-}P}$ [b]	
	(1a5e)	(5a1e)			(1a5e)	(5a1e)
L^{6-}	1,72	1,88	0,16		6,54	6,30
HL^{5-}	1,75	1,64	-0,11		6,32	5,96
H_2L^{4-}	1,53	1,76	0,23		5,53	5,28
H_3L^{3-}	1,64	1,73	0,09		5,17	4,74
H_4L^{2-}	1,65	1,70	0,05		5,04	4,30
H_6L	1,72	1,63	-0,09		4,51	4,15

[a] $X_{O\text{-}H}$ representa la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en Å. [b] $X_{P\text{-}P}$ corresponde a la distancia promedio, en Å, entre los átomos de fósforo de los grupos fosfato.

En los estadíos tempranos del proceso de protonación, cuando el ligando se encuentra prácticamente deprotonado, la configuración 1a5e es más adecuada para acomodar los grupos $-OPO_3^{n-}$, aniónicos y voluminosos.

ii. *Enlaces de hidrógeno con grupos OH*

Los grupos fosfato tienden a formar en el Ins(1,2,3)P_3 enlaces de hidrógeno de corta distancia con los grupos OH de los carbonos 4 y 6 (aprox. 1,6 Å). Estas interacciones son realmente importantes al momento de determinar la geometría en cada caso. Las especies para las cuales este efecto es evidente, según la figura 13.2, son L^{6-}, HL^{5-} y (parcialmente) H_2L^{4-}. Asimismo, un enlace de hidrógeno a mayor distancia es establecido entre el OH en C5 y los grupos fosfato P1/3 ó P2. Éste produce una distorsión no menor en el confórmero 1a5e de L^{6-} y HL^{5-}, dando lugar a una conformación del anillo carbonado que se acerca a la de "bote". En apoyo nuevamente a la estabilidad de este estado conformacional, este fenómeno podría ser la causa del pequeño cambio en el desplazamiento químico de la señal de H5 que se registra en los espectros de RMN de ^{1}H en el rango de pH 7 - 8 [1], donde la especie HL^{5-} es la forma predominante del ligando. En efecto, si se hace una comparación general de las figuras 13.2A a C y 13.2G a I, desde un punto de vista estructural el estado 1a5e parece tener las características espaciales adecuadas para el establecimiento de fuertes enlaces de hidrógeno OH-grupos fosfato, convirtiéndose en la configuración preferida para las especies del Ins(1,2,3)P_3 de bajo grado de protonación.

En la tabla 13.4 se resumen las distancias promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares ($X_{O\text{-}H}$) para las especies de la figura 13.2. Al principio del proceso de protonación, $X_{O\text{-}H}$ y su diferencia para ambas conformaciones (X(5a1e)-X(1a5e)) varían de forma errática, probablemente por la influencia conjunta y compleja de los dos factores antedichos. Esto logra visualizarse en la estructura optimizada para la especie HL^{5-} en el estado 5a1e, donde el anillo carbonado se distorsiona significativamente para poder optimizar los enlaces de hidrógeno intramoleculares y minimizar al mismo tiempo la repulsión electrostática y estérica que genera el esquema axial-ecuatorial-axial (figura 13.2H). No obstante, a partir de H_2L^{4-} los valores de $X_{O\text{-}H}$ varían de forma continua, decreciendo para la conformación 5a1e y aumentando para la 1a5e a medida que el ligando es protonado. Como se expuso anteriormente, el estado 5a1e obliga a los grupos $-OPO_3^{n-}$ a estar más cerca entre sí, por lo que forma enlaces de hidrógeno interfosfato más fuertes.

Por el contrario, la disposición 1a5e separa los grupos ionizables a tal punto que, por encima de dos protones, el ligando no logra minimizar la distancia promedio de interacción fosfato-fosfato por enlaces de hidrógeno. Esto evidencia el hecho, ya revisado en este trabajo para el InsP_6 e Ins(1,3,4,5,6)P_5, de que por encima de cierto grado de protonación el ligando da prioridad a la optimización de los enlaces de hidrógeno intramoleculares y, por tanto, a aquellos estados conformacionales que permitan un contacto de los grupos fosfato a través del espacio. Este fenómeno provoca un acercamiento progresivo de las energías en fase gaseosa de ambas conformaciones a medida que aumenta el grado de protonación, por lo que se predice un equilibrio conformacional para las formas más protonadas del ligando (H_5L^- y H_6L).

Como expansión del análisis en fase gaseosa, se estudiaron las energías moleculares de ambos confórmeros de las geometrías anteriores en un medio dieléctrico que simula el solvente agua, a través del uso de métodos SCRF. Así como se aclaró oportunamente para los otros sistemas analizados en este trabajo, se ha considerado que las geometrías en fase gaseosa son representaciones adecuadas de aquellas encontradas en el seno de la solución, y que el efecto de relajación estructural se ve parcialmente cancelado al realizar la sustracción en los valores de ΔE. En la figura 13.4 se muestran los resultados para los dos métodos aplicados, CPCM (barra verde) e IPCM (barra naranja). Los valores de ΔE en solución siguen la misma tendencia de aquellos en fase gaseosa para las especies L^{6-}, HL^{5-}, H_2L^{4-} y H_6L. En los casos restantes, H_3L^{3-} y H_4L^{2-}, los resultados teóricos son ambiguos, con una dependencia importante en el método de cálculo empleado. Dadas las magnitudes relativas de los resultados de ambos métodos y las aproximaciones realizadas, es posible que en solución comience a operar un cambio conformacional del ligando para especies más protonadas que H_3L^{3-}.

Como conclusión, desde un punto de vista energético-estructural, el estado 1a5e es el más estable para la mayoría de las especies del Ins(1,2,3)P_3. Sin embargo, a pH muy bajos, por debajo del rango de estudio del presente trabajo, se predice la generación de una mezcla de ambos estados conformacionales, involucrando formas altamente protonadas del ligando.

3.2. Sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+

3.2.1. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

En la figura 13.5A se muestran los espectros de RMN de ^{31}P en presencia de exceso de catión potasio. A partir del análisis termodinámico de la especiación química de este sistema (capítulo 12), se eligieron los valores de pH para la adquisición de los datos experimentales, a través del establecimiento de condiciones que permitieron la predominancia de cada una de las especies complejas. La resolución que muestran las señales es muy buena, por lo que la asignación de las mismas fue realizada por simple inspección y comparación con las del ligando.

De la misma forma que ocurría en ausencia de metal, se observa en todos los casos el mismo patrón de dos señales, por lo que la coordinación del metal no afecta las características de simetría del ligando. En la figura 13.5B se muestran en conjunto los desplazamientos químicos de las señales en presencia y ausencia de potasio. En casi todo el rango de pH ensayado, la unión del ion alcalino a los grupos fosfato provoca el desplazamiento de las señales hacia campos menores. Dado que los tres grupos fosfato se ven influenciados por la complejación metálica, es probable que opere un esquema cooperativo de coordinación, donde varios grupos ionizables aporten a la unión del o los iones K^+. Como ocurría para el resto de los inositol fosfatos considerados, este efecto es distinto para cada señal, por lo que los dos conjuntos de fosfatos se asociarán de manera específica y disímil al metal.

El ajuste de los datos espectroscópicos por RMN da los resultados resumidos en la tabla 13.5. Las estequiometrías y las constantes de estabilidad correspondientes son muy similares a las obtenidas a partir de los datos potenciométricos. Adicionalmente, como se desprende de la figura 13.6, el modelo propuesto coincide con el comportamiento de las señales con el pH, lo que se refleja en el bajo valor obtenido para el parámetro σ. En la figura 13.7 se muestra el diagrama de distribución de especies en condiciones de exceso de ion metálico. La mayoría de los complejos detectados poseen estequiometrías del tipo 1:1, con la excepción de la especie dinuclear $[K_2(H_4L)]$, formada por debajo de pH = 4.

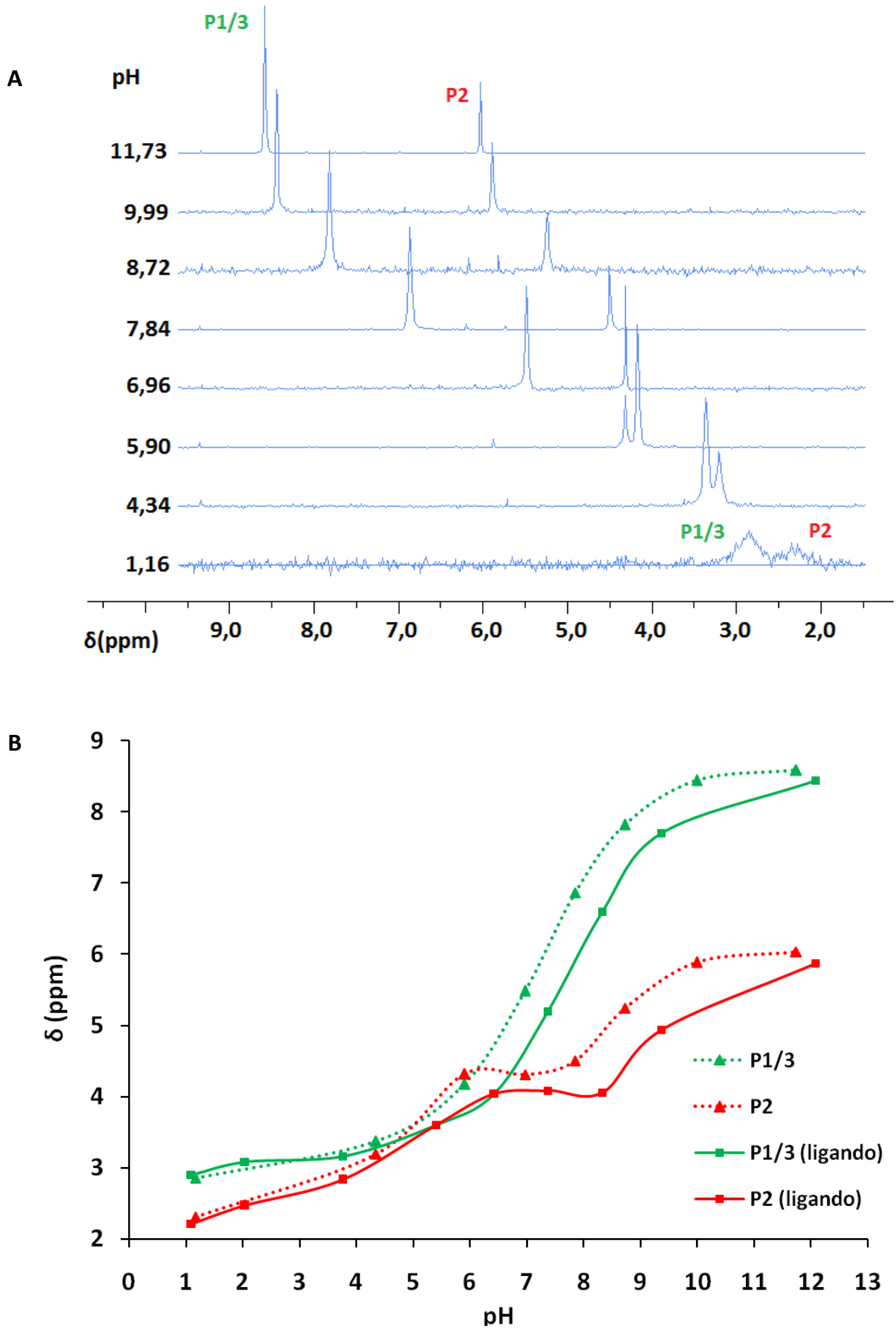


Figura 13.5. (A) Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ en función del pH, a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M ([L] = 5,04 mM, [K^+] = 500 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH en ausencia (líneas continuas) y presencia de K^+ (líneas discontinuas).

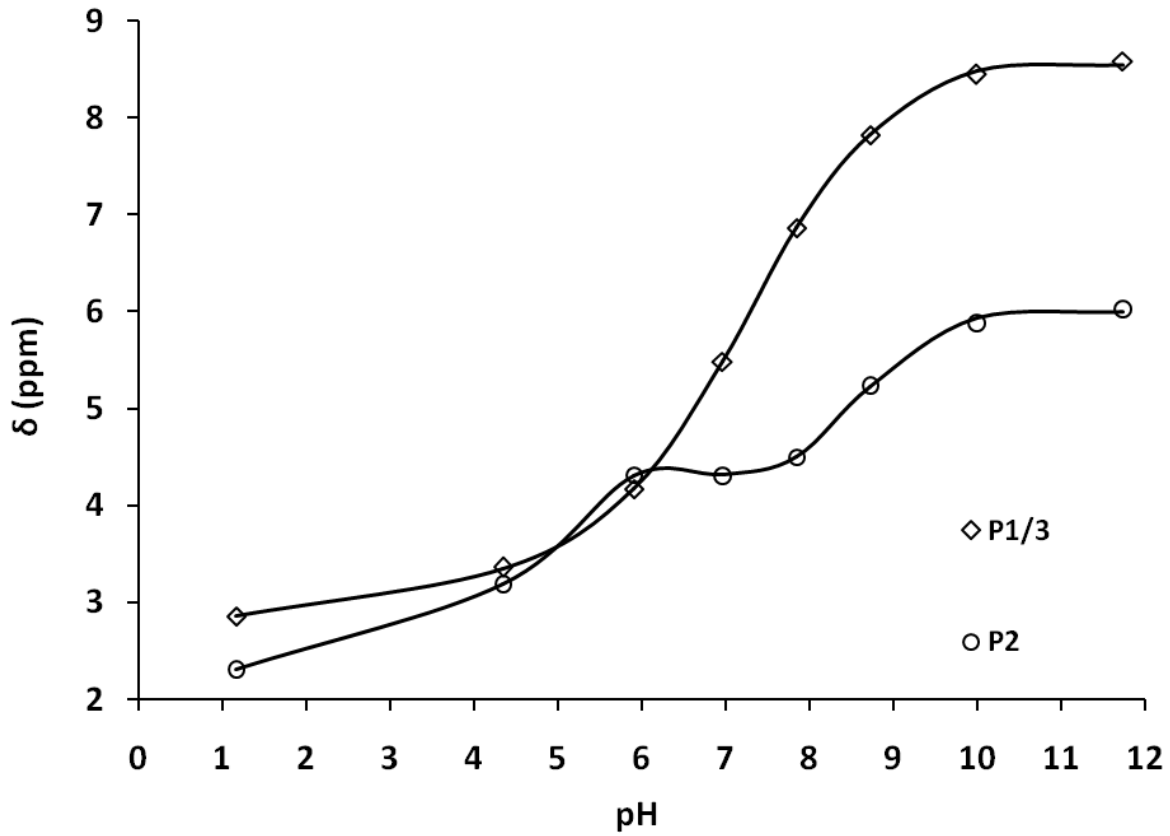


Figura 13.6. Ajuste de los datos experimentales de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M. La curva continua corresponde al modelo teórico ajustado.

Las constantes de equilibrio ajustadas no son demasiado grandes en términos absolutos, aunque son altas para complejos derivados de un ion alcalino. Por esta razón, las especies K^+-Ins(1,2,3)P_3 son significativas a la hora del análisis del comportamiento químico de este Ins*P* en compartimentos intracelulares, donde la concentración de K^+ es extremadamente alta.

Tabla 13.5. Logaritmo de las constantes de formación ajustadas para el sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

Equilibrio	log *K*	σ
$K^+ + L^{6-} \leftrightarrow [KL]^{5-}$	2,5(7)	0,03
$K^+ + HL^{5-} \leftrightarrow [K(HL)]^{4-}$	1,8(7)	
$K^+ + H_2L^{4-} \leftrightarrow [K(H_2L)]^{3-}$	1,3(8)	
$2\ K^+ + H_4L^{4-} \leftrightarrow [K_2(H_4L)]$	3,2(9)	

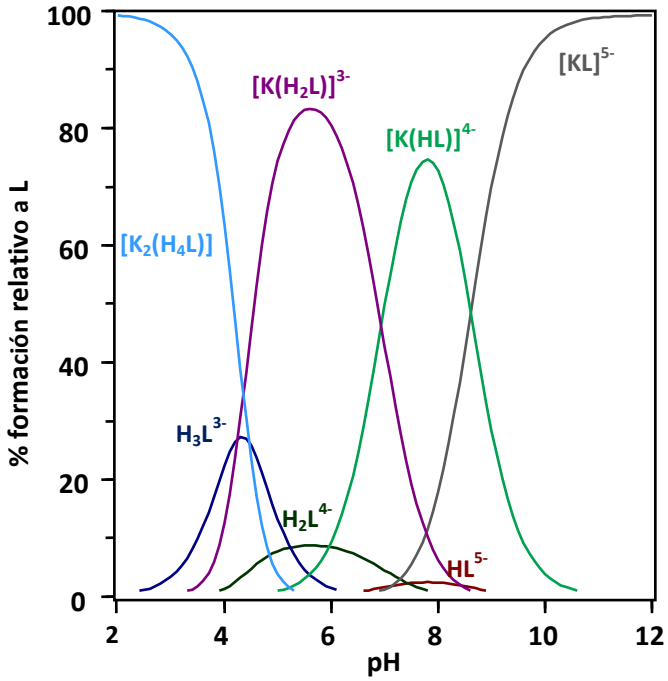


Figura 13.7. Diagrama de distribución de especies para el sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 5,04 mM, [K^+] = 500 mM).

3.2.2. Caracterización estructural del sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ por RMN

En la tabla 13.6 se listan los desplazamientos químicos individuales de los átomos de fósforo de cada especie que reproducen el comportamiento observado de las señales con el pH. Para asistir al análisis subsiguiente se muestra, asimismo, la variación de estos δ individuales con los procesos sucesivos de protonación ($\Delta\delta_{prot}$) y complejación a partir de la especie del ligando en el mismo estado de protonación ($\Delta\delta_{compl}$). En términos generales, se observan dos tendencias. Por una parte, a medida que el pH disminuye el desplazamiento químico de las señales se reduce, haciendo que los $\Delta\delta_{prot}$ sean en su mayoría negativos. En efecto, con un desplazamiento de derecha a izquierda en el diagrama de la figura 13.7, los complejos poseen cada vez mayor grado de protonación y por tanto, como se discutió para el ligando, las señales verán aumentado el campo. En segundo lugar, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ son casi todos mayores a cero. De la misma manera que se estableció para los otros sistemas Ins*P*-ion alcalino, este fenómeno se interpreta en base a un desblindaje de los átomos de P por polarización de la carga negativa de los grupos fosfato.

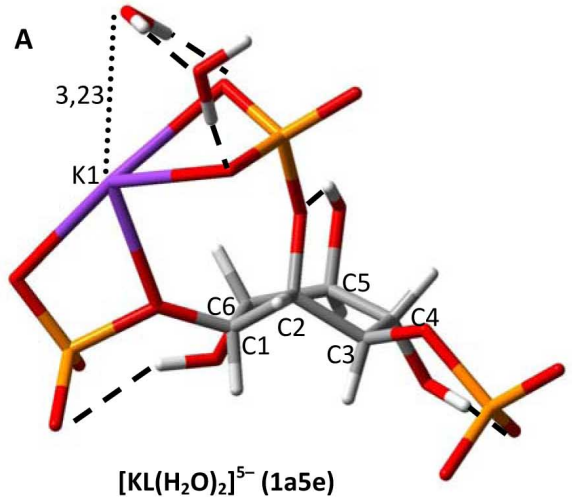
Tabla 13.6. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ para el sistema Ins(1,2,3)P_3-K^+ a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			$\Delta\delta_{prot}$(ppm)			$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)	
Especies	P1/3	P2		P1/3	P2		P1/3	P2
$[KL]^{5-}$	8,550	6,001		---	---		0,098	0,141
$[K(HL)]^{4-}$	6,977	4,282		-1,573	-1,719		0,201	0,426
$[K(H_2L)]^{3-}$	3,966	4,361		-3,011	0,079		0,120	0,191
$[K_2(H_4L)]$	2,860	2,312		-1,106	-2,049		-0,013	0,208

Una inspección de los valores de $\Delta\delta_{compl}$ evidencia el hecho de que el fosfato en C2 parece estar más involucrado en el enlace al metal que P1 y P3. Más aún, de acuerdo con la magnitud de $\Delta\delta_{prot}$ para el complejo $[K(HL)]^{4-}$, el protón estaría unido también mayoritariamente a P2, aunque se compartiría de forma sustancial con P1/3. En $[K(H_2L)]^{3-}$, la segunda protonación operaría sobre P1/3, según el bajo valor del $\Delta\delta_{prot}$ correspondiente. Finalmente, la formación del complejo neutro $[K_2(H_4L)]$, estaría mediada por la unión de dos protones adicionales, los cuales probablemente provocan un rearreglo estructural que permite que todas las señales se vean afectadas. Dado que los desplazamientos químicos individuales de este complejo y los de la especie del ligando respectiva, H_4L^{2-}, son muy similares, es posible proponer que ambos tienen un esquema de microprotonación análogo.

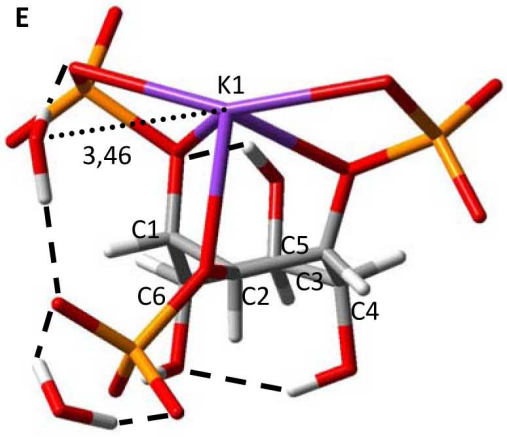
A partir de la información antes analizada se realizó el modelado molecular en fase gaseosa de ambos estados conformacionales para los cuatro complejos Ins(1,2,3)P_3-K^+. Con el objetivo de tomar en cuenta los posibles efectos del solvente, este procedimiento se repitió considerando dos moléculas de agua de coordinación por cada ion metálico en las especies 1:1. Para el complejo dinuclear se aplicó un modelo discreto de tres moléculas de agua por cada uno de los dos cationes K^+. Los resultados de estos últimos cálculos se detallan en la figura 13.8.

A



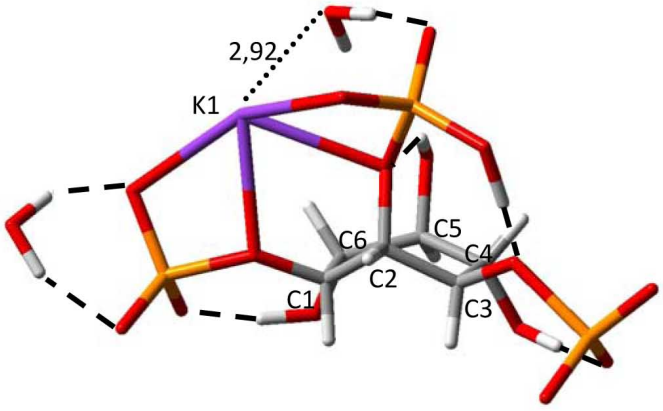
$[KL(H_2O)_2]^{5-}$ (1a5e)

E



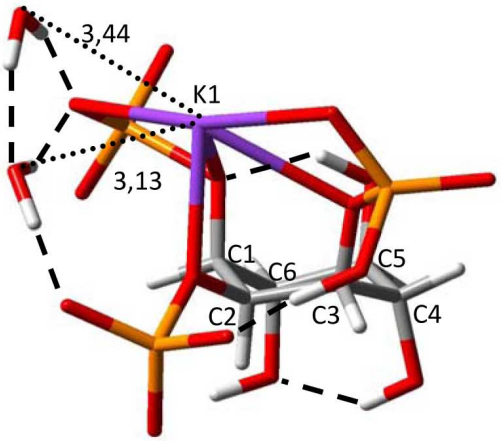
$[KL(H_2O)_2]^{5-}$ (5a1e)

B



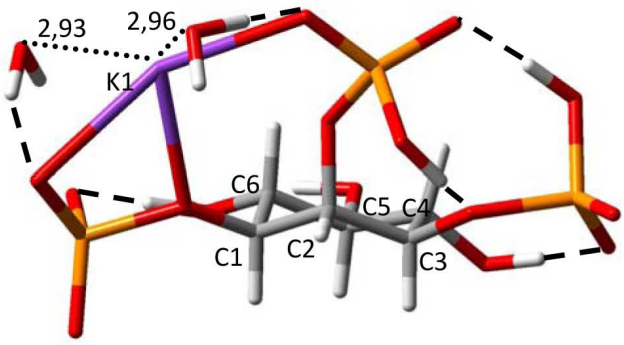
$[KHL(H_2O)_2]^{4-}$ (1a5e)

F



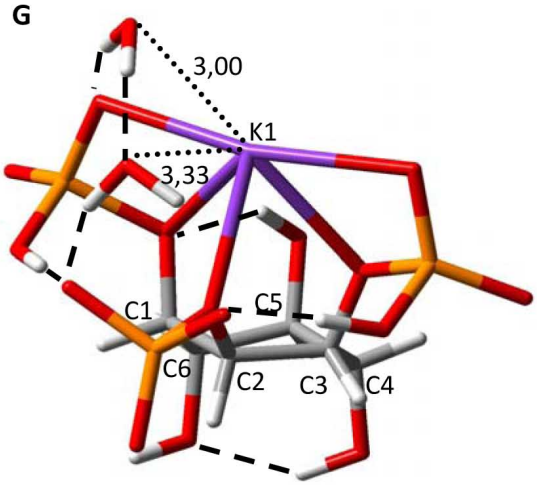
$[KHL(H_2O)_2]^{4-}$ (5a1e)

C

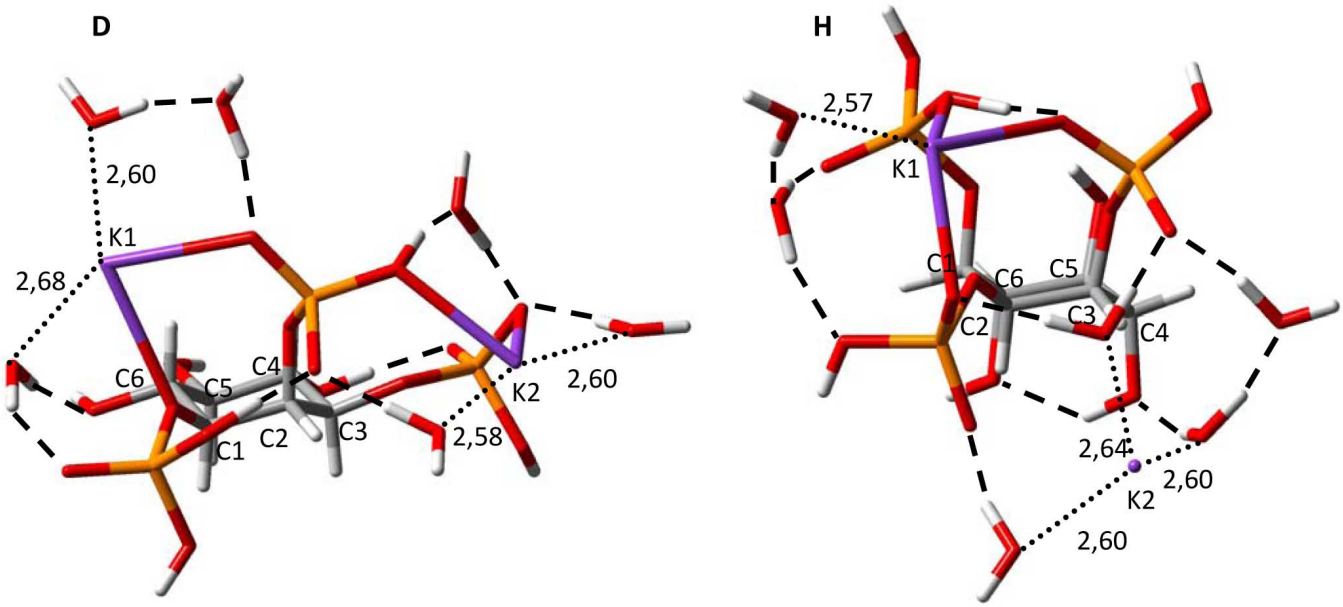


$[KH_2L(H_2O)_2]^{3-}$ (1a5e)

G



$[KH_2L(H_2O)_2]^{3-}$ (5a1e)



$[K_2H_4L(H_2O)_6]$ (1a5e) **$[K_2H_4L(H_2O)_6]$ (5a1e)**

Figura 13.8. Geometrías RB3LYP/LANL2DZ optimizadas para ambos estados conformacionales de los complejos K^+-Ins(1,2,3)P_3. $[KL(H_2O)_2]^{5-}$ (A,E), $[K(HL)(H_2O)_2]^{4-}$ (B,F), $[K(H_2L)(H_2O)_2]^{3-}$ (C,G) y $[K_2(H_4L)(H_2O)_6]$ (D,H). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas mientras que los enlaces K-O de las aguas de hidratación se representan con líneas punteadas. En este último caso se detalla la distancia correspondiente en Å.

Para la conformación 1a5e, y en línea con lo discutido a partir de los datos espectrales por RMN, el fosfato en posición 2 posee un rol significativo en el patrón de coordinación ligando-metal. Sin embargo, la disposición 5a1e de los sustituyentes no concuerda con esta información estructural y por tanto se espera que la conformación del ligando en los complejos con potasio sea, de hecho, la misma que en ausencia de metal: 1a5e.

La afinidad de los iones metálicos por las moléculas de agua es bastante baja para los complejos 1:1. Durante el proceso de optimización, las moléculas de agua de coordinación alejan del centro metálico y se unen a la especie por fuertes enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato. De hecho, las geometrías en fase gaseosa y las correspondientes en presencia de aguas de coordinación son muy similares, por lo que el entorno del ion potasio no sufre cambios importantes (no se muestra). Si se observan en detalle las geometrías de los complejos $[KL]^{5-}$, $[K(HL)]^{4-}$ y $[K(H_2L)]^{3-}$ (figuras 13.8A a C y 13.8E a G), se advierte

que a medida que la carga de la especie disminuye, las moléculas de agua interaccionan con el ion K^+ a través de mayor número de enlaces cada vez más cortos, aunque de manera muy débil en todos los casos. En este sentido, una visión más "realista" del sistema involucraría al solvente hidratando a las especies aniónicas 1:1 como un todo, y en la dinámica de la solución y de forma parcial, completando las posiciones de coordinación de los cationes alcalinos.

Más allá de que el Ins(1,2,3)P_3 se asocia completamente al metal en presencia de un exceso de ion K^+, la distorsión estructural vinculada a esta interacción no es significativa en términos generales. La excepción es la especie $[K(HL)]^{4-}$ en el estado 5a1e, en la cual el ion metálico alivia la repulsión electrostática entre los grupos fosfato que es notoria en HL^{5-}, dando lugar a una geometría menos distorsionada. Para la conformación 1a5e de las especies complejas 1:1, la naturaleza del enlace de hidrógeno entre los grupos fosfato y los grupos OH en posiciones 4, 5 y 6 permanece prácticamente incambiada luego de la complejación. Este fenómeno posee, en efecto, un correlato experimental en la variación que Dozol *et al*. detectaron en las señales de H4, H5 y H6 en el RMN (de hecho, las medidas en este reporte fueron realizadas en presencia de exceso de ion potasio) [1].

En el complejo neutro dinuclear $[K_2(H_4L)]$, el panorama cambia. El ligando se encuentra en un alto grado de protonación, por lo que los grupos fosfato se encuentran menos involucrados en la unión del metal. Con la adición de un segundo ion K^+, el poliedro de coordinación cambia y las aguas de coordinación están ahora unidas directamente a los centros metálicos.

3.2.3. Influencia del ion K^+ en la estabilidad conformacional del ligando

Para finalizar el estudio estructural de este sistema se realiza el análisis de la influencia del proceso de complejación metálica en la estabilidad de ambos estados conformacionales del ligando. Para esto, en la figura 13.9 se grafica el valor de ΔE para el Ins(1,2,3)P_3 y sus complejos con potasio. En fase gaseosa, parece claro que la interacción ligando-metal estabiliza preferentemente el estado 5a1e de forma general. Para poder racionalizar este hecho se efectuaron, sobre las geometrías optimizadas al nivel RHF/3-21+G* para la

especie L^{6-} (figuras 13.2A y G), cálculos de optimización con el método RB3LYP/6-31+G*, el que describe de forma más exacta la distribución electrónica de la molécula. A partir de aquí se computaron los valores del potencial electrostático molecular sobre una superficie de isodensidad, el cual se muestra en la figura 13.10 junto con las geometrías optimizadas.

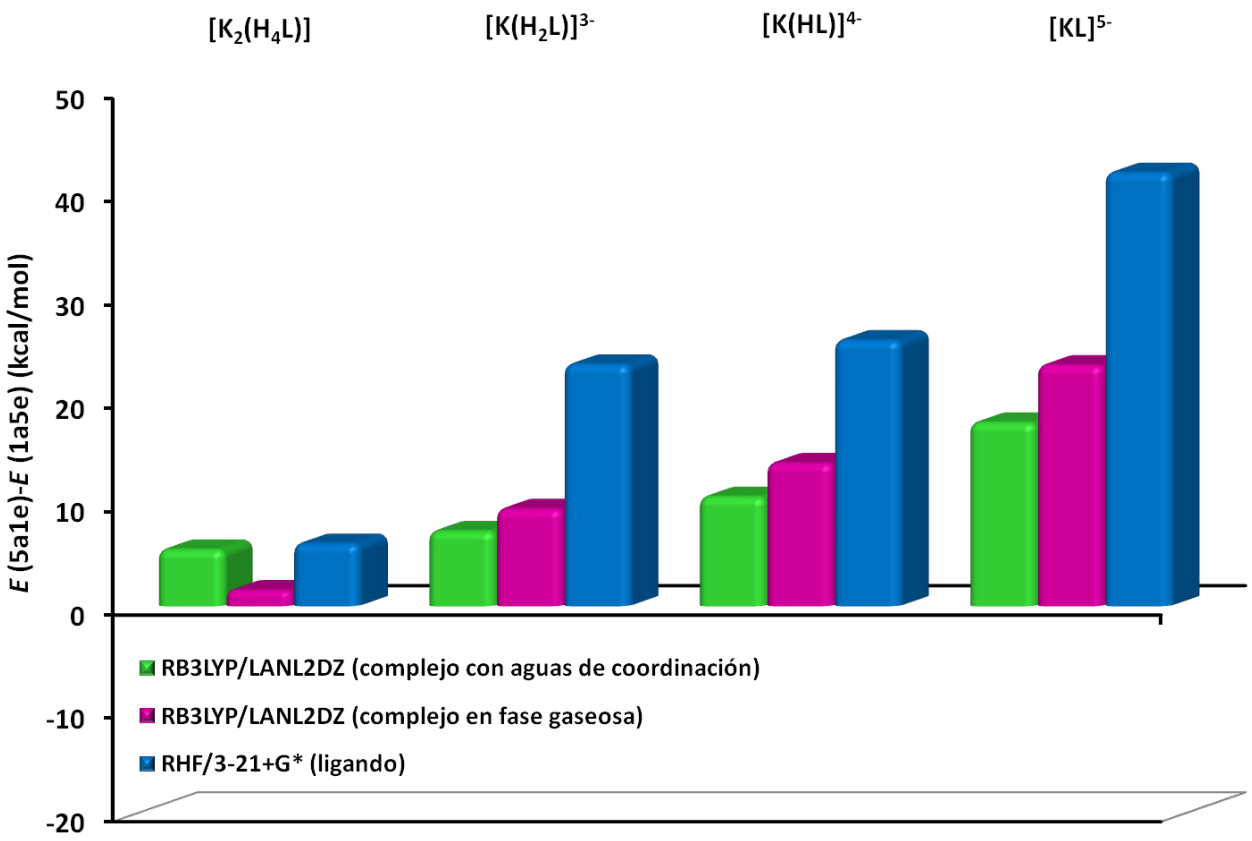


Figura 13.9. Diferencia de energía entre ambos estados conformacionales de los complejos K^+-Ins(1,2,3)P_3, en fase gaseosa y considerando dos (complejos 1:1) y tres (complejo dinuclear) aguas de hidratación por ion metálico. Se muestran además los valores obtenidos para el mismo parámetro en ausencia de ion metálico.

La conformación pentaecuatorial posee las zonas más negativas de la molécula (en rojo en la figura 13.10C) entre los grupos fosfatos, por lo que es, de hecho, donde se ubican los iones K^+ en las especies complejas de la figura 13.8. Esta conformación posee además una zona menos cargada negativamente que

apunta hacia la zona delimitada por los tres grupos ionizables, por lo que una coordinación metal-ligando del tipo 1-2-3 se ve desfavorecida. Por el contrario, el estado 5a1e de L^{6-} posee una geometría "predefinida" para la complejación metálica, ya que la carga negativa del ligando se acumula de forma significativa entre los tres grupos fosfatos, formando un hueco o cavidad aniónica que atrae fuertemente a los cationes. Este fenómeno, que ocurre con una distorsión mínima de la estructura, es favorecido por la unión del ion metálico, el que reduce la repulsión interfosfato.

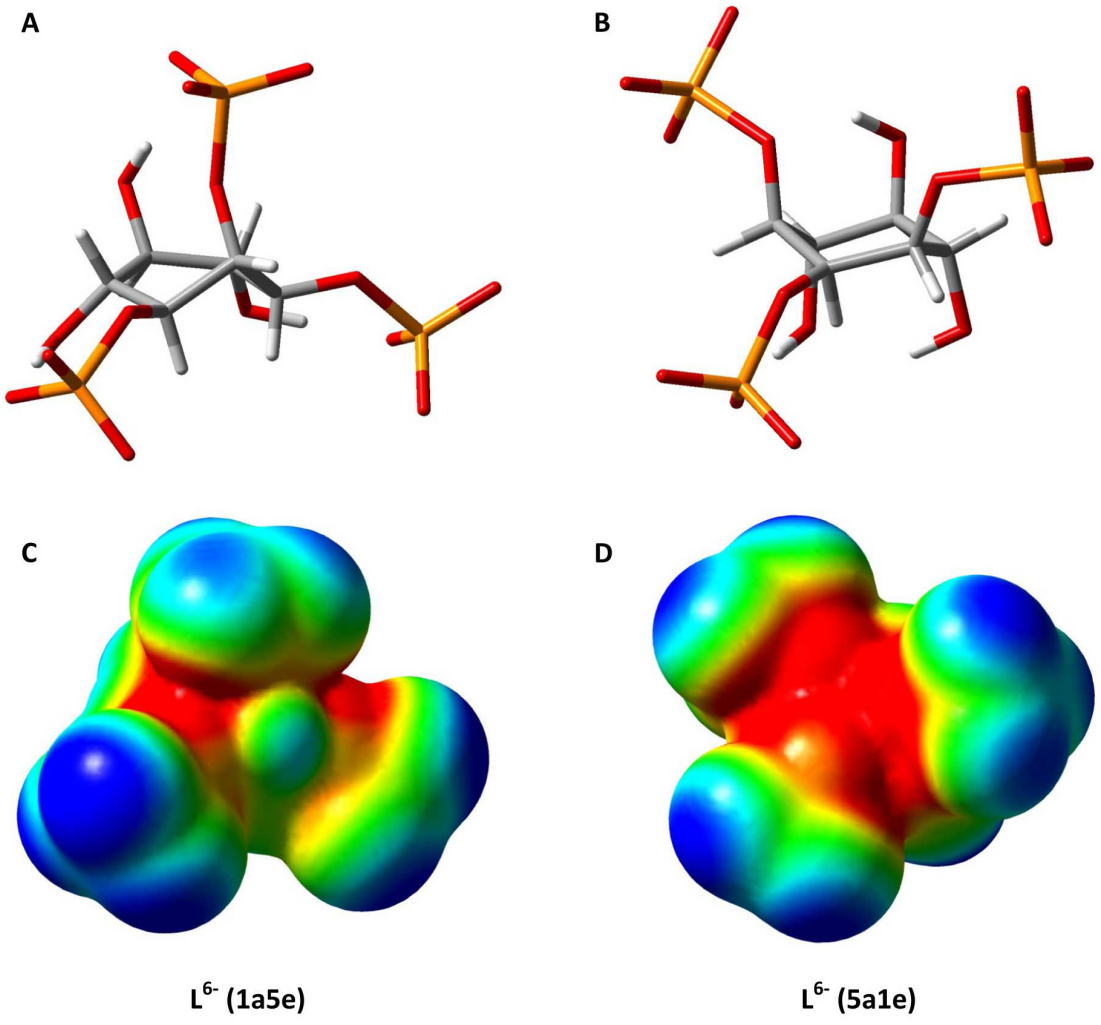


Figura 13.10. Conformaciones 1a5e (A) y 5a1e (B) del Ins(1,2,3)P_3 en ausencia de metal. En (C) y (D) se representa el potencial electrostático molecular de (A) y (B) sobre una superficie de isodensidad (0,0004 e, geometrías RB3LYP/6-31+G*).

En línea con esto, como se evidencia en los valores de Δ*E* de la figura 13.9, el estado 5a1e se ve favorecido en presencia del metal, aunque para este sistema en particular el fenómeno descrito no llega a contrarrestar las ventajas que brinda al ligando la conformación 1a5e. De todas formas, la magnitud del Δ*E* para el complejo dinuclear es pequeña, por lo que, en fase gaseosa, existe la posibilidad de una mezcla de estados conformacionales.

Cuando se consideran aguas de hidratación dentro del modelo aplicado, el cambio en los valores de Δ*E* no es significativo. Esto prueba que el efecto de la hidratación sobre la energía de los diversos confórmeros no es considerable. Al margen de esto, mientras que en los complejos 1:1 el Δ*E* decrece con la inclusión del solvente, éste aumenta para la especie dinuclear. Una explicación factible a este hecho surge de la discusión precedente de los complejos de la figura 13.8, y está asociada a la diferencia existente en la naturaleza de la interacción metal-solvente para ambos tipos de complejos Ins(1,2,3)P_3-K^+.

3.3. Sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+}

3.3.1. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

Para el estudio químico-estructural de este sistema se utilizó una estrategia similar a la aplicada en presencia del catión potasio. Dado que los complejos detectados poseen estequiometrías que van desde 1:1 a 3:1 metal:ligando, fue necesaria la realización de más de un estudio espectroscópico, de forma de cubrir las distintas condiciones en las que las diversas especies se tornan predominantes. En detalle, se efectuaron dos corridas experimentales, con concentración de ligando aproximada de 2,5 mM y relación ligando:metal cercana a 2:1 y 1:5. En el primer caso, el rango de pH bajo estudio fue 7,5 - 12, lo que permitió el ajuste del comportamiento químico de los complejos mononucleares. El segundo experimento se inició a un valor de pH un poco menor, 6,6, y se efectuó hasta la aparición de opalescencia en el sistema (pH ≈ 9 - 9,5). Los resultados obtenidos en estas condiciones se muestran en las figuras 13.11A y B.

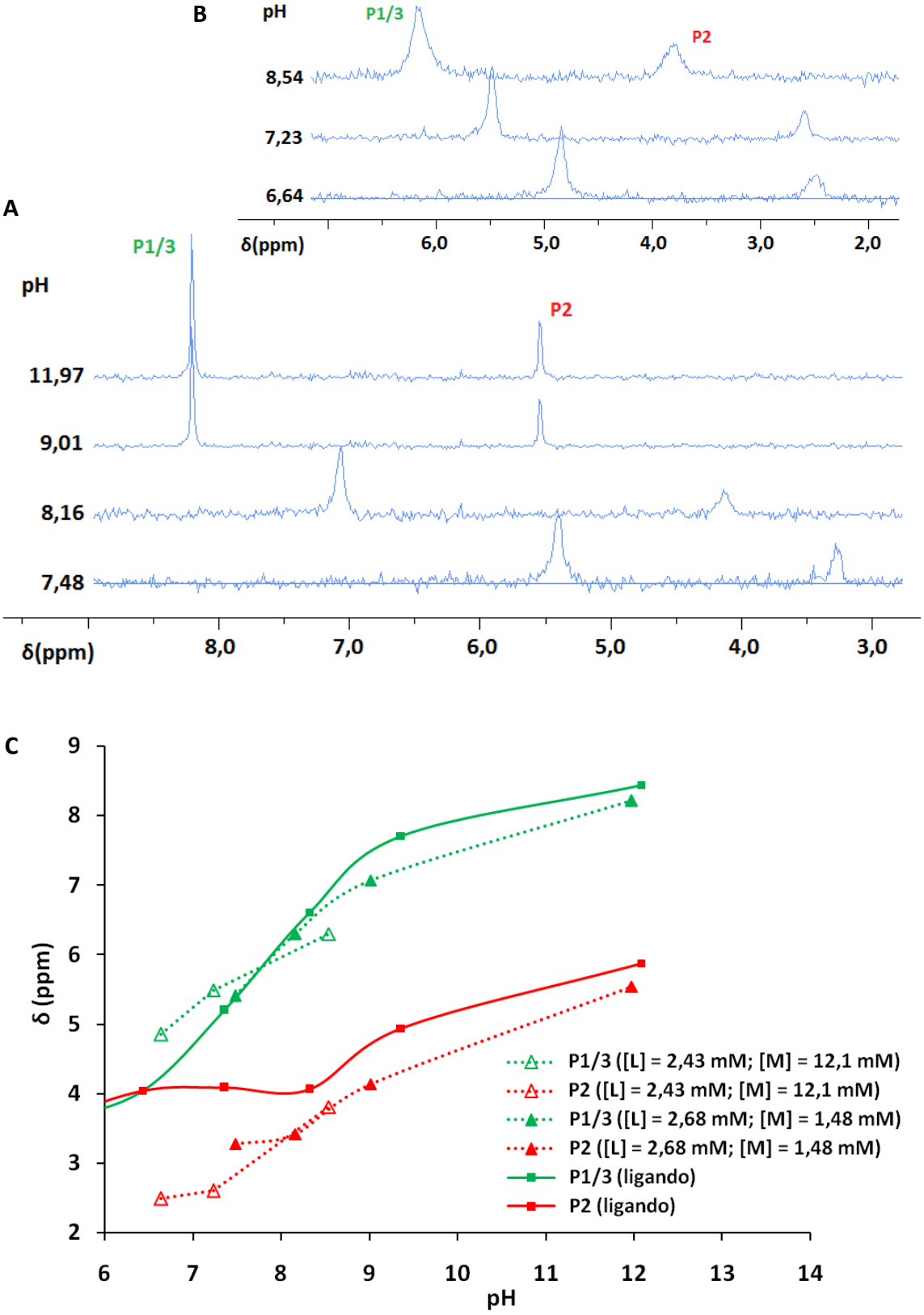


Figura 13.11. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} en función del pH a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M. (A) [L] = 2,68 mM, [Mg^{2+}] = 1,48 mM. (B) [L] = 2,43 mM, [Mg^{2+}] = 12,1 mM. (C) Desplazamiento químico en función del pH en ausencia (líneas continuas) y presencia de Mg^{2+} (líneas discontinuas).

La asignación de las señales se logró por simple inspección, dada su resolución. Siguiendo el mismo comportamiento observado para el protón y el ion K^+, el ligando y las especies complejas comparten las mismas características espectrales: dos señales integrando en un esquema 2:1. En la figura 13.11C se muestra las curvas de desplazamiento químico en función del pH en presencia y ausencia de magnesio. En contraposición a lo discutido en presencia de ion alcalino, las señales sufren un desplazamiento hacia mayores o menores campos dependiendo del pH y de la relación metal:ligando utilizada. Este fenómeno es complejo y ya se presentó en detalle para todos los sistemas InsP_6-M(II)/(III) e Ins(1,3,4,5,6)P_5-M(II)/M(III). Las causas son múltiples y se basan en los diversos procesos de complejación, deprotonación y desblindaje a distancia de los grupos fosfato, los cuales afectan de manera compleja al valor de δ (ver resultados de esta tesis en los capítulos 6, 7 y 10, y referencia [13]).

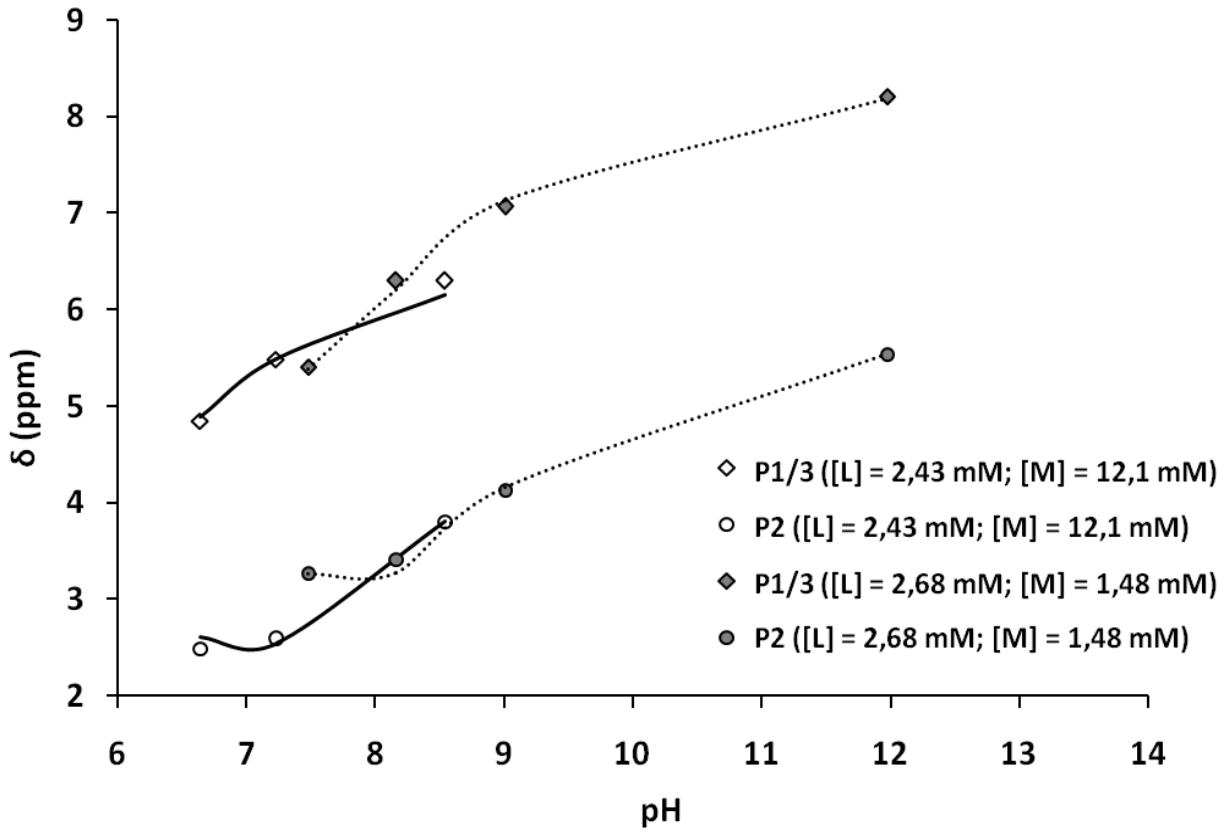


Figura 13.12. Desplazamiento químico en función del pH para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M. Las curvas continua y punteada corresponden al modelo teórico ajustado a ambas corridas experimentales.

Más allá de lo expuesto, en términos generales el corrimiento de las curvas en presencia del metal es diferente para cada señal, lo que evidencia complejación en todo el rango de pH analizado. Más aún, la señal más afectada en condiciones 2:1 ligando:metal es la de P2, por lo que se espera un rol importante de este grupo en el proceso de complejación del magnesio por parte de los complejos 1:1 (figura 13.11C). Por el contrario, al aumentar la relación magnesio-Ins*P* los fosfatos sobre C1 y C3 comienzan a tomar parte activa en el patrón de coordinación, haciendo que las curvas correspondientes del ligando y los complejos mono y trinucleares se crucen a pH cercano a 8.

El tratamiento de los datos experimentales de ambas corridas arrojan los resultados que se muestran en la tabla 13.7. Las constantes de equilibrio obtenidas señalan la formación de dos especies de estequiometría 1:1 metal:ligando estables y muy cargadas, y una especie polinuclear neutra, en total acuerdo con el análisis potenciométrico. Como se desprende de la figura 13.12, el ajuste del comportamiento de las señales con el pH es bastante satisfactorio, dando, de hecho, residuales muy pequeños (σ = 0,08).

Tabla 13.7. Logaritmo de las constantes de formación ajustadas para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

Equilibrio	log *K*	σ
$Mg^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [MgL]^{4-}$	3,3(1)	0,08
$Mg^{2+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Mg(HL)]^{3-}$	2,9(1)	
$3\ Mg^{2+} + L^{6-} \leftrightarrow [Mg_3L]$	8,9(2)	

A partir de estos resultados, las figuras 13.13A y B muestran los diagramas de distribución de especies calculados en las condiciones de ambas corridas experimentales. Se hace evidente a partir de ellos la necesidad de la realización de dos experimentos independientes, de forma de poder analizar el comportamiento químico de los tres complejos metálicos. Asimismo, la opalescencia que impidió la adquisición de puntos adicionales en la corrida en exceso de metal comienza a partir de pH = 9,0 - 9,5, rango donde se hace máxima la concentración del complejo trimagnésico (figura 13.13B). Dada la

experiencia adquirida con el resto de los sistemas poco solubles de esta tesis, es altamente probable que el sólido en equilibrio corresponda a un compuesto de estequiometría $Mg_3L{\cdot}nH_2O(s)$, en línea con la correspondiente fórmula química del complejo neutro soluble $[Mg_3L]$.

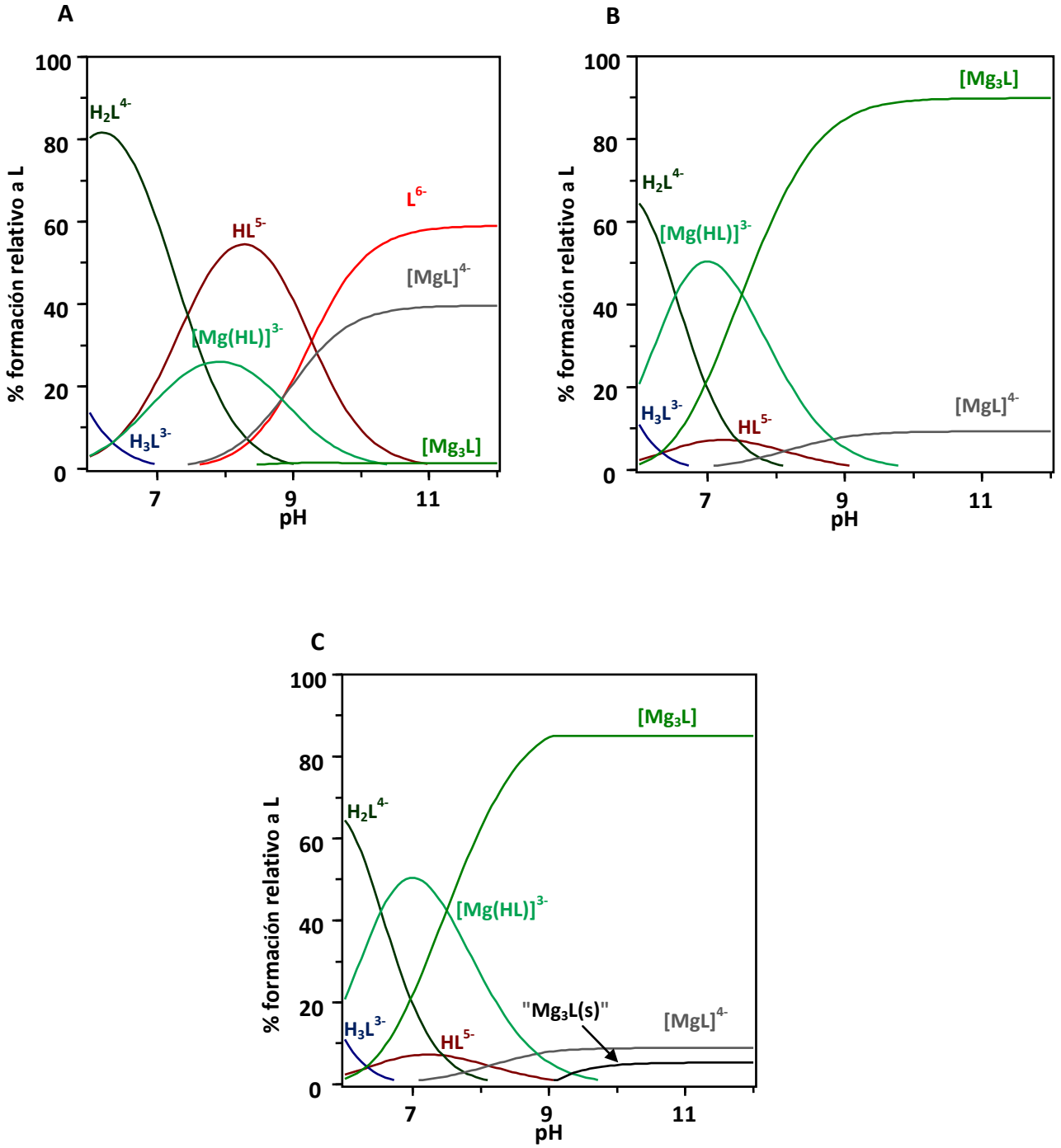


Figura 13.13. Diagramas de distribución de especies para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C. (A) [L] = 2,68 mM, $[Mg^{2+}]$ = 1,48 mM. (B) [L] = 2,43 mM, $[Mg^{2+}]$ = 12,1 mM. En (C) se muestra una simulación del diagrama de (B) considerando la formación de una fase sólida "$Mg_3L(s)$", con un log $K_{s,0}$ igual a -11,55.

Suponiendo que ésta es efectivamente la estequiometría del sólido formado, y sólo a efectos de poder estimar de manera general la solubilidad que presenta, en la figura 13.13C se muestra una simulación realizada en las mismas condiciones de la corrida en presencia de exceso de magnesio, pero con la inclusión del correspondiente equilibrio de precipitación. Para reproducir las observaciones experimentales, el log $K_{s,0}$ debe tomar el valor -11,55, permitiendo que la fase sólida se forme a partir de pH = 9. No obstante, dado que es factible que la nucleación comience a valores de pH menores al punto en el que el sólido es detectado visualmente, el valor anterior provee de una cota estimativa superior al valor de la constante. Este valor de solubilidad provoca que, en la mayoría de los sistemas biológicos donde la concentración del Ins(1,2,3)P_3 no supera el rango micromolar, este ligando se encuentra solubilizado por formación de complejos metálicos.

3.3.2. Caracterización estructural del sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} por RMN

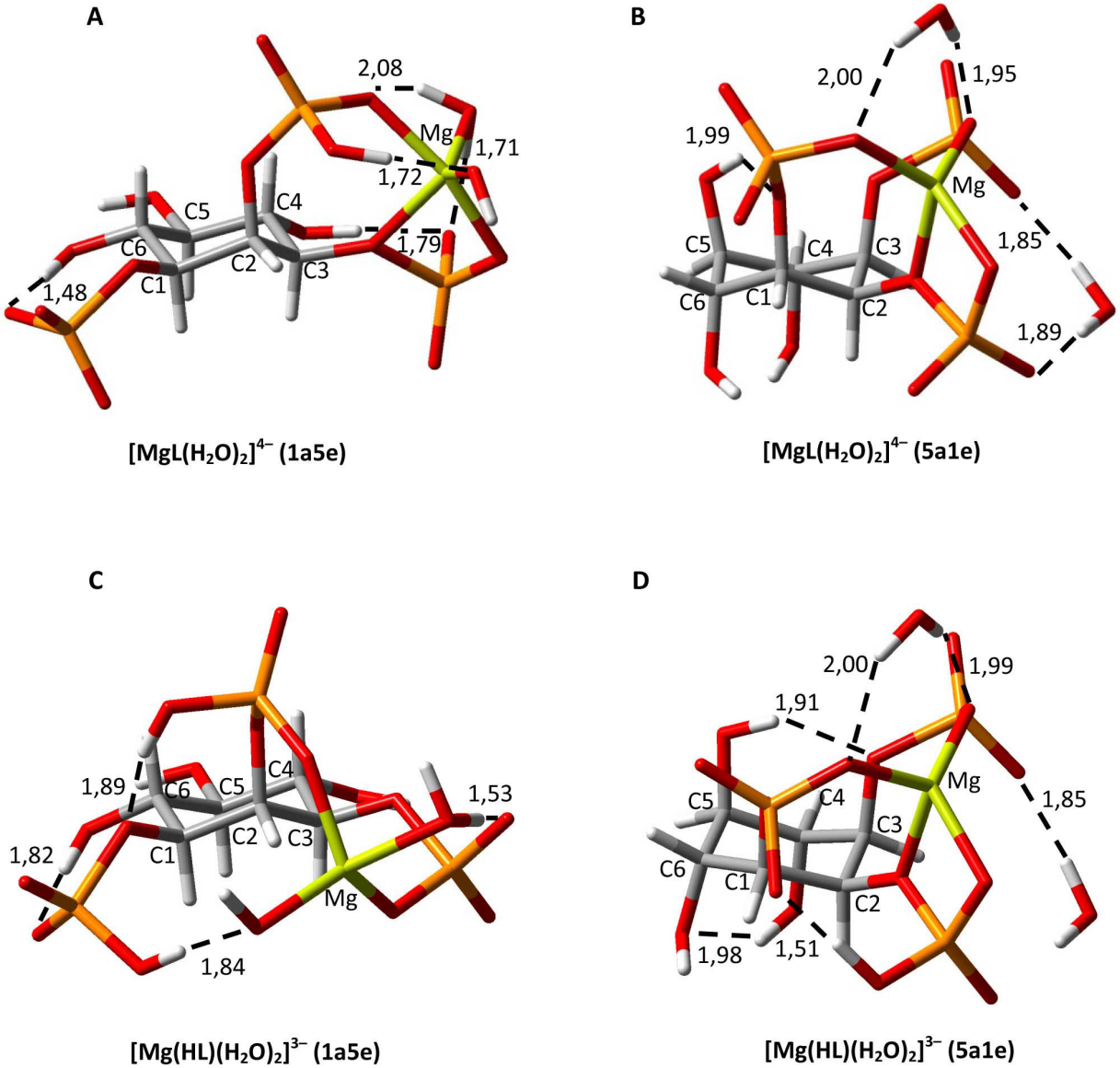
Derivado a partir del ajuste de los datos espectroscópicos por RMN, se obtiene como información adicional los desplazamientos químicos individuales para las especies complejas y su variación con los procesos de protonación y coordinación en solución. Los resultados finales se detallan en la tabla 13.8.

Tabla 13.8. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)			$\Delta\delta_{prot}$(ppm)			$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)	
Especies	P1/3	P2		P1/3	P2		P1/3	P2
$[MgL]^{4-}$	7,872	5,125		---	---		-0,580	-0,735
$[Mg(HL)]^{3-}$	5,228	0,830		-2,644	-4,295		-1,548	-3,026
$[Mg_3L]$	6,127	4,165		---	---		-2,325	-1,695

El complejo $[MgL]^{4-}$ presenta valores negativos de $\Delta\delta_{compl}$. Aunque ambos grupos de fosfatos parecen involucrados en la coordinación, P2 lo hace de manera más activa, como se desprendía del análisis de las curvas de la figura

13.11C. Al disminuir el pH se produce la formación de $[Mg(HL)]^{3-}$ por protonación del grupo fosfato en posición 2, según el valor negativo del $\Delta\delta_{prot}$ respectivo. Sin embargo, este parámetro es muy negativo también para P1/3, por lo que es probable que el H^+ que ingresa se mantenga compartido con este grupo mediante un fuerte enlace de hidrógeno. De la misma forma que ocurre con el complejo $[MgL]^{4-}$, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ continúan evidenciando un rol más activo del fosfato en C2 dentro del patrón de coordinación ligando-metal. Con el aumento de la concentración de magnesio, a pH por encima de la neutralidad se favorece la formación del complejo trinuclear $[Mg_3L]$. En este caso el patrón de coordinación cambia. Los grupos fosfato P1 y P3 unen ahora al magnesio fuertemente, viéndose incluso más involucrados en el enlace ligando-metal que el fosfato en C2.

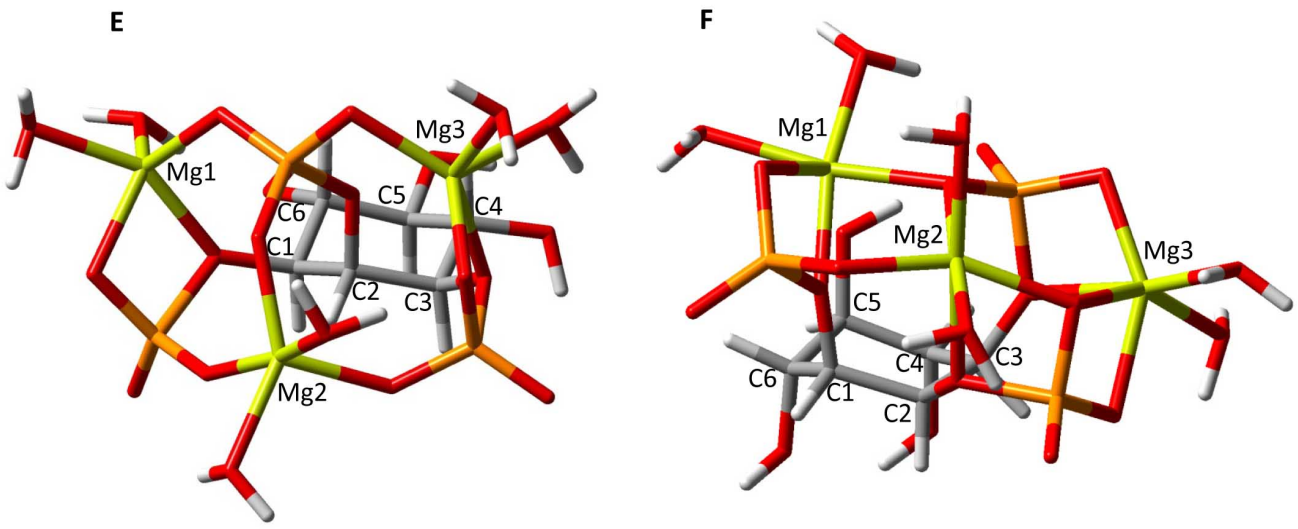


$[MgL(H_2O)_2]^{4-}$ (1a5e)

$[MgL(H_2O)_2]^{4-}$ (5a1e)

$[Mg(HL)(H_2O)_2]^{3-}$ (1a5e)

$[Mg(HL)(H_2O)_2]^{3-}$ (5a1e)



$[Mg_3L(H_2O)_6]$ (1a5e) **$[Mg_3L(H_2O)_6]$ (5a1e)**

Figura 13.14. Geometrías RB3LYP/6-31+G* optimizadas en fase gaseosa para ambos estados conformacionales de las especies $[MgL]^{4-}$ (A y B), $[Mg(HL)]^{3-}$ (C y D) y $[Mg_3L]$ (E y F). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran desde A a D en líneas discontinuas, con la distancia correspondiente en Å.

Para poder tener una visión general del esquema de coordinación en ambos tipos de complejos y revisar los requerimientos geométricos relacionados con la interacción ligando-metal, se procedió al modelado molecular de ambas conformaciones de las especies $[MgL]^{4-}$ y $[Mg_3L]$. Se consideraron, en primer término, las geometrías en fase gaseosa, para luego completar el entorno de coordinación metálica con dos moléculas de agua. Finalmente, por protonación y optimización de las soluciones más estables de $[MgL]^{4-}$ se obtuvieron las geometrías del complejo $[Mg(HL)]^{4-}$. Los resultados de estos cálculos, resumidos en la figura 13.14, muestran un patrón de coordinación distinto para las especies 1:1 y el complejo polinuclear. En particular, cuando se une un solo metal al ligando, dos o tres grupos fosfato rodean al mismo sin demasiadas exigencias estructurales, más allá de la formación de algunos enlaces de hidrógeno intramoleculares que aportan a la estabilidad de la especie formada (figuras 13.14A a D). Por el contrario, la disposición de los tres centros metálicos en el complejo $[Mg_3L]$ es estratégica, dando lugar a un esquema cooperativo de unión que permite disminuir la repulsión interfosfato e

intermagnésica, mientras que se optimizan las distancias de enlace y las geometrías del poliedro de coordinación (figuras 13.14E y F).

En las especies 1:1, el ion magnesio no logra disponerse en entornos químicos con geometrías regulares que involucren las diversas moléculas de agua circundantes. En estos complejos fuertemente cargados, se espera un enlace con un componente electrostático sustancial, de forma que el ion Mg^{2+} se dispone en las cavidades formadas por las zonas más negativas del potencial electrostático molecular, marcadas para el ligando en rojo en las figuras 13.10C y D. La alta carga de los grupos fosfato que forman estos "huecos" negativos es la causa de que algunas moléculas de agua unidas al ion central puedan ser deprotonadas, dando lugar a ligandos OH^- (figuras 13.14A y C).

3.3.3. Influencia del ion Mg^{2+} en el equilibrio conformacional del ligando

Resta por analizar los aspectos energéticos asociados con las geometrías anteriores y su relación con los resultados experimentales de la tabla 13.8. Ambos estados conformacionales del complejo $[MgL]^{4-}$ se encuentran de acuerdo con el rol más activo de P2 en el enlace al metal, por lo que desde un punto de vista estructural son compatibles con los datos experimentales (figuras 13.14A y B). Para poder estimar la estabilidad relativa de ambas conformaciones se hace necesario el cómputo de las energías moleculares correspondientes. En la figura 13.15 se grafica el valor de ΔE para algunos de los compuestos metálicos examinados y el ligando.

La complejación disminuye la brecha energética entre los estados 1a5e y 5a1e de $[MgL]^{4-}$, posiblemente porque favorece ligeramente la conformación pentaaxial de los grupos sustituyentes. Como se discutió en base a la figura 13.10, este confórmero se encuentra preformado para recibir al metal con un mínimo de distorsión estructural, a través del arreglo de la densidad electrónica en un "hueco" cargado negativamente. La inclusión de moléculas de agua provoca una estabilización relativa de la conformación 5a1e respecto de la 1a5e, dado que, como se advierte en base a las figuras 13.14A y B, éstas previenen al metal de unirse fuertemente a los grupos fosfatos sólo en el estado 1a5e. De forma interesante, la configuración pentaecuatorial sigue

siendo la preferida desde el punto de vista energético, ya que no sólo da lugar a una geometría muy poco deformada del ligando, sino que además establece enlaces de hidrógeno mucho más intensos que en el caso de la conformación 5a1e. En efecto, la distancia media de los enlaces de hidrógeno disminuye de 1,94 a 1,76 Å en el proceso $[MgL]^{4-}$ (5a1e) → $[MgL]^{4-}$ (1a5e). Estos resultados teóricos condicen con los datos espectroscópicos. Se evidencia desde el punto de vista experimental que L^{6-} y $[MgL]^{4-}$ comparten la misma conformación, ya que los espectros de la figura 13.11A por encima de pH = 9, donde el diagrama de la figura 13.13A marca una mezcla de ambas especies, carecen del ruido espectral y el ensanchamiento de bandas característico de los procesos de transición conformacional.

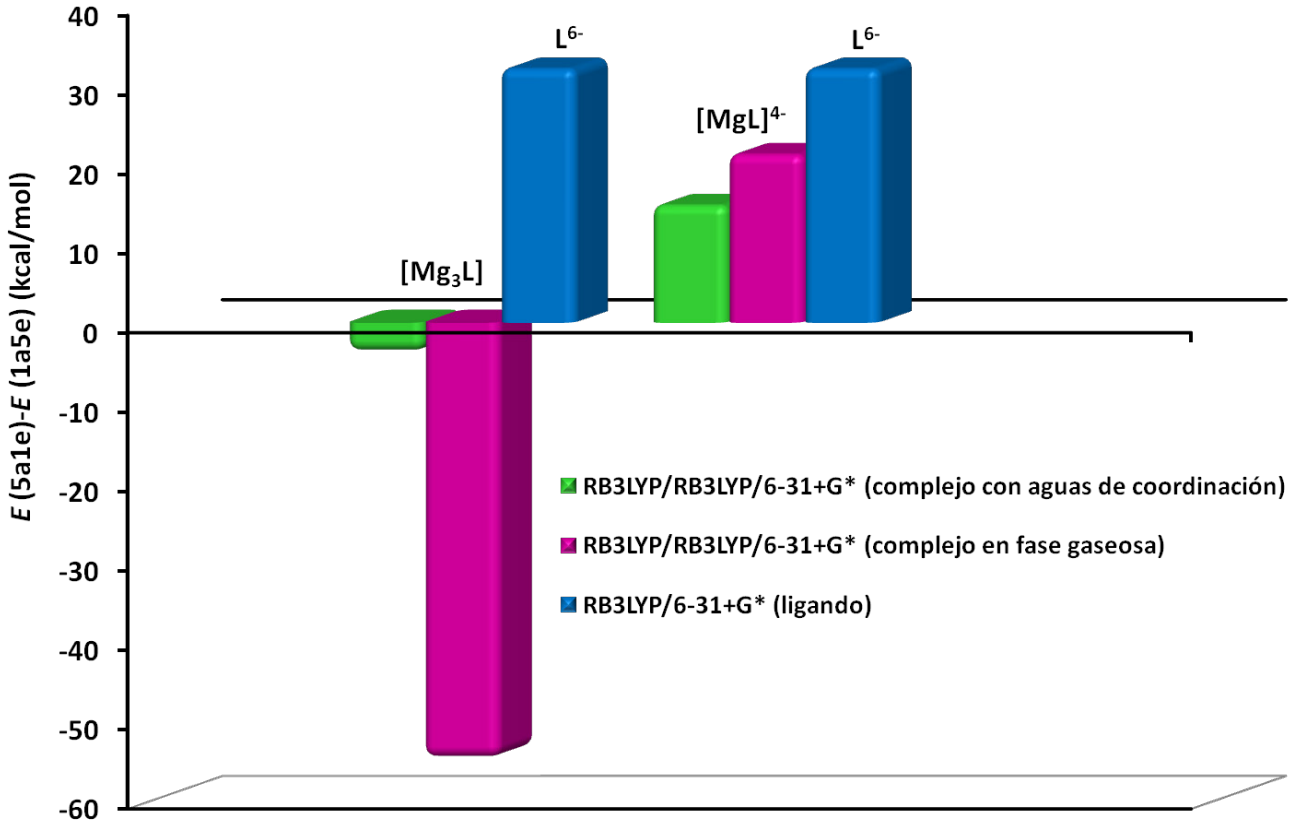


Figura 13.15. Diferencia de energía entre ambos estados conformacionales de los complejos $[MgL]^{4-}$ y $[Mg_3L]$, en fase gaseosa y considerando dos moléculas de agua de hidratación por ion metálico. Se muestra además el valor obtenido para el mismo parámetro en ausencia de ion metálico.

Los resultados para el complejo [Mg_3L] son diferentes. La complejación en fase gaseosa produce una inversión muy marcada en la estabilidad relativa de las conformaciones del ligando. Nuevamente aquí, el estado 5a1e parece ser muy adecuado para la coordinación del metal. Asimismo, en este tipo de complejos neutros el solvente parece jugar un papel fundamental en el establecimiento del orden de las energías moleculares en solución. A diferencia de lo que ocurre en las especies 1:1, la ausencia de carga negativa sobre los grupos fosfato permite la unión al metal de las moléculas de agua del medio, alterado de forma sustancial la estructura como un todo. Como consecuencia, es posible que en el seno de la solución ambos confórmeros posean estabilidades muy similares, aunque se predice una leve preferencia por el estado 5a1e. Según los datos de la tabla 13.8, se espera que el grupo P1/3 se encuentre más involucrado en el enlace que P2. Como muestra la figura 13.14E, en la conformación 1a5e el fosfato en C2 aparece unido a tres iones Mg^{2+}, a una distancia promedio de 3,04 Å, mientras que aquellos sobre C1 y C3 sólo se acercan a dos cationes, a una distancia levemente mayor de 3,10 Å. Por otro lado, el estado 5a1e (figura 13.14F) obliga a los grupos fosfato P1 y P3 a rodearse de dos y tres cationes Mg^{2+}, mientras que P2 se une sólo a dos de ellos. En base a toda esta información, se espera desde el punto de vista computacional que la conformación más estable de [Mg_3L] en solución sea 5a1e, lo que concuerda en buena medida con los datos experimentales.

Para finalizar se hará un breve comentario sobre el estado conformacional de la especie restante, $[Mg(HL)]^{3-}$. Los valores correspondientes de $\Delta\delta_{compl}$ y $\Delta\delta_{prot}$ en la tabla 13.8 son todos muy negativos. Aparentemente, el proceso de protonación de $[MgL]^{4-}$ produce una alteración muy importante en el entorno de los átomos de fósforo. Esto ha sido asociado en este mismo trabajo a un posible cambio en la conformación del ligando, gatillado usualmente por procesos de protonación de las especies. En apoyo a esta idea, si se observan los espectros de la figura 13.11A se detecta, por debajo de pH = 9, un aumento en el ancho de las señales y el ruido espectral, condiciones donde el diagrama de la figura 13.13A predice, en efecto, la aparición de $[Mg(HL)]^{3-}$.

El modelado de los complejos $[MgL]^{4-}$ y $[Mg(HL)]^{3-}$ muestra resultados similares. Si se observan las geometrías de ambas especies en la conformación 1a5e

(figuras 13.14 A y C), la protonación de $[MgL]^{4-}$ da lugar a un cambio en el esquema de coordinación, originado en el acercamiento de los fosfatos sobre C1/3 y C2 por compartición del H^+ entrante. Asimismo, esta alteración estructural trae aparejado una aproximación de las energías moleculares correspondientes a ambos confórmeros. Si se comparan los valores de cambio en la energía libre para los siguientes procesos:

$$(1a5e)\ [MgL]^{4-} \rightarrow (5a1e)\ [MgL]^{4-} \qquad \Delta G = 25{,}7 \text{ kcal/mol}$$

$$(1a5e)\ [Mg(HL)]^{3-} \rightarrow (5a1e)\ [Mg(HL)]^{3-} \qquad \Delta G = 5{,}0 \text{ kcal/mol}$$

se advierte que, con el ingreso del protón, la transición conformacional hacia el estado pentaaxial resulta menos desfavorable termodinámicamente. En este sentido y dada la evidencia planteada, un cambio conformacional 1a5e → 5a1e, inducido por la complejación y protonación del ligando, es una posibilidad compatible con los datos espectroscópicos y computacionales.

3.4. Sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+}

3.4.1. Evaluación del comportamiento redox del Ins(1,2,3)P_3

El perfil voltamperométrico del ligando muestra contribuciones anódicas y catódicas poco definidas con una doble capa muy ancha (figura 13.16). Como consecuencia, para poder mejorar la evaluación de los procesos redox involucrados, se realizaron deconvoluciones gráficas de los voltamperogramas obtenidos, de forma de eliminar la contribución de las corrientes capacitivas.

El perfil muestra la presencia de dos cuplas redox, una con un potencial formal $E^{0'}$ = 0,246 V (con una diferencia entre los potenciales de picos anódico y catódico, $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ = 0,019 V) y la otra con un $E^{0'}$ = 0,415 V (ΔE_p = 0,008 V). El proceso involucra la adsorción de las especies electroactivas sobre la superficie del electrodo, tal como se desprende del ajuste lineal observado entre la intensidad de corriente de pico (I_p) *vs.* la velocidad de barrido (v). Considerando los valores de ΔE_p obtenidos, es posible afirmar además que el intercambio electrónico es lento. Ambos procesos descritos se asocian

probablemente a la oxidación de los grupos C-OH del anillo de inositol, la cual se efectúa en dos etapas distintas, debido a las diferencias en la accesibilidad de los grupos en 4/6 y 5 a la superficie del electrodo.

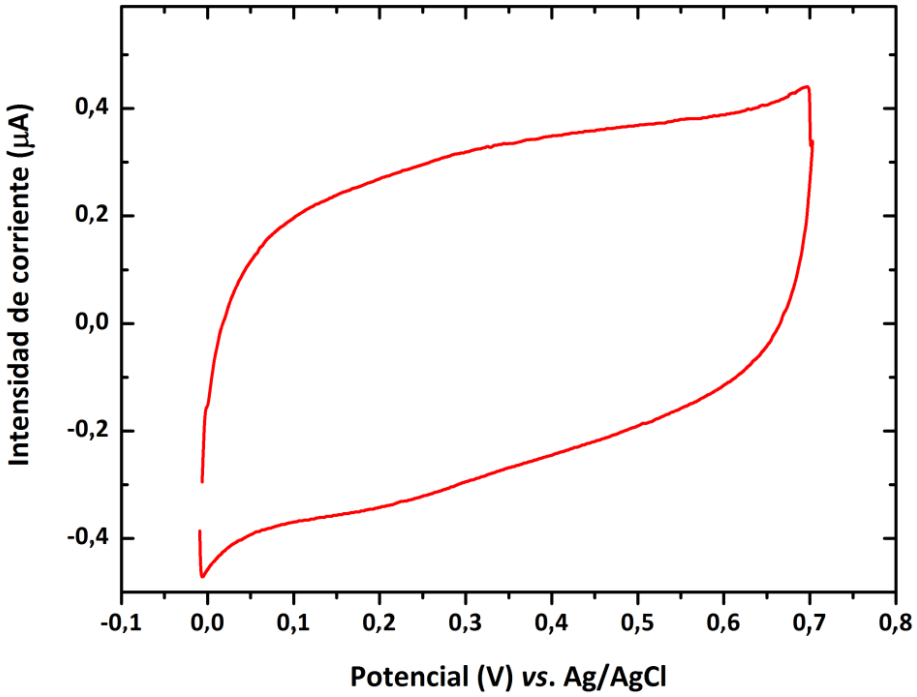


Figura 13.16. Perfil voltamperométrico obtenido para Au-*pc* en solución 1 mM de Ins(1,2,3)P_3 en $NaClO_4$ 0,15 M (pH = 7, v = 0,020 V/s, T = 25 °C) medido contra electrodo de Ag/AgCl.

3.4.2. Evaluación del comportamiento redox del sistema Fe-Ins(1,2,3)P_3

En presencia de hierro, los resultados varían moderadamente, haciéndose dependientes del pH del medio (ver figura 13.17).

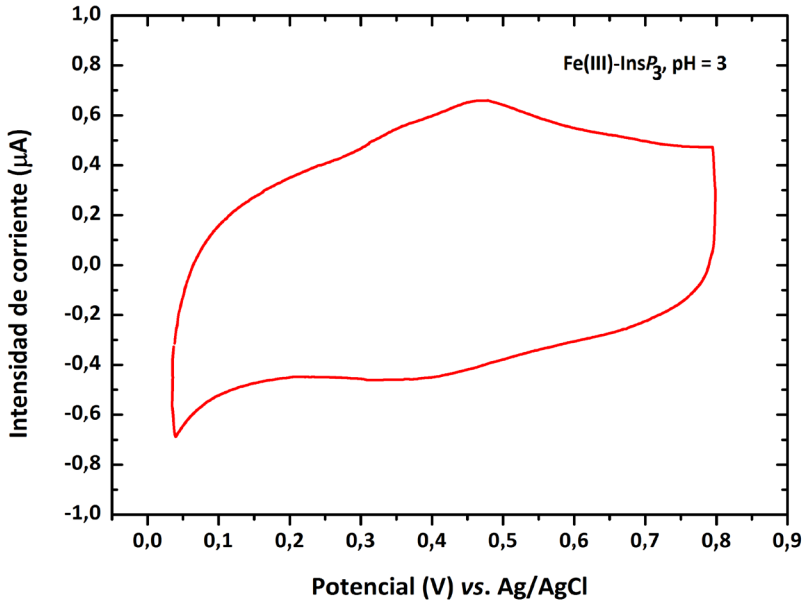
Se detectan, a pH = 3, tres procesos principales (figura 13.17A). En primer lugar se observa una contribución anódica a 0,34 V proveniente de especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo, relacionada con una mezcla de las dos cuplas del ligando. El segundo par redox posee un $E^{0'}$ = 0,440 V (ΔE_p = 0,050 V), siendo ambos componentes de la cupla capaces de adsorberse sobre el electrodo. Este proceso puede provenir del intercambio de un electrón para la cupla Fe(III)/Fe(II) en el complejo formado. Los valores de E_{pa} y E_{pc} muestran un ajuste lineal con el ln v, con una pendiente de 24 mV/dec para el pico anódico y 30 mV/dec para el catódico (ver Anexo B). Esto es concordante con una

transferencia electrónica lenta con un coeficiente de transferencia igual a 0,5 para el proceso de intercambio de un electrón. La tercera cupla observada, con un $E^{0'}$ = 0,625 V (ΔE_p = 0,030 V), también se encuentra relacionada con especies adsorbidas sobre el electrodo. La presencia de esta cupla puede ser explicada si se considera la presencia de hierro libre en el sistema, lo cual concuerda además con la detección de la contribución anódica en 0,34 V proveniente del ligando libre. En conclusión, a pH = 3 el ligando y el hierro no están completamente asociados, por lo que se registran contribuciones redox provenientes de la existencia de las especies electroactivas libres.

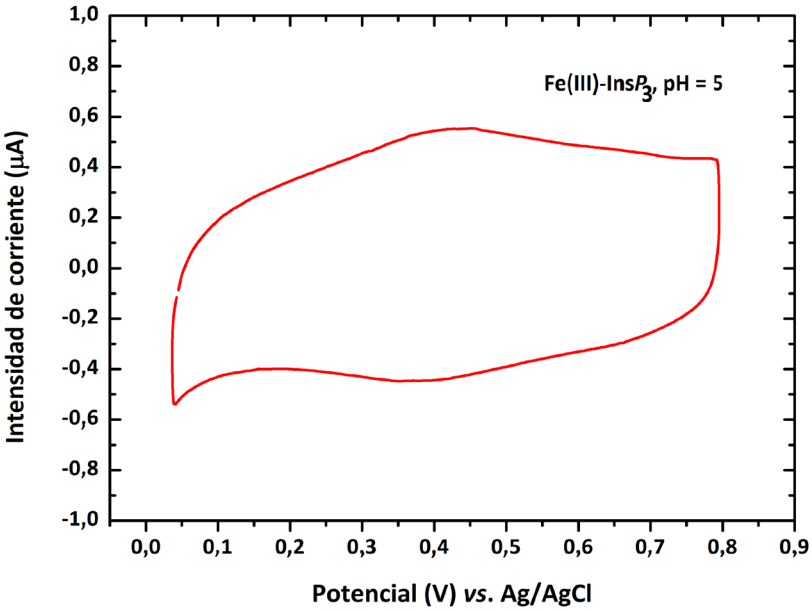
A pH = 5, también se detectan contribuciones relacionadas con tres procesos redox (figura 13.17B). Estas se asocian a especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo. En este caso, la presencia de hierro y ligando libres se confirma nuevamente mediante la detección de una contribución anódica a 0,22 V y una cupla redox con $E^{0'}$ = 0,645 V (ΔE_p = 0,030 V). La tercer cupla, asociada al par redox Fe(III)/Fe(II) proveniente del hierro coordinado al ligando, se detecta a un $E^{0'}$ = 0,410 V (ΔE_p = 0,009 V). Los valores de potenciales de pico anódico y catódico muestran un ajuste lineal con el ln *v*, con pendientes de 12 mV/dec y 18 mV/dec respectivamente (ver Anexo B). Estos valores concuerdan con una transferencia lenta del electrón, sin simetría de la barrera energética.

La figura 13.17C muestra el perfil voltamperométrico medido para el sistema a pH = 7. Tal como se deduce a partir de la deconvolución gráfica del voltamperograma cíclico (figura 13.18A), solamente es posible detectar la presencia de dos procesos de intercambio electrónico. A este pH de trabajo, la presencia de ligando libre no es detectada debido a la unión completa con el metal, lo cual es confirmado por la ausencia de la contribución anódica en el rango 0,2 - 0,3 V. En medio neutro, la cupla con $E^{0'}$ = 0,335 V (ΔE_p = 0,010 V), asociada a especies adsorbidas, puede asignarse al comportamiento redox del hierro coordinado. En este caso E_{pa} y E_{pc} se ajustan en forma lineal con el ln *v*, con una pendiente de 15 mV/dec para ambos procesos (ver Anexo B). Una segunda contribución de especies electroactivas adsorbidas sobre el electrodo puede ser detectada a $E^{0'}$ = 0,55 V (ΔE_p = 0,010 V). Este fenómeno parece deberse a una mínima cantidad de hierro libre en exceso.

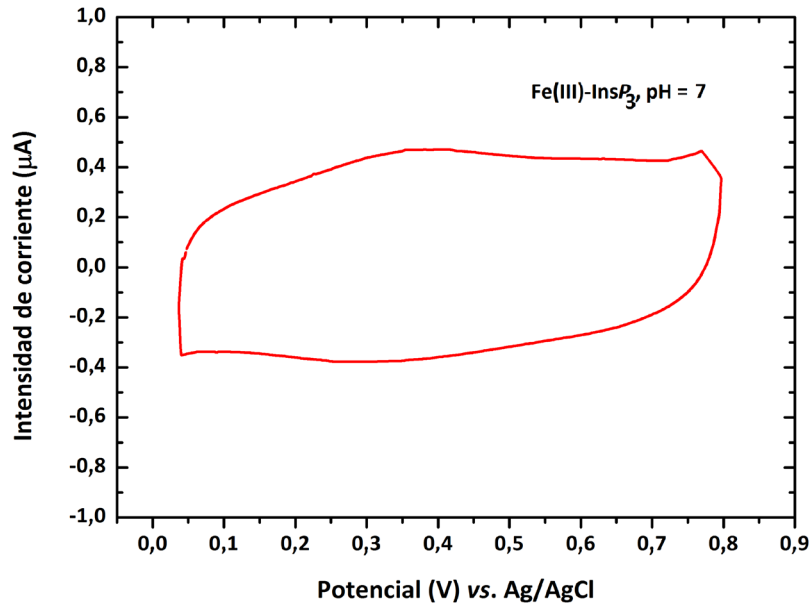
A


Fe(III)-InsP_3, pH = 3
Intensidad de corriente (μA)
Potencial (V) *vs*. Ag/AgCl
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9

B


Fe(III)-InsP_3, pH = 5
Intensidad de corriente (μA)
Potencial (V) *vs*. Ag/AgCl
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9

C


Fe(III)-InsP_3, pH = 7
Intensidad de corriente (μA)
Potencial (V) *vs*. Ag/AgCl
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9

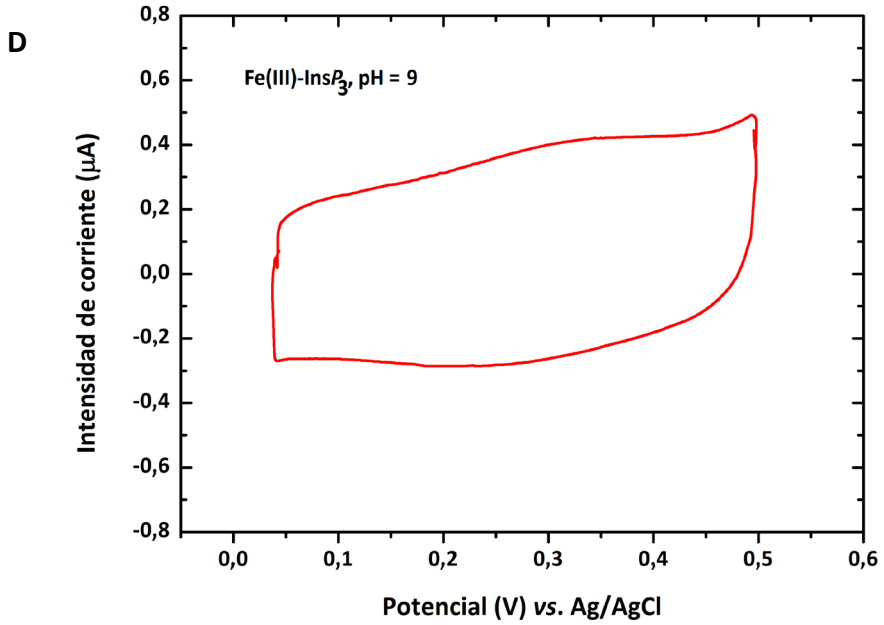


Figura 13.17. Perfiles voltamperométricos de Au-*pc* en solución 1 mM de Fe(II) y 1 mM de Ins(1,2,3)P_3, en $NaClO_4$ 0,15 M (T = 25 °C, v = 0,020 V/s), medidos contra electrodo de Ag/AgCl. (A) pH = 3, (B) pH = 5, (C) pH = 7, (D) pH = 9.

A pH = 9 (figura 13.17D), con el ligando y el metal completamente asociados, sólo se observa una cupla a $E^{0'}$ = 0,285 V (ΔE_p = 0,030 V). Ambas especies involucradas en el intercambio redox se adsorben sobre el electrodo. Los valores de E_{pa} y E_{pc} se ajustan linealmente con el ln v, con una pendiente de 21 mV/dec para el pico anódico y 17 mV/dec para el catódico, de acuerdo con un proceso de transferencia electrónica lenta (ver Anexo B).

En suma, el potencial $E^{0'}$ asociado a la cupla Fe(III)/Fe(II) en los complejos Ins(1,2,3)P_3-Fe varía marcadamente con el pH, lo que se evidencia en la figura 13.18B. En efecto, a medida que se aumenta el pH el ligando se deprotona y une al hierro de manera cuantitativa. Los complejos formados estabilizan de forma sustancial el estado +3, provocando la caída en los valores de $E^{0'}$. Con el objetivo de relacionar estos resultados con el comportamiento redox del ligando en sistemas biológicos, se determinó el valor del potencial $E^{0'}$ a pH = 7,4, por interpolación de la recta obtenida por regresión lineal de los puntos experimentales (figura 13.18B). A partir de aquí y suponiendo una concentración libre de Fe(II) de 50 µM y de Fe(III) de 1 µM, se calcula por la ecuación de Nernst un potencial de 0,424 V *vs.* Ag/AgCl (0,654 V *vs.* ENH). Según bibliografía especializada, sólo aquellos compuestos que poseen un valor

de potencial en el rango 0,39 - 0,28 V *vs.* ENH son capaces de participar en la reacción de Fenton [14]. Se deduce por tanto que la intervención de los complejos Ins(1,2,3)P_3-Fe en los ciclos redox citotóxicos no es plausible, haciendo del ligando un potencial quelante "seguro" de hierro lábil intracelular.

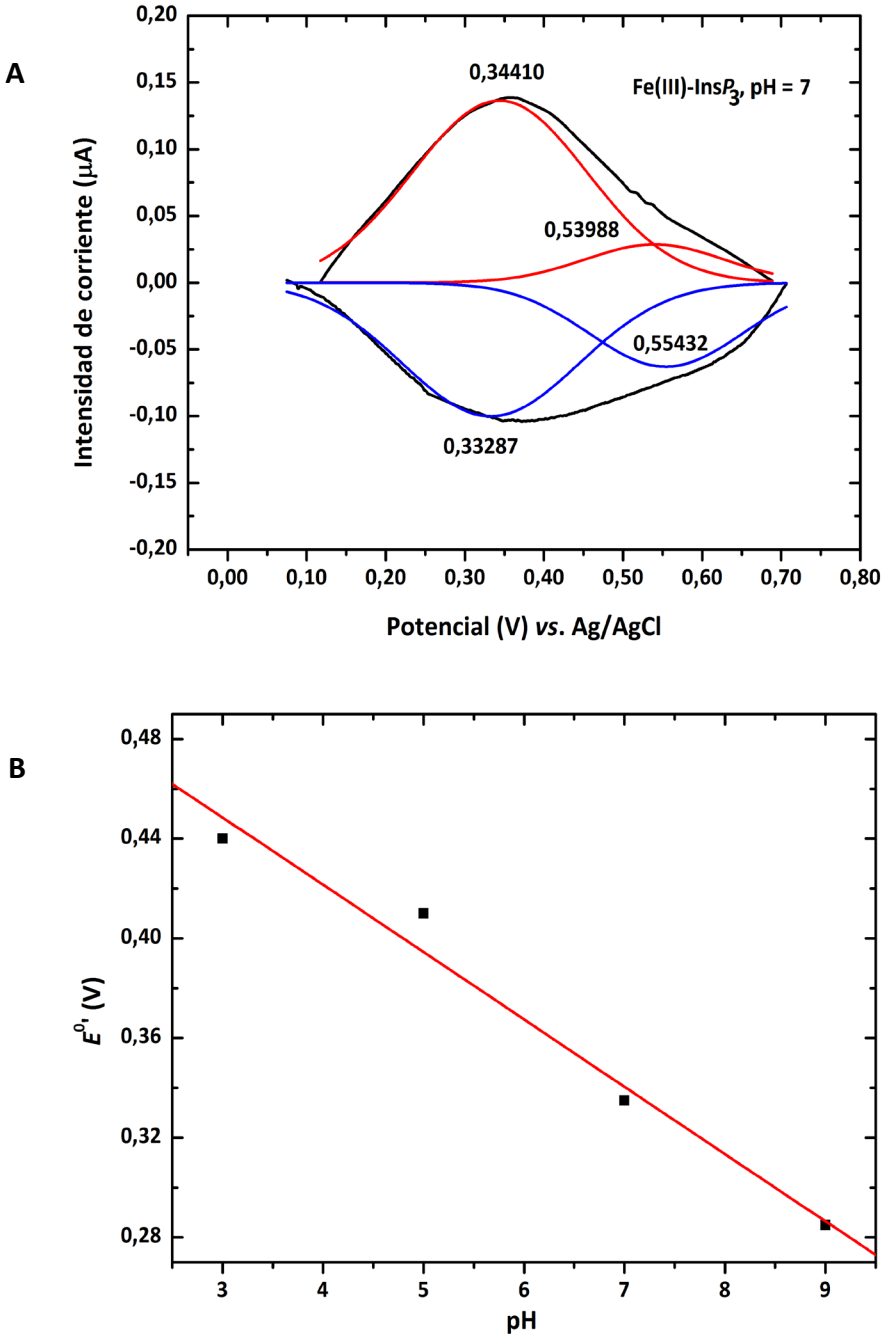


Figura 13.18. (A) Deconvolución gráfica del voltamperograma cíclico obtenido para el electrodo de Au-*pc* en solución 1 mM de Fe y 1 mM de Ins(1,2,3)P_3, en $NaClO_4$ 0,15 M (T = 25 °C, pH = 7, v = 0,020 V/s). (B) Variación con el pH del potencial formal $E^{0'}$ de la cupla Fe(III)/Fe(II) en presencia de Ins(1,2,3)P_3. La línea continua en (B) representa la regresión lineal de los puntos experimentales (R^2 = 0,97).

De acuerdo con estos resultados, incluso en las condiciones reductoras del interior de la célula, el hierro se encuentra completamente oxidado en presencia del Ins(1,2,3)P_3. De aquí en más, por tanto, se centrará el estudio en el estado +3 del metal. Asimismo, dadas las características de donor débil que posee el Ins(1,2,3)P_3, los análisis se acotarán a los complejos con configuración electrónica de alto espín.

3.4.3. Análisis de los equilibrios de complejación por RMN de ^{31}P

Los espectros de RMN de ^{31}P para este sistema se muestran en la figura 13.19A. Al igual que en presencia de K^+ y Mg^{2+}, la simetría molecular da lugar a la aparición de dos señales con patrón de integración 2:1, las cuales se desplazan hacia campos mayores con el aumento de pH. La adición de cantidades equimolares de hierro(III) produce un corrimiento químico adicional debido a la complejación. Como se desprende de la figura 13.19A, P1/3 y P2 solapan sus señales hasta pH cercano a 6,5, para luego separarse y dar lugar a dos bandas intensas y bien diferenciadas. Esto tiene relación con un cambio en el entorno de coordinación y esquema de protonación entre las especies complejas a un lado y otro de este límite.

Este fenómeno se observa más claramente en la figura 13.19B, donde se grafican las curvas de desplazamiento químico en función del pH en presencia y ausencia de Fe(III). Si se comparan las curvas con las correspondientes al ligando, se advierte que la alteración de las señales provocada por la complejación es mínima. Esto es debido a que los fenómenos de complejación y deprotonación actúan de forma contrapuesta sobre el valor de δ. En términos generales, la asociación ligando-metal se mantiene en todo el rango de estudio, desde pH = 2,5 hasta pH = 9,6. Más allá del paramagnetismo del ion metálico, la resolución de las señales en el RMN fue en todos los casos muy buena, permitiendo el tratamiento adecuado de los datos experimentales. A pesar de esto, en el pasado esta técnica había sido evitada por presentar problemas derivados del aumento en la velocidad de relajación nuclear causado por el ion Fe^{3+} [1], desvirtuando en muchos casos las conclusiones obtenidas.

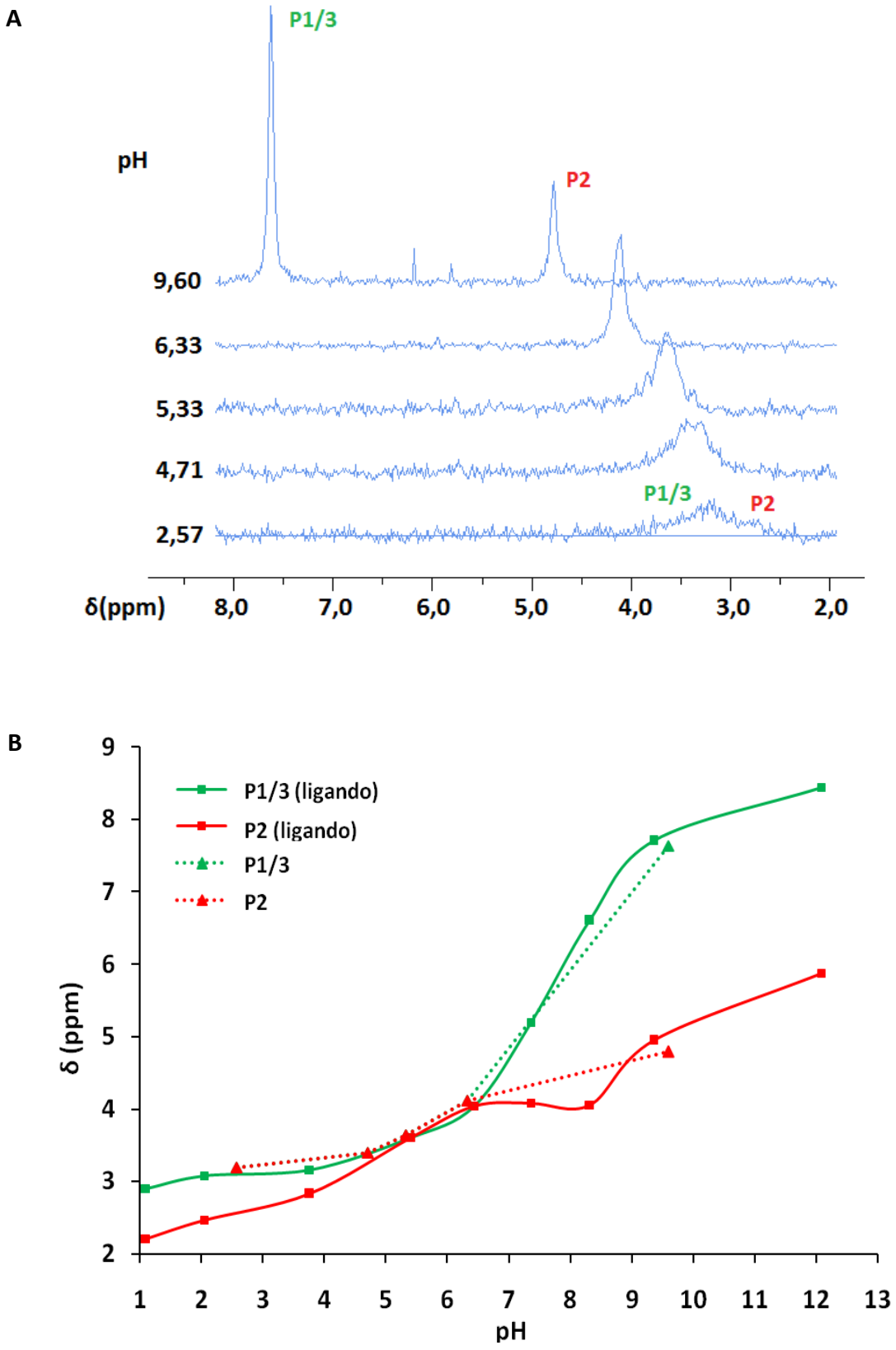


Figura 13.19. Espectros de RMN de ^{31}P para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} en función del pH a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M ([L] = 2,88 mM, [Fe^{3+}] = 3,16 mM). (B) Desplazamiento químico en función del pH en ausencia (líneas continuas) y presencia de Fe^{3+} (líneas discontinuas).

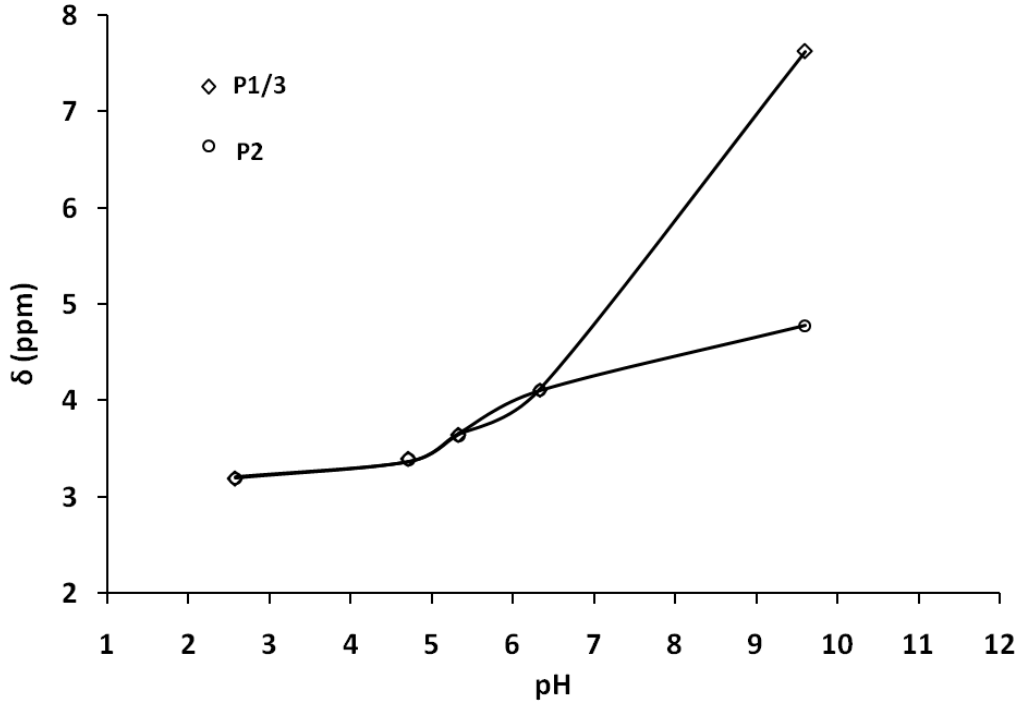


Figura 13.20. Desplazamiento químico en función del pH para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M. La curva continua corresponde al modelo teórico ajustado.

La tabla 13.9 muestra los logaritmos de las constantes de formación para los complejos detectados por RMN. Los valores son muy cercanos a aquellos obtenidos por el método potenciométrico, verificando el modelo de especies propuesto. Más aún, estas constantes de equilibrio reproducen de forma satisfactoria las curvas de δ en función del pH, como se muestra en la figura 13.20. Todas las especies detectadas poseen estequiometría 1:1 ligando:metal, difiriendo sólo en el grado de protonación del ligando. Los tres complejos exhiben gran estabilidad, debido a la alta carga que portan tanto el ion metálico como las especies del ligando involucradas.

Tabla 13.9. Logaritmo de las constantes de formación ajustadas para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

Equilibrio	log *K*	σ
$Fe^{3+} + L^{6-} \leftrightarrow [FeL]^{3-}$	19,04(8)	0,03
$Fe^{3+} + HL^{5-} \leftrightarrow [Fe(HL)]^{2-}$	15,14(8)	
$Fe^{3+} + L^{6-} + H_2O \leftrightarrow [FeL(OH)]^{4-} + H^+$	11,0(6)	

El diagrama de la figura 13.21A se construyó a partir de los datos de constantes de protonación ajustados por RMN (tabla 13.1), las constantes de formación de complejos con hierro(III) de la tabla 13.9 y las constantes de hidrólisis para las especies $[Fe(OH)]^{2+}$ y $[Fe(OH)_2]^{+}$ calculadas en esta tesis. En estas condiciones, el Ins(1,2,3)P_3 se predice completamente asociado al hierro(III), formando los complejos $[Fe(HL)]^{2-}$ por debajo de pH = 5, $[FeL]^{3-}$ para pH entre 5 y 8, y $[FeL(OH)]^{4-}$ por encima de pH = 8. Cuando se toma en cuenta el valor estimado de la constante de formación de la especie $Fe(OH)_3$ por el método de Liu y Millero ($\beta_{1\text{-}3}$ = -13,8)[15], el diagrama correspondiente relativo al ion metálico es el que se muestra en la figura 13.21B. Los resultados obtenidos son similares a los discutidos anteriormente. Se predice la unión prácticamente cuantitativa entre metal y ligando, mientras que los procesos de hidrólisis del metal (en leve exceso) se restringen a un bajo nivel hasta pH = 10. Por encima de este punto, el porcentaje de la especie $Fe(OH)_3$ se incrementa a casi el 100 % del Fe total.

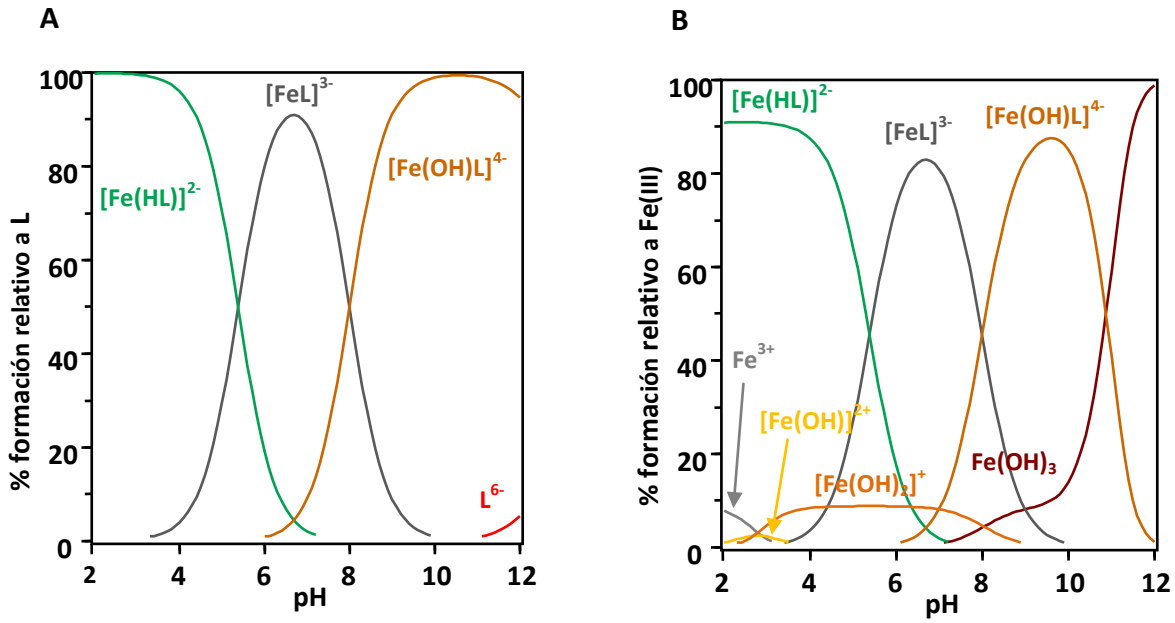


Figura 13.21. Diagramas de distribución de especies para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C ([L] = 2,88 mM, $[Fe^{3+}]$ = 3,16 mM). (A) Sin considerar la especie $Fe(OH)_3$. (B) Considerando la formación de la especie $Fe(OH)_3$.

Este secuestro eficiente del hierro(III), registrado en un amplio rango de pH, está de acuerdo con varios de los resultados experimentales expuestos hasta aquí. Por una parte, los desplazamientos químicos en los espectros de RMN

fueron ajustados de forma satisfactoria hasta pH = 9,6, dando constantes de equilibrio que concuerdan con aquellas ajustadas por potenciometría. Del mismo modo, la formación de la especie $Fe(OH)_3$ suele relacionarse con la precipitación del hidróxido férrico insoluble. A nivel experimental, sin embargo, no se observan signos de opalescencia, por lo menos hasta pH cercano a 10. Finalmente, los estudios por voltametría cíclica indican una asociación ligando-metal completa a valores de pH por encima de 7 y hasta 9.

3.4.4. Análisis conformacional de las especies Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+}

Con el objetivo de ampliar la investigación en los aspectos estructurales de la interacción Fe^{3+}-Ins(1,2,3)P_3, se realizaron cálculos DFT para ambos estados conformacionales de los dos complejos predominantes en condiciones citosólico nucleares (pH = 7,4) y vesiculares (pH 4,5 - 6,5): $[FeL]^{3-}$ y $[FeL(OH)]^{4-}$.

En el Anexo C se describe en detalle el procedimiento aplicado, así como los resultados obtenidos. Las geometrías más estables para ambas especies complejas se detallan en la figura 13.22. Los resultados muestran que el estado 1a5e de $[FeL]^{3-}$ es compatible con la presencia de dos moléculas de agua de coordinación. Cuando tres moléculas de agua se adicionan al sistema, la tercera se une al complejo por enlaces de hidrógeno (ver Anexo C). Por otra parte, el estado 5a1e de la misma especie presenta una molécula de agua en forma de un ion OH^-, mientras que los tres grupos fosfatos envuelven al centro metálico satisfaciendo el resto de las posiciones de coordinación. Cuando estas especies se deprotonan para dar lugar a las estructuras optimizadas de $[FeL(OH)]^{4-}$, en las geometrías iniciales utilizadas para los cálculos existe suficiente espacio para acomodar una molécula de agua adicional sólo en la conformación 5a1e. Esto es causado por el protón ecuatorial unido al átomo de carbono en posición 2, el cual apunta directamente hacia el ion metálico en el estado 1a5e, bloqueando una de las posiciones de coordinación. La adición de una molécula de agua a la conformación pentaaxial de la especie $[FeL(OH)]^{4-}$ da el mismo resultado que el descrito para el estado 1a5e del complejo $[FeL]^{3-}$: la molécula de solvente es excluida y se mantiene unida al ligando a través de enlaces de hidrógeno (ver Anexo C).

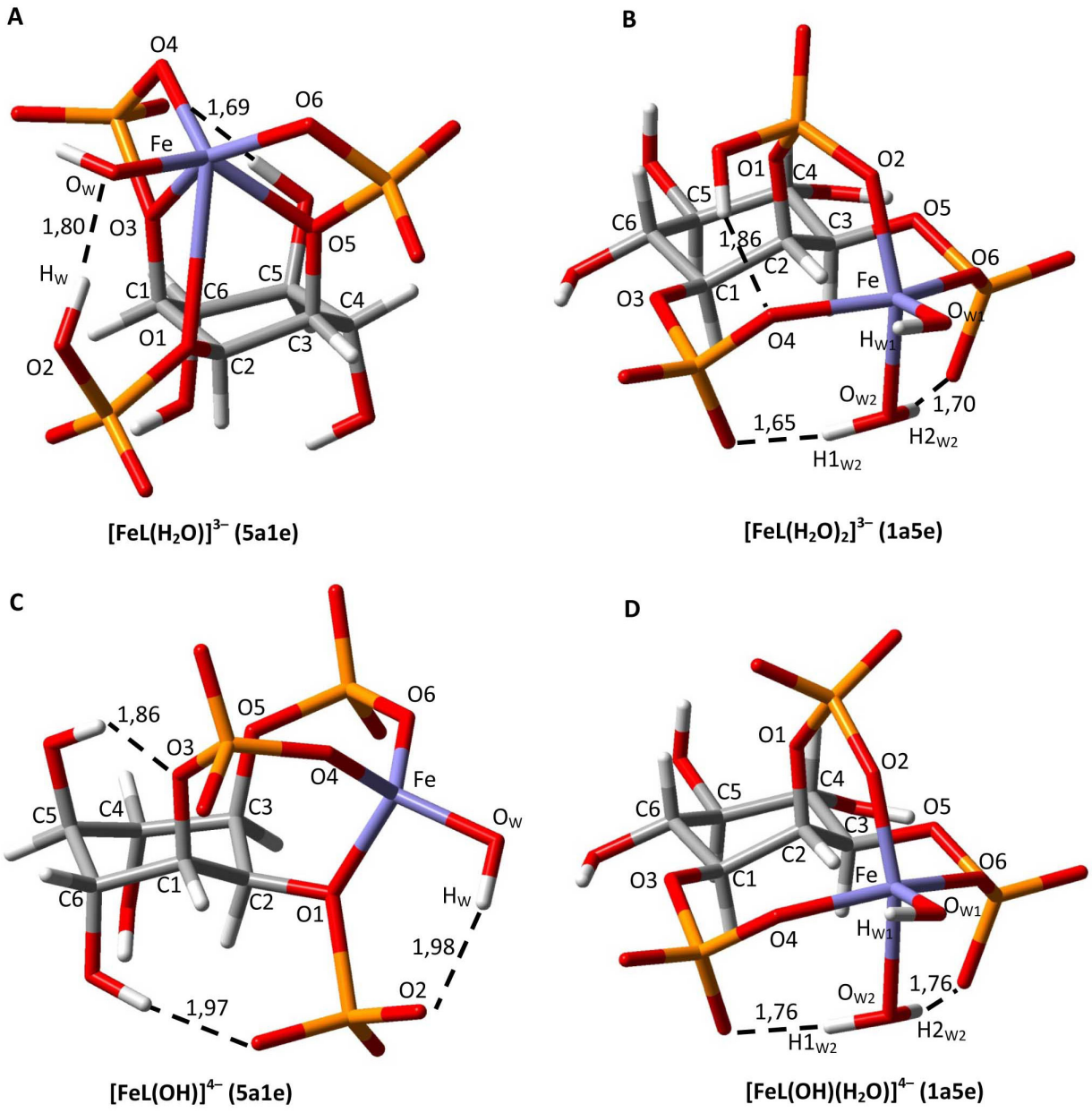


Figura 13.22. Geometrías UB3LYP/6-31+G* más estables para ambos estados conformacionales de las especies $[FeL]^{3-}$ (A y B) y $[Fe(OH)L]^{4-}$ (C y D).

En términos generales, ambas geometrías UB3LYP/6-31+G* del complejo $[FeL]^{3-}$ comparten una característica en común: la presencia de un grupo OH^- unido directamente al centro metálico (figura 13.22A y B). De esta manera, la especie $[FeL]^{3-}$ sería mejor representada por la fórmula $[Fe(OH)(HL)]^{3-}$. Asimismo, ambos estados conformacionales del complejo $[FeL(OH)]^{4-}$ muestran al Ins*P* completamente deprotonado y la presencia de un anión hidróxido como ligando (figura 13.22C y D). Todas estas estructuras dan cuenta de un aspecto

que vale la pena mencionar. En el proceso de deprotonación de $[FeL]^{3-}$ para dar lugar a $[FeL(OH)]^{4-}$, se produce una alteración estructural significativa sólo para el estado 5a1e. En esta conformación, el grupo P2, que se encuentra menos involucrado en el enlace al metal, se acerca al mismo al deprotonarse el ligando. La distancia Fe-O1 varía en este proceso desde 2,9 a 2,0 Å (ver figuras 13.22A y C). Esto se encuentra en línea con el desdoblamiento de las señales en el RMN para P1/3 y P2 por encima de pH = 6,5, donde el ligando se deprotona y el complejo $[FeL(OH)]^{4-}$ comienza a ser predominante.

Tabla 13.10. Desplazamientos químicos individuales y valores de $\Delta\delta_{prot}$ y $\Delta\delta_{comp}$ para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+} a 37,0 ˚C en NMe_4Cl 0,15 M.

	Desplazamientos químicos individuales (ppm)		$\Delta\delta_{prot}$(ppm)		$\Delta\delta_{compl}$ (ppm)	
Especies	P1/3	P2	P1/3	P2	P1/3	P2
$[FeL(OH)]^{4-}$	7,717	4,799	---	---	-0,735	-1,061
$[FeL]^{3-}$	4,136	4,190	-3,581	-0,609	-2,640	0,334
$[Fe(HL)]^{2-}$	3,206	3,196	-0,930	-0,994	-0,640	-0,974

Este fenómeno también encuentra correlato en los desplazamientos químicos individuales para las especies detectadas, los que se resumen en la tabla 13.10, junto con su variación con los procesos de protonación ($\Delta\delta_{prot}$) y complejación ($\Delta\delta_{compl}$). Los valores de $\Delta\delta_{compl}$ para $[FeL]^{3-}$ marcan que el grupo P1/3 se encuentra más involucrado que P2 en el proceso de complejación del hierro, lo que es consistente sólo con la geometría optimizada para el estado 5a1e de esta especie (figura 13.22A). Es interesante notar el valor apenas positivo de $\Delta\delta_{compl}$ para P2. Esto se debe a que este parámetro fue calculado en base a los desplazamientos químicos de la especie HL^{5-} del ligando, en donde el fosfato en C2 compartía un protón con P1/3. Al unirse el metal, P2 se aleja de él, y continúa compartiendo un protón, pero esta vez con un grupo OH^- que actúa como ligando. En el proceso global, el entorno de P2 cambia poco, por lo que no es de extrañar que su señal se vea levemente afectada. Por otro lado, para el complejo $[FeL(OH)]^{4-}$ ocurre lo contrario, y es ahora P2 quien toma un rol

más activo dentro del esquema de coordinación, dando lugar a valores negativos y similares de $\Delta\delta_{compl}$ para P2 y P1/3. Esto es coherente con la geometría optimizada para el estado 5a1e (figura 13.22C), en donde el grupo P2 no sólo se ha acercado al ion metálico, sino que sigue compartiendo un protón por enlace de hidrógeno, lo que permite que su $\Delta\delta_{compl}$ sea levemente menor al de P1/3.

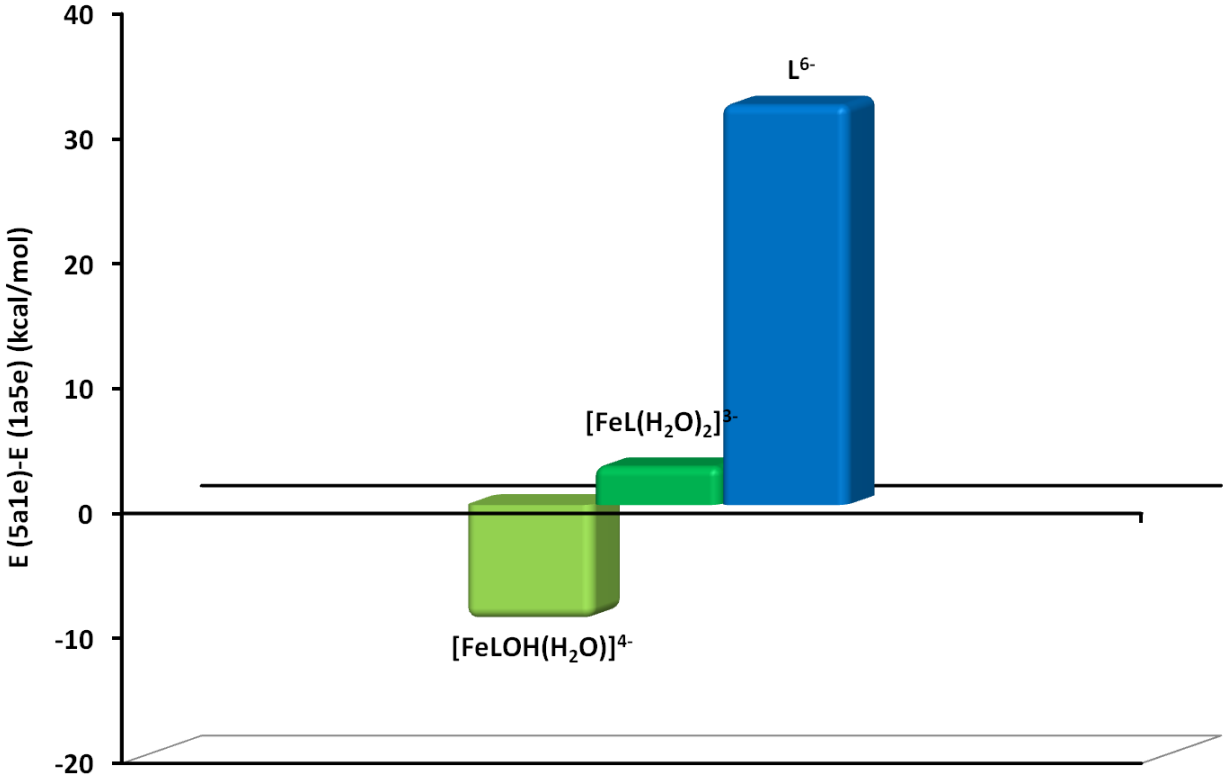


Figura 13.23. Diferencia de energía entre ambos estados conformacionales de los complejos $[FeL]^{3-}$ y $[FeL(OH)]^{4-}$. Se muestra además el valor obtenido para el mismo parámetro en ausencia de ion metálico (geometrías B3LYP/6-31+G*).

Toda esta evidencia se encuentra a favor del estado 5a1e como la forma predominante del ligando en los complejos. Estas observaciones experimentales pueden ser asimismo corroboradas desde un punto de vista termodinámico. En la figura 13.24 se grafican los valores de diferencia de energía para ambos estados conformacionales del ligando y los complejos $[FeL]^{3-}$ y $[FeL(OH)]^{4-}$, al nivel B3LYP/6-31+G*. Los detalles del cálculo

correspondiente se exponen en el Anexo C. Al igual que ocurría en presencia de magnesio y potasio, la coordinación metálica favorece de forma radical el estado 5a1e. En el caso del complejo predominante en condiciones citosólico-nucleares, el orden de energías de ambos confórmeros del ligando llega incluso a invertirse.A través de las geometrías optimizadas en este trabajo pueden determinarse los valores de Δ*G* para la transición conformacional de ambas especies complejas (Anexo C). Los resultados son los siguientes:

$$(1a5e)\ [FeL]^{3-} \rightarrow (5a1e)\ [FeL]^{3-} \qquad \Delta G = 1{,}73 \text{ kcal/mol}$$

$$(1a5e)\ [FeL(OH)]^{4-} \rightarrow (5a1e)\ [FeL(OH)]^{4-} \qquad \Delta G = -9{,}41 \text{ kcal/mol}$$

Si se comparan ambos valores con el correspondiente al proceso en ausencia de metal, 33,63 kcal/mol, queda claro que la unión del catión provoca el establecimiento de un equilibrio conformacional o una inversión de la estabilidad termodinámica de los confórmeros del ligando. Esto explica el hecho, comprobado experimentalmente a través de una sonda fluorescente, de que el Ins(1,2,3)P_3 sufre un cambio conformacional muy marcado en presencia de hierro [9,16]. En vista de lo expuesto, de aquí en adelante el estudio se enfocará sólo en la conformación 5a1e de los complejos Ins(1,2,3)P_3-Fe(III).

3.4.5. Especies $[FeL]^{3-}$ y $[FeL(OH)]^{4-}$: estructuras propuestas

El cambio en los desplazamientos químicos debidos únicamente a procesos de protonación, $\Delta\delta_{prot}$, para el complejo $[FeL]^{3-}$ es negativo y bastante menor para el grupo P1/3. Este comportamiento puede ser explicado por el cambio estructural que sufre la especie en el proceso $[FeL(OH)]^{4-} \rightarrow [FeL]^{3-}$, donde, de acuerdo con las estructuras propuestas, no sólo se protona el grupo P2 alejándose del hierro, sino que además el poliedro de coordinación cambia, de forma que P1/3 captura al metal y ocupa cuatro de sus seis posiciones de coordinación. El siguiente protón en ingresar se comparte fuertemente entre P1/3 y P2, lo cual da cuenta del hecho de que ambos $\Delta\delta_{prot}$ sean negativos y muy similares entre sí.

Como se comentó en la sección anterior, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ de $[FeL]^{3-}$ se encuentran en línea con la estructura propuesta (figura 13.22A), en donde el grupo P1/3 toma parte activa en la complejación metálica. La presencia de un ion OH^- coordinado, que impide al fosfato en C2 unirse al Fe(III) de forma efectiva, provoca que las distancias metal-P1/3 se reduzcan (Fe-O4/O6: 1,9 Å; Fe-O3/O5: 2,1 Å; Fe-O1: 2,9 Å). Lo mismo ocurre a nivel de las distancias fósforo-metal (P1/3-Fe: 2,8 Å; P2-Fe: 4,3 Å).

Las geometrías para las especies más estables del complejo $[FeL(OH)]^{4-}$ (figuras 13.22C y D) muestran al fosfato en C2 participando de la coordinación de manera más efectiva, mientras que el grupo OH^- interactúa con P2 mediante el enlace de hidrógeno $(O_w)H_w$-O2. De acuerdo con esto, el $\Delta\delta_{compl}$ ajustado es ligeramente menor para P2 que para P1/3. Finalmente, los valores de $\Delta\delta_{compl}$ para la especie $[Fe(HL)]^{2-}$ indican un patrón de coordinación en donde ambos grupos fosfatos P1/3 y P2 juegan un rol trascendente. No obstante, P2 aparece en este caso más afectado por la asociación al metal.

3.4.6. Labilidad de las posiciones de coordinación

La propuesta realizada por E. Graf y su grupo[6], de que la inhibición de la formación de radicales $OH^{\cdot}$ se debe exclusivamente a la ocupación de todos los sitios de coordinación sobre el ion hierro(III), proviene de experimentos de desplazamiento realizados con el ligando azida (N_3^-). En ese reporte se establece una relación entre la presencia de sitios de coordinación sustituibles del hierro y la habilidad de un quelato del mismo de inhibir la producción de radicales libres. Sin embargo, dado los resultados de las secciones anteriores, en esta tesis se propone una variante estructural de la esfera de coordinación que no se ha tenido en cuenta anteriormente: la presencia de iones OH^- unidos al metal central. Si estas posiciones resultan no sustituibles, entonces el modelo será compatible con los resultados obtenidos de los experimentos de desplazamiento, de acuerdo con los modelos computacionales presentados en este capítulo.

La estrategia de trabajo se basó en sustituir el grupo hidroxilo por un anión azida a partir de las geometrías optimizadas para los complejos $[FeL]^{3-}$ y

$[FeL(OH)]^{4-}$ (figuras 13.22A y C), para luego refinar las estructuras al nivel UB3LYP/6-31+G*. A partir de aquí, se computaron las energías libres para cada especie y, con ellas, los valores de Δ*G* para los procesos de sustitución de ligando:

$$[Fe(HL)(OH)]^{3-} + N_3^- \rightarrow [Fe(HL)(N_3)]^{3-} + OH^- \qquad \Delta G = 33{,}9 \text{ kcal/mol}$$

$$[FeL(OH)]^{4-} + N_3^- \rightarrow [FeL(N_3)]^{4-} + OH^- \qquad \Delta G = 36{,}7 \text{ kcal/mol}$$

Ambos procesos son ciertamente no espontáneos, lo que confirma la muy baja capacidad de sustitución de los grupos OH^- unidos al hierro en ambos complejos. Es factible que en los experimentos de desplazamiento de ligandos por azida, estos grupos OH^- permanezcan asociados al metal, por lo que el poliedro de coordinación se mantiene intacto en el proceso.

La pregunta que se deriva de forma inmediata es cuál es la causa de estos grandes valores de Δ*G*. Las estructuras optimizadas de los complejos con azida se muestran en la figura 13.24A y B. Éstas sugieren que la sustitución del grupo OH^- por N_3^- induce una alteración significativa en la naturaleza de la esfera de coordinación del ion central. En este proceso, el fosfato P2 se aparta sustancialmente del metal, dando lugar a una estructura pentacoordinada. En vista de las características topológicas del potencial electrostático molecular para ambos complejos (figuras 13.24C y D), parece evidente que el anión azida se une a la especie directamente por la zona más negativa, correspondiente a la "cavidad aniónica" que atrae al catión Fe^{3+} en los complejos. Esto genera una repulsión electrostática y estérica muy importante entre los grupos cargados, que deforma el entorno de coordinación y aparta al fosfato en C2 de su posición cercana al metal. De hecho, para el complejo $[FeL(OH)]^{4-}$, los valores de potencial electrostático molecular cercanos al átomo N1 varían entre -0,37 y -0,39 V, mientras que sobre los átomos de oxígeno vecinos lo hace en el rango -0,40 V – -0,44 V. La intensidad de este fenómeno es lo suficientemente grande en $[FeL]^{3-}$ como para evitar que el grupo P2 establezca un enlace de hidrógeno del tipo $O2\text{-}H_w...N_3^-$.

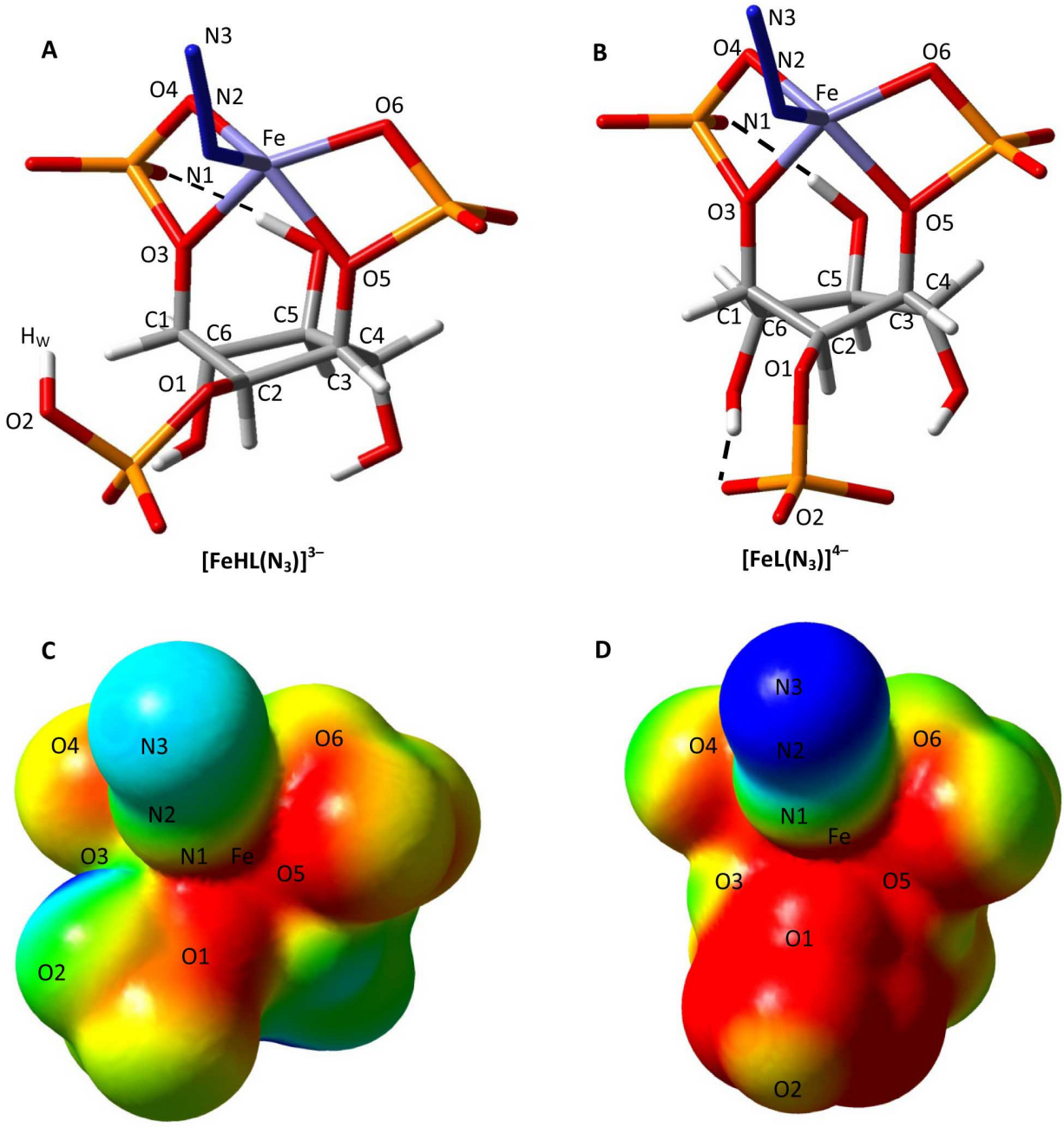


Figura 13.24. Geometrías UB3LYP/6-31+G* para las especies $[FeHL(N_3)]^{3-}$ (A) y $[FeL(N_3)]^{4-}$ (B). Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se muestran en líneas discontinuas. En (C) y (D) se representa el potencial electrostático molecular de (A) y (B) sobre una superficie de isodensidad (0,0004 e).

En conclusión, desde un punto de vista energético, dos factores principales parecen explicar la no espontaneidad de las reacciones de intercambio de OH^- por el ion azida en los complejos Ins(1,2,3)P_3-Fe(III). En primer término, la

deformación geométrica impuesta por la repulsión electrostática entre el anión N_3^- y los grupos fosfato del inositol fosfato. En contraste con lo que ocurre para el grupo OH en las especies complejas, el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre el sustituyente N_3^- y los grupos ionizables del ligando no puede compensar la gran repulsión existente, dando lugar a una distorsión importante del poliedro de coordinación. En segundo lugar, el ion azida es un ligando más voluminoso que el anión OH^-, por lo que su asociación al Ins*P* debe lidiar con la gran repulsión estérica que desfavorece la formación de especies estables N_3^--Fe^{3+}-Ins(1,2,3)P_3.

4. Conclusiones

Se plantearon en este capítulo los resultados de los estudios de RMN de ^{31}P, voltametría cíclica y modelado molecular de los sistemas Ins(1,2,3)P_3-K^+/Mg^{2+}/ Fe^{3+}, en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y temperatura, y en un medio no interactuante.

Los espectros de RMN muestran en todos los casos un total de dos señales, las que integran en un patrón 2:1, asociadas a los grupos ionizables P1/3 y P2. Con un incremento del pH, en todos los casos las bandas se desplazan hacia campos menores. La complejidad del movimiento de las señales y la ausencia de mesetas claras en las curvas de δ *vs.* pH sugiere la coexistencia de varias especies con un esquema cooperativo de unión M^{n+}-H^+-ligando.

Fue posible la caracterización termodinámica del proceso de protonación del Ins(1,2,3)P_3. Las primeras cuatro constantes de protonación del anión L^{6-} pudieron ser determinadas de forma precisa y los valores obtenidos son muy similares a los derivados del análisis potenciométrico. Se determinó asimismo el orden en el cual los grupos ionizables se protonan, mediante el análisis de los valores de $\Delta\delta_{prot}$, los resultados del modelado teórico de las especies presentes y la caracterización de los microequilibrios de protonación por el método de expansión de clúster. En todas las especies protonadas, la proximidad de los grupos P2 y P1/3 permite la compartición de estos protones de manera significativa, causando la formación de fuertes enlaces de hidrógeno

intramoleculares y provocando que el Ins(1,2,3)P_3 posea constantes de protonación más altas que la mayoría de sus isómeros trisfosfato.

La información energética que brinda el estudio computacional del proceso de protonación marca que, en fase gaseosa y en solución, la conformación preferida para las especies L^{6-}, HL^{5-}, H_2L^{4-} y H_3L^{3-} es la 1a5e. Se predice un posible cambio conformacional operativo a valores de pH muy bajos, donde predomina la especie completamente protonada del ligando H_6L. Una revisión de los resultados permitió racionalizar el origen de esta tendencia. En los estadíos tempranos del proceso de protonación, la configuración 1a5e es más adecuada para acomodar los grupos $-OPO_3^{n-}$, aniónicos y voluminosos, y para el establecimiento de fuertes enlaces de hidrógeno OH-grupos fosfato. A partir de H_2L^{4-}, la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno intramoleculares varía de forma continua, decreciendo para la conformación 5a1e y aumentando para la 1a5e a medida que el ligando se protona. Este fenómeno provoca un acercamiento progresivo de las energías de ambas conformaciones a medida que aumenta el grado de protonación, permitiendo un equilibrio conformacional para las formas más protonadas del ligando (H_5L^- y H_6L).

En presencia de exceso de catión potasio, se realizó el ajuste de los datos espectroscópicos por RMN de ^{31}P. Los resultados, similares a los derivados del análisis potenciométrico del sistema, indican que la mayoría de los complejos detectados poseen estequiometrías del tipo 1:1, con la excepción de la especie dinuclear $[K_2(H_4L)]$, formada por debajo de pH = 4. Las constantes de equilibrio ajustadas no son demasiado grandes en términos absolutos, aunque son excepcionalmente altas para complejos derivados de un ion alcalino.

El análisis de los valores Δδ evidencia que el fosfato en posición 2 posee un rol significativo en el patrón de coordinación ligando-metal para los complejos 1:1. La afinidad de los iones metálicos por las moléculas de agua es bastante baja en este caso. Por otra parte, en el complejo neutro dinuclear $[K_2(H_4L)]$, el ligando se encuentra en un alto grado de protonación, por lo que los grupos fosfato se ven menos involucrados en la unión del metal. El poliedro de coordinación cambia y las aguas de coordinación están en este caso unidas directamente a los centros metálicos. La conformación adoptada por los complejos sería la pentaecuatorial, ya que para este sistema en particular, la

acumulación de carga negativa entre los grupos fosfato de la conformación 5a1e no llega a contrarrestar las amplias ventajas que brinda al ligando la conformación 1a5e.

Se caracterizó termodinámicamente la interacción Ins(1,2,3)P_3-Mg^{2+}. Las constantes de equilibrio obtenidas señalan la formación de dos especies de estequiometría 1:1 metal:ligando estables y altamente cargadas, y una especie polinuclear neutra, en total acuerdo con el análisis potenciométrico. En las especies 1:1, el ion magnesio se dispone en las cavidades formadas por las zonas más negativas del potencial electrostático molecular, mientras que algunas moléculas de agua unidas al ion central pueden encontrarse deprotonadas. Por el contrario, la disposición de los tres centros metálicos en el complejo $[Mg_3L]$ es estratégica, dando lugar a un esquema cooperativo de unión que permite disminuir la repulsión interfosfato e intermagnésica, mientras que se optimizan las distancias de enlace y las geometrías del poliedro de coordinación. La complejación favorece a la conformación 5a1e del ligando. De todas formas, para la especie $[MgL]^{4-}$ la configuración pentaecuatorial sigue siendo la preferida desde el punto de vista energético, ya que no sólo da lugar a una geometría muy poco deformada del ligando, sino que además establece enlaces de hidrógeno mucho más fuertes que en el caso de la conformación 5a1e. Para el complejo $[Mg_3L]$, la coordinación en fase gaseosa produce una inversión muy marcada en la estabilidad relativa de las conformaciones del ligando. La ausencia de carga negativa sobre los grupos fosfato permite la unión al metal de las moléculas de agua del medio, alterado de forma sustancial la estructura como un todo. Como consecuencia, es posible que en el seno de la solución ambos confórmeros posean estabilidades muy similares. Por su parte, la especie restante, $[Mg(HL)]^{3-}$, está relacionada con valores de $\Delta\delta_{compl}$ y $\Delta\delta_{prot}$ muy negativos, además de con un aumento en el ancho de las señales y el ruido espectral. Se propone, por tanto, un posible cambio en la conformación del ligando, gatillado por la protonación de $[MgL]^{4-}$.

Los estudios voltamperométricos del sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe(II)/Fe(III) permitieron caracterizar termodinámicamente, por primera vez, la habilidad del Ins(1,2,3)P_3 de inhibir la reducción del hierro(III) en medio fisiológico. La información obtenida permite afirmar que la intervención de los complejos

Ins(1,2,3)P_3-Fe en los ciclos redox citotóxicos no es plausible, haciendo del ligando un potencial quelante "seguro" de hierro lábil intracelular.

El ajuste de las curvas de δ *vs*. pH para el sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) dio como resultados los logaritmos de las constantes de formación para los complejos detectados por RMN. Los valores son muy cercanos a aquellos obtenidos por el método potenciométrico, detectándose especies muy estables de estequiometría 1:1 ligando:metal, las que difirieren sólo en el grado de protonación del ligando. El Ins(1,2,3)P_3 se predice completamente asociado al hierro(III), formando los complejos $[Fe(HL)]^{2-}$ por debajo de pH = 5, $[FeL]^{3-}$ para pH entre 5 y 8, y $[FeL(OH)]^{4-}$ por encima de pH = 8.

Los resultados espectroscópicos y teóricos permitieron obtener información estructural de los complejos relevantes en las condiciones de algunos de los compartimentos intracelulares. En términos generales, toda la evidencia planteada se encuentra a favor del estado 5a1e como la conformación predominante del ligando en los complejos. Además, las geometrías resultantes comparten una característica en común: la presencia de un grupo OH^- unido directamente al centro metálico. Este tipo de ligando resultó no sustituible en experimentos computacionales de desplazamiento por el anión azida. Desde un punto de vista energético, dos factores principales parecen explicar este fenómeno: la repulsión electrostática y estérica entre el anión voluminoso N_3^- y los grupos ionizables del inositol fosfato.

5. Referencias bibliográficas

1. Dozol, H.; Blum-Held, C.; Guedat, P.; Maechling, C.; Lanners, S.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Journal of Molecular Structure* **2002,** *643*, 171-181.
2. Spiers, I. D.; Barker, C. J.; Chung, S. K.; Chang, Y. T.; Freeman, S.; Gardiner, J. M.; Hirst, P. H.; Lambert, P. A.; Michell, R. H.; Poyner, D. R.; Schwalbe, C. H.; Smith, A. W.; Solomons, K. R. H. *Carbohydrate Research* **1996,** *282*, 81-99.
3. Spiers, I. D.; Freeman, S.; Poyner, D. R.; Schwalbe, C. H. *Tetrahedron Letters* **1995,** *36*, 2125-2128.
4. Graf, E.; Empson, K. L.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1987,** *262*, 11647-11650.
5. Hawkins, P. T.; Poyner, D. R.; Jackson, T. R.; Letcher, A. J.; Lander, D. A.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1993,** *294*, 929-934.
6. Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1984,** *259*, 3620-3624.
7. Spiers, I. D.; Freeman, S.; Schwalbe, C. H. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications* **1995,** 2219-2220.
8. Barrientos, L. G.; Murthy, P. P. N. *Carbohydrate Research* **1996,** *296*, 39-54.

9. Mansell, D.; Rattray, N.; Etchells, L. L.; Schwalbe, C. H.; Blake, A. J.; Bichenkova, E. V.; Bryce, R. A.; Barker, C. J.; Díaz, A.; Kremer, C.; Freeman, S. *Chemical Communications* **2008,** 5161-5163.
10. Mansell, D.; Veiga, N.; Torres, J.; Etchells, L. L.; Bryce, R.; Kremer, C.; Freeman, S. *Tetrahedron* **2010,** *66*, 8949-8957.
11. Phillippy, B. Q.; Graf, E. *Free Radical Biology and Medicine* **1997,** *22*, 939-946.
12. Borkovec, M.; Koper, G. J. M. *Analytical Chemistry* **2000,** *72*, 3272-3279.
13. Bebot-Brigaud, A.; Dange, G.; Fauconnier, N.; Gérard, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999,** *75*, 71-78.
14. Merkofer, M.; Kissner, R.; Hider, R. C.; Brunk, U. T.; Koppenol, W. H. *Chemical Research in Toxicology* **2006,** *19*, 1263-1269.
15. Liu, X.; Millero, F. J. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1999,** *63*, 3487-3497.
16. Mansell, D.; Rattray, N.; Etchells, L. L.; Schwalbe, C. H.; Blake, A. J.; Torres, J.; Kremer, C.; Bichenkova, E. V.; Barker, C. J.; Freeman, S. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2010,** *8*, 2850-2858.

Sección IV

Aplicaciones biológicas y nutricionales

Capítulo 14

Estudio comparativo en sistemas biológicos

Se expone en este capítulo un análisis comparativo del comportamiento químico de los tres inositol fosfatos estudiados en condiciones que simulan distintos sistemas biológicos, y su aplicación en la racionalización de sus probables funciones biológicas. Se comienza con un estudio comparativo de la capacidad quelante del InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3. A continuación, se exhiben las características más sobresalientes de la especiación química de cada InsP en condiciones asociadas a varios sistemas biológicos, como compartimentos intra y extracelulares de distintos tipos de organismos. De forma adicional y continuando con el trabajo comenzado previo a esta tesis para el fitato, se presenta una guía práctica para la experimentación con Ins(1,3,4,5,6)P_5, mediante el establecimiento de una serie de pautas que permiten mantener los ensayos con esta molécula en condiciones fisiológicas razonables. Para finalizar, se presentan los resultados del estudio de docking de los sistemas InsP-Fe(III)-siderocalina, como paso hacia la racionalización de los determinantes fisicoquímicos de la interacción proteína-inositol fosfato.

1. Introducción

A lo largo de este trabajo de tesis se han presentado y discutido los resultados de la caracterización termodinámica de los equilibrios que se establecen entre el InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 o Ins(1,2,3)P_3, en ausencia y en presencia de diversos cationes metálicos, tanto mono como multivalentes. Al margen de las condiciones utilizadas para describir cada uno de estos resultados, desde un punto de vista práctico es mucho más útil modelar escenarios cuyas características fisicoquímicas se acerquen a aquellas correspondientes a sistemas de interés biológico y nutricional.

Esta idea es el objetivo principal de los capítulos 14 y 15, en donde se propone un análisis de la especiación química de los diversos inositol fosfatos, en las condiciones de los medios extracelular, de los compartimentos intracelulares de distintos organismos y de los ambientes del tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos hasta el momento no indican que exista un control cinético de las interacciones, por lo que el abordaje del problema será termodinámico, haciendo uso de las constantes de protonación, complejación y precipitación ajustadas en este trabajo. Se emplearán, dependiendo del tamaño y naturaleza del sistema en estudio, programas computacionales especializados, los que serán capaces de brindar una visión completa de las formas químicas detectadas. En todos los casos se considerará, como parte de las aproximaciones del modelo empleado, que las especies mixtas presentes son minoritarias, y que, de existir barreras cinéticas para los procesos de complejación y/o precipitación, las mismas son despreciables en la condiciones de trabajo.

2. Parte experimental

Como estructura de la siderocalina se utilizó la reportada para el complejo Fe(III)-Enterobactina-Siderocalina (PDB: 1L6M)[1]. Dado que la proteína está constituida por tres cadenas idénticas, se tomó en este caso la A. Se eliminaron, además del sustrato, las aguas de cristalización y otras moléculas pequeñas que aparecen asociadas al aducto. Existen sólo dos histidinas en la estructura proteica (His 118 y His 165), ambas fuera del sitio activo, por lo que no fue necesario el análisis de su estado de protonación. Se examinaron también los aminoácidos de cadena flexible. La Glu 57 y la Asn 96 aparecen con dos conformaciones posibles, ambas con un 50 % de probabilidad de ocurrencia. Se eliminó una de ellas en cada caso. Para definir el sitio activo, se estableció una esfera de 10 Å de radio centrada en el nitrógeno terminal de la Lys 134. Para realizar un estudio más real de la interacción del sustrato con la proteína, se permitió en el cálculo cierto grado de libertad para algunos aminoácidos del sitio activo. De los residuos que se han reportado que interactúan con el sustrato, sólo dos poseen cadenas flexibles: Lys 134 y Lys 125. Se eligieron 6 y 4 rotámeros respectivamente, de tal forma que las

posibilidades conformacionales no estén impedidas estéricamente. Para el resto de los aminoácidos que interaccionan con el sustrato (Tyr 106, Phe 123, Tyr 132) se eligieron 2 rotámeros en cada caso. Todos los rotámeros incluidos en el modelo pertenecen a la biblioteca del software utilizado.

Los datos estructurales de la Fitasa del *Aspergillus niger* se tomaron de la estructura cristalina reportada recientemente del complejo Fitasa-*myo*-inositolhexakissulfato (PDB: 3K4Q) [2]. Se seleccionó para trabajar en este caso la cadena proteica A. Se quitaron el sustrato, las aguas de cristalización y otras moléculas pequeñas unidas a la proteína. Para definir el sitio activo, se estableció una esfera de 12 Å de radio centrada en el nitrógeno terminal de la Arg 58. Existen sólo dos histidinas en el sitio activo (His 59 e His 338). Se ajustó su estado de protonación de acuerdo con los residuos aminoacídicos que las rodean y su función en el proceso catalítico: la His 59 posee un nitrógeno deprotonado hacia el sitio activo, mientras que la His 338 expone un protón hacia él. Se examinaron también los aminoácidos de cadena flexible. La Arg 49 y la Asn 36 aparecen con dos conformaciones posibles, ambas con un 50 % de probabilidad de ocurrencia. Se eliminó una de ellas en cada caso. Se permitió asimismo la existencia de ciertos estados conformacionales para algunos aminoácidos del sitio activo, de forma que las posibilidades no estén impedidas estéricamente. Se eligieron 4 rotámeros para la Lys 68, 3 rotámeros para Arg 58, His 59, Thr 65, Arg 142, Asp 188, Lys 278 e His 338, y dos rotámeros para la Arg 62.

Las geometrías de los ligandos y complejos a estudiar han sido optimizadas a través de métodos de mecánica molecular (campo de fuerza MM+) o, en los casos con mayor grado de libertad, PM3 (Enterobactina), RHF/3-21+G* (inositol fosfatos), UB3LYP/6-31+G* (complejos Ins(1,2,3)P_3-Fe(III)). Se utilizó el programa GOLD (v4.1.2) para realizar los cálculos de *docking*[3]. Se realizaron 20 cálculos para los sistemas con estructura cristalina conocida (Enterobactina y Catecol) y 40 para los restantes, estableciendo 5 islas y 100000 operaciones genéticas de mutación, entrecruzamiento y migración sobre ellas. Se empleó la función de evaluación *Goldscore*, haciendo un *rescore* de los resultados obtenidos con la función *Chemscore*. Se hizo uso de la facilidad de detección de enlaces de hidrógeno que provee el programa GOLD sólo en aquellos sistemas

involucrando inositol fosfatos, donde estas interacciones modulan en gran medida el estado conformacional de las especies. Se analizaron *a posteriori* los resultados, y se eligieron las mejores soluciones para cada sistema en base al parámetro de ajuste *Goldscore*, el RMSD (*root mean square deviation*, correspondiente a la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las diferencias entre valores teóricos y experimentales) de los *clusters* obtenidos, las interacciones específicas sustrato-proteína y el Δ*G* de unión estimado por la función *Chemscore*. Para el trabajo de tratamiento previo del sistema y la interpretación de los resultados se empleó el programa Discovery Studio Visualizer [4].

Para la validación de la metodología teórica (Anexo D), se hizo uso de las estructuras cristalinas de la Enterobactina, Fe(III)-Enterobactina y Fe(III)-Catecol unidos a la Siderocalina (PDB: 3K3L, 1L6M y 3FW4 respectivamente) [1,5,6].

3. Resultados y discusión

3.1. Capacidad quelante comparativa del InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3

Los resultados del estudio cuantitativo y sistemático de la interacción del fitato, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3 con varios iones metálicos permiten comparar el comportamiento de complejación de estos tres ligandos. Una evaluación comparativa directa no es sencilla, debido a que cada uno de estos Ins*P* da lugar a especies complejas cuyo grado de protonación y nuclearidad varían de forma significativa. De forma de facilitar el análisis, la capacidad quelante puede ser representada, en cada caso, en términos del cociente entre la concentración del ligando unido al ion metálico y la correspondiente al total de sus formas libres. Este parámetro, denominado aquí como Q, representa la fracción entre todas las especies complejas detectadas y todas las formas protonadas del ligando no asociadas al catión. Tomando como ejemplo los sistemas conteniendo el ion K^+, los complejos formados con cada inositol fosfato son: $[K_3(H_4L)]^{5-}$, $[K_4(H_3L)]^{5-}$, $[K_5(H_2L)]^{5-}$ y $[K_6L]^{6-}$ para el InsP_6, $[K_4L]^{6-}$, $[K_3(HL)]^{6-}$ y $[K_2(H_2L)]^{6-}$ para el Ins(1,3,4,5,6)P_5, y $[KL]^{5-}$, $[K(HL)]^{4-}$, $[K(H_2L)]^{3-}$ y $[K_2(H_4L)]$ para el Ins(1,2,3)P_3. De esta manera, los cocientes Q correspondientes

se calculan según las ecuaciones (1), (2) y (3) (se omiten los símbolos de concentración):

$$Q_{\mathrm{Ins}P_6} = \frac{([K_3(H_4L)]^{5-} + [K_4(H_3L)]^{5-} + [K_5(H_2L)]^{5-} + [K_6L]^{6-})}{(L^{12-} + HL^{11-} + H_2L^{10-} + H_3L^{9-} + H_4L^{8-} + H_5L^{7-} + H_6L^{6-} + H_7L^{5-} + H_8L^{4-} + H_9L^{3-})} \quad (1)$$

$$Q_{\mathrm{Ins}(1,3,4,5,6)P_5} = \frac{([K_4L]^{6-} + [K_3(HL)]^{6-} + [K_2(H_2L)]^{6-})}{(L^{10-} + HL^{9-} + H_2L^{8-} + H_3L^{7-} + H_4L^{6-} + H_5L^{5-} + H_6L^{4-} + H_7L^{3-})} \quad (2)$$

$$Q_{\mathrm{Ins}(1,2,3)P_3} = \frac{([KL]^{5-} + [K(HL)]^{4-} + [K(H_2L)]^{3-} + [K_2(H_4L)])}{(L^{6-} + HL^{5-} + H_2L^{4-} + H_3L^{3-} + H_4L^{2-})} \quad (3)$$

Los valores de log Q para los iones K^+, Mg^{2+} y Fe^{3+}, en función del pH y para soluciones 1 mM de catión y ligando, se muestran en la figura 14.1. Sus valores se incrementan sustancialmente con la carga de ion metálico (desde K^+ a Fe^{3+}), de acuerdo con una interacción metal-ligando de carácter esencialmente electrostático.

Con respecto al ion K^+, el Ins(1,2,3)*P*$_3$ exhibe la interacción más fuerte en todo el rango de pH analizado. Esto es posible debido a que en condiciones 1:1 metal:Ins*P*, las especies polimetálicas (formadas mayoritariamente por el Ins(1,3,4,5,6)*P*$_5$ e Ins*P*$_6$) son muy poco predominantes. En presencia de exceso de ion metálico (100:1 K^+:Ins*P*), el cual favorece la formación de complejos polinucleares, el escenario cambia, siendo el fitato el que presenta la interacción metal-ligando más fuerte (no se muestra).

De entre los Ins*P* considerados, el que se une más fuertemente al ion magnesio es el Ins*P*$_6$. Este fenómeno resulta evidente al considerar que este miembro posee la mayor carga negativa en todo el rango de pH abarcado. En las condiciones de la figura 14.1, el fitato forma con el ion Mg^{2+}, mayoritariamente, los complejos aniónicos 1:1 metal:ligando. No obstante, también se detecta en este sistema la especie neutra soluble $[Mg_5(H_2L)]$, la cual, en presencia de un exceso de ion metálico, incrementa su predominancia, provocando un

aumento de la capacidad secuestrante del fitato relativa al resto de los Ins*P* evaluados. Es de destacar que, es esas condiciones, la ocurrencia de procesos de precipitación hace complicado un análisis preciso del comportamiento químico de los distintos sistemas, análogo al detallado en la figura 14.1.

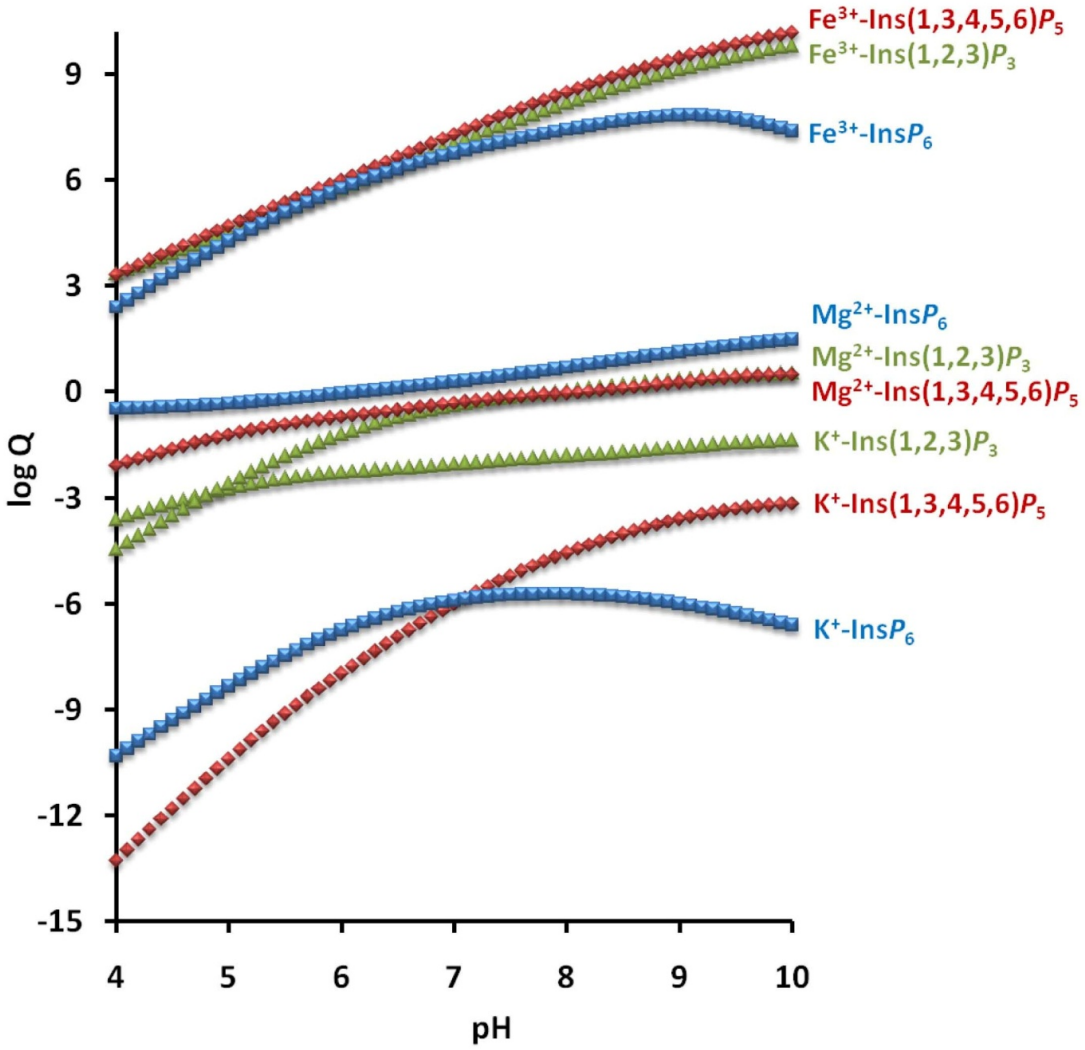


Figura 14.1. Comportamiento comparativo del Ins(1,2,3)P_3, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e InsP_6 en presencia de K^+, Mg^{2+} o Fe^{3+}. Se grafican en función del pH los logaritmos del cociente entre el ligando unido al metal y el ligando libre (log Q), en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C ([L] = [M] = 1 mM).

La interacción con el ion Fe^{3+} es muy fuerte para los tres inositol fosfatos. Los valores de log Q son bastante grandes y similares entre sí en el rango de pH 4 - 7, donde se incrementan desde 3 hasta 7. Por encima de pH neutro, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se convierte en el agente secuestrante de Fe^{3+} más efectivo

dentro de los ligandos considerados, especialmente en comparación con el fitato. Estos resultados son muy interesantes, ya que, a diferencia del Ins(1,2,3)P_3 y el InsP_6, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 carece del arreglo "123-trisfosfato", el cual se cree necesario y suficiente para una alta afinidad metal-Ins*P*. La evidencia que da soporte a esta idea se basa en ensayos en los cuales los diversos inositol fosfatos muestran distinta capacidad para inhibir la producción de radicales libres, catalizada por el ion Fe^{3+} a través de la reacción de Fenton. De todos los miembros testeados hasta el momento, sólo aquellos fosforilados en C1, C2 y C3 han resultado muy efectivos como agentes antioxidantes. Los resultados de esta tesis indican que la alta afinidad por el ion hierro(III) no requiere, estrictamente, del arreglo "123", y por tanto este fenómeno es independiente de la eficiencia con la que estos ligandos se desempeñan como agentes inhibidores de la producción de radicales $OH^{\cdot}$. En apariencia, los grupos fosfato ecuatoriales del Ins(1,3,4,5,6)P_5 permiten una unión metal-ligando de tal intensidad, que la capacidad secuestrante resultante es comparable con la determinada para el Ins(1,2,3)P_3 y el InsP_6. Sin embargo, en contraposición a estos dos Ins*P*, la naturaleza del entorno de coordinación en las especies complejas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 no impide al catión Fe^{3+} de participar en el ciclo de Haber Weiss.

3.2. InsP_6 en sistemas biológicos: interacción con Li^+

El comportamiento de protonación, complejación y precipitación del fitato en condiciones fisiológicas y en presencia de algunos de los iones más relevantes en sistemas biológicos (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, entre otros), ha sido reportado previamente[7,8]. No obstante, el uso de un electrolito soporte no interactuante ha permitido, en este trabajo de tesis, el análisis completo de la reactividad química que el InsP_6 exhibe frente a iones monovalentes, como Na^+, K^+ y Li^+.

Esta información resulta relevante en la evaluación de la especiación química de diversos medios asociados a diferentes sistemas biológicos. Por ejemplo, es posible estudiar la competencia entre el ion Li^+ y el ion Mg^{2+} por el InsP_6, en el contexto del uso farmacéutico del catión alcalino (tratamiento de los trastornos del humor). Aunque el mecanismo de acción del ion Li^+ no es del

todo conocido, se cree que es dependiente del desplazamiento del ion magnesio de sus sitios celulares [9]. En efecto, se ha observado que la exposición de algunas células al ion litio resulta en un incremento sustancial de la concentración de ion Mg^{2+}. Dentro de las posibilidades reportadas para estos sitios de unión del Mg^{2+}, las más relevantes incluyen sitios activos de enzimas que metabolizan algunos Ins*P* (presentadas en el capítulo 1) y moléculas pequeñas, como algunos nucleótidos [10-12].

De esta forma, tanto sea por la conexión Ins*P*-Li^+ en el marco del tratamiento de afecciones neurológicas, como por la posibilidad de que este ion monovalente desplace al Mg^{2+} de su complejo $[Mg_5(H_2L)]$ con el InsP_6 (forma predominante del ion divalente a nivel intracelular[7,8]), resulta muy interesante evaluar en detalle la especiación química del sistema Li^+-Mg^{2+}-fitato. Tomando como condiciones para el modelado aquellas que simulan el ambiente citosólico-nuclear[7,8] (pH = 7,4, *T* = 37,0 °C, [InsP_6] = 40 µM, [K^+] = 0,15 M y $[Mg^{2+}]_{libre}$ = 0,5 mM), las predicciones marcan que incluso a concentraciones de Li^+ tan altas como 5 mM (nivel que supera por amplio margen el límite intracelular máximo reportado para este catión[13,14] y las concentraciones intracelulares y en plasma determinadas en pacientes bipolares tratados con sales de litio[15]), no se detecta asociación fitato-litio. En conclusión, estos resultados sugieren que, *in vivo*, la interacción del ion Li^+ con el InsP_6 sería muy poco relevante.

3.3. Ins(1,3,4,5,6)P_5 en sistemas biológicos

3.3.1. Predicciones en condiciones citosólico-nucleares de células de mamíferos

El *pool* de Ins(1,3,4,5,6)P_5 que presentan las células de mamífero está localizado, según se cree, mayoritariamente en los compartimentos citosólico y/o nuclear[16]. Al menos en levaduras, este metabolito es capaz de difundir libremente entre el citosol y el núcleo; esto implica que al menos una porción significativa del ligando está en forma libre o formando parte de complejos de bajo peso molecular [17]. Por tanto, la información presentada en este trabajo respecto del comportamiento de complejación y protonación del

Ins(1,3,4,5,6)P_5, en conjunto con las concentraciones conocidas de los cationes mayoritarios a nivel citosólico-nuclear, pueden ser utilizadas para predecir las especies predominantes de este compuesto en las células.

Para los cálculos correspondientes se seleccionaron condiciones experimentales cercanas a las encontradas en el interior celular, específicamente en el núcleo y citosol: [Ins(1,3,4,5,6)P_5] = 50 µM, [K^+] = 0,15 M, T = 37,0 °C y pH = 7,4 [18-21]. Asimismo, se tomaron como concentraciones de magnesio libre valores incluidos en el intervalo de concentraciones intracelulares actualmente aceptado (0,25 mM - 1 mM)[22]. Los resultados se resumen en la tabla 14.1.

Tabla 14.1. Predicciones para el Ins(1,3,4,5,6)P_5 en condiciones citosólico-nucleares simuladas, en ausencia y presencia de Fe^{3+} [a].

$[Mg^{2+}]_{total}$ (µM)	350	600	1150	350	600	1150	350	600	1150
$[Fe^{3+}]$ (µM)	0	0	0	1	1	1	10	10	10
$[Mg^{2+}]_{libre}$ (µM)	332	557	1026	333	558	1028	336	565	1048
Ins(1,3,4,5,6)P_5 asociado a Mg^{2+} (%)	29	47	80	29	46	78	24	38	65
Ins(1,3,4,5,6)P_5 asociado a K^+ (%)	6	5	2	6	5	2	5	4	1
Ins(1,3,4,5,6)P_5 libre (%)	65	48	18	63	47	18	51	38	14
Ins(1,3,4,5,6)P_5 asociado a Fe^{3+} (%)	0	0	0	2	2	2	20	20	20
Fe^{3+} asociado a Ins(1,3,4,5,6)P_5 (%)	0	0	0	100	100	100	100	100	100

[a] Las condiciones son 50 µM de ligando, 0,15 M de ion K^+ y pH = 7,4. Los valores de $[Mg^{2+}]_{total}$ fueron seleccionados de modo de que $[Mg^{2+}]_{libre}$ se encuentre en diferentes puntos dentro del rango 0,25 - 1 mM, concentraciones entre las que se cree que este catión se halla en el citosol y núcleo de las células de mamíferos.

En estas condiciones el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se espera asociado parcialmente al ion Mg^{2+}; el resto del ligando permanece en su mayoría en forma libre. Una pequeña fracción, no obstante, se predice unida al catión K^+, abundante en el medio intracelular. Las especies complejas predominantes son el complejo neutro polinuclear $[Mg_4(H_2L)]$ y el complejo 1:1 triprotonado $[Mg(H_3L)]^{5-}$, mientras que las formas libres presentes resultan ser altamente cargadas: H_4L^{6-}

y H_3L^{7-}. Este comportamiento contrasta con el determinado para el fitato en las mismas condiciones, el cual se encuentra totalmente asociado al ion Mg^{2+}, en forma del complejo $[Mg_5(H_2L)]$. Las estructuras moleculares tentativas de las formas predominantes del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en el núcleo y citosol, que se discutieron en detalle en el capítulo 10, se muestran en la figura 14.2.

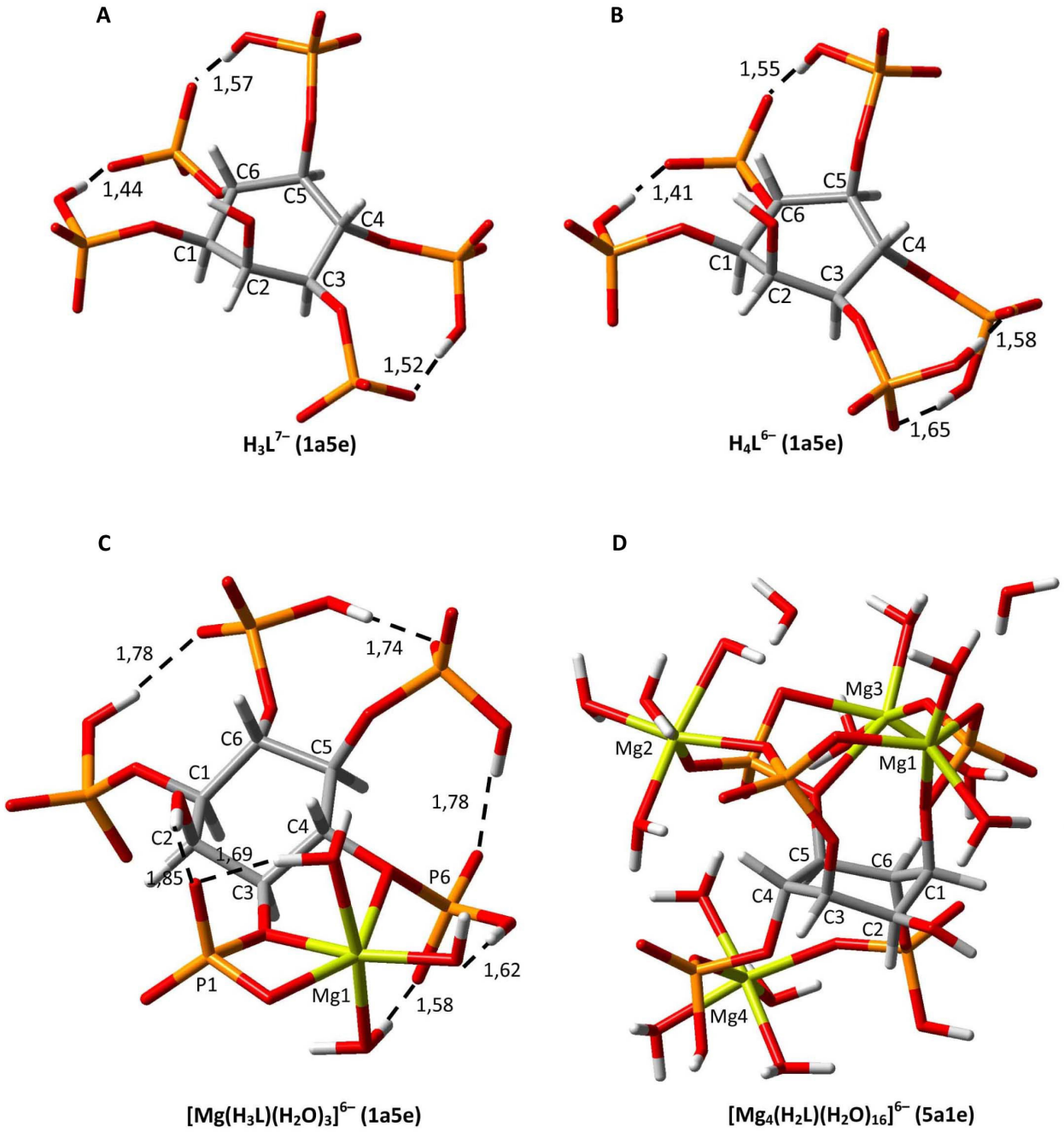


Figura 14.2. Estructuras moleculares de las especies del Ins(1,3,4,5,6)P_5 predominantes en condiciones citosólico-nucleares en células de mamífero (por referencias adicionales ver capítulo 10).

Se ha demostrado que el InsP_6 no es capaz de secuestrar hierro en presencia de niveles intracelulares de magnesio[8]. Si una pequeña concentración de Fe^{3+} (representando el *pool* de hierro lábil intracelular) es incluida en las simulaciones con magnesio e Ins(1,3,4,5,6)P_5, el ion trivalente se asocia completamente con el ligando (tabla 14.1). Esto es debido a la moderada asociación con el ion Mg^{2+} que exhibe el Ins(1,3,4,5,6)P_5, aunado a la alta concentración intracelular que posee este último. Las implicaciones de estos resultados a nivel biológico son poco claras, ya que se espera que los sideróforos intracelulares sean capaces de actuar, asimismo, como agentes inhibidores de la producción de radicales libres, una propiedad que el Ins(1,3,4,5,6)P_5 ciertamente no presenta.

3.3.2. Predicciones en condiciones de alta concentración: eritrocitos de aves y tortugas

Los eritrocitos de tortugas y aves contienen concentraciones inusualmente altas de Ins(1,3,4,5,6)P_5 [23]. Aunque ha sido propuesto que este compuesto modula la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, es improbable que todo el Ins(1,3,4,5,6)P_5 presente en la célula se vea asociado a esta proteína. En este marco, se ejecutaron cálculos de forma de predecir el estado fisicoquímico del ligando no unido a la hemoglobina, utilizando como condiciones $[K^+]$ = 0,15 M, T = 37,0 °C y pH = 7,4. Se exploraron concentraciones del Ins$P$ de 1, 3 y 7 mM, de acuerdo con los niveles reportados en este tipo de sistemas biológicos [24-26]. Adicionalmente, el límite inferior de este rango cubre condiciones en donde el *pool* de Ins(1,3,4,5,6)P_5 libre sea menor que el total del ligando intracelular determinado. Para cada uno de estos valores de concentración del Ins$P$, se analizaron diferentes magnitudes de $[Mg^{2+}]_{total}$, de forma de obtener $[Mg^{2+}]_{libre}$ del orden de 0,2 mM, reportada en eritrocitos de mamíferos[27].

Los resultados obtenidos predicen que el total de Ins(1,3,4,5,6)P_5 presente se encuentra solubilizado, en forma de una mezcla de especies libres y complejas con K^+ y Mg^{2+} (complejos 1:1 y 4:1 metal:ligando). La formación del sólido de magnesio se espera sólo para concentraciones del ion libre más altas que las utilizadas: 0,32 mM para 7 mM de ligando, y 0,41 mM para 3 mM de ligando.

Este comportamiento resulta por demás interesante si se lo compara con el del fitato; en las mismas condiciones, el InsP_6 se encuentra completamente precipitado para $[Mg^{2+}]_{libre}$ ≈ 0,2 mM. Esta evidencia sugiere que en estos eritrocitos, desde un punto de vista evolutivo, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 podría haber sido seleccionado entre sus congéneres fosforilados, en parte, como consecuencia de su significativa solubilidad en presencia del ion Mg^{2+}.

3.3.3. Predicciones en condiciones extracelulares

Desde el punto de vista biológico, es relevante la predicción de la especiación química del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en presencia de altos niveles de ion Ca^{2+} y Mg^{2+}, condiciones como aquellas encontradas en medios extracelulares de mamíferos, debido a que: (i) esas condiciones corresponden a los experimentos realizados con esta molécula, en donde el compuesto es agregado al medio de cultivo, y (ii) las concentraciones de este ligando reportadas en plasma de rata están en el rango 10 - 20 nM [28]. En este sentido, se realizaron cálculos utilizando condiciones que simulan el ambiente extracelular: $[Na^+]$ = 0,15 M, T = 37,0 °C, pH = 7,5, $[Ca^{2+}]$ = 2 mM y $[Mg^{2+}]$ = 2 mM. Para una concentración de Ins(1,3,4,5,6)P_5 de 15 nM, los resultados muestran que el ligando se encuentra predominantemente como una mezcla soluble de los complejos $[Ca_4(H_2L)]$ (93 %) y $[Mg_4(H_2L)]$ (6 %). *A posteriori* se realizó el modelado del sistema haciendo uso de cantidades crecientes de Ins$P$, de forma de determinar su solubilidad máxima en plasma. En las condiciones detalladas arriba, entre 60 y 65 µM de Ins(1,3,4,5,6)P_5 pueden existir en solución, mayoritariamente como una mezcla de los dos complejos polinucleares mencionados. La solubilidad de este compuesto en compartimentos vesiculares intracelulares, igualmente ricos en calcio y magnesio pero usualmente más ácidos, será seguramente mayor que el rango anterior. En consecuencia, las propiedades fisicoquímicas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 permitirían la existencia de un *pool* significativo de especies derivadas, no unidas a proteínas, tanto en medio extracelular como en compartimentos intracelulares ácidos.

3.3.4. Guía práctica para la experimentación con Ins(1,3,4,5,6)P_5

Toda la información recabada y discutida hasta aquí puede aplicarse en forma directa a la generación de directrices simples, que permitan mantener los experimentos con Ins(1,3,4,5,6)P_5 en condiciones cercanas a las fisiológicas. Cuando se intenta imitar condiciones citosólico-nucleares, en general el ligando complejará 1 mol de magnesio por mol de Ins*P* (tabla 14.1), al margen de que estrictamente su capacidad secuestrante máxima corresponda a 4 moles de metal por mol de ligando (complejo $[Mg_4(H_2L)]$ presente en condiciones de exceso de ion metálico y/o alto pH). De esta manera, y teniendo en cuenta que el citosol y el núcleo celulares contienen entre 0,25 y 1 mM de Mg^{2+} libre[22], la concentración total de metal incluida en los ensayos debe estar en 100 % de exceso respecto del Ins(1,3,4,5,6)P_5, además de cualquier otra contribución debida a ligandos quelantes empleados, como ATP, ADP, etc. En estas condiciones, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se mantendrá en solución hasta una concentración de 135 µM (o mayor, aunque esto sólo es aplicable en circunstancias muy restrictivas).

Para procedimientos que involucren otras condiciones, como por ejemplo la preparación de soluciones *stock*, experimentos que simulen el ambiente intestinal o ensayos de actividad enzimática con propósitos biotecnológicos, un punto muy importante a tener en cuenta es el conocimiento *a priori* de las características de solubilidad del sistema. Dado que la solubilidad del Ins(1,3,4,5,6)P_5 es determinada por múltiples procesos en equilibrio, tanto de precipitación, como de protonación y complejación, y que éstos operan de manera dependiente del pH y las concentraciones y relaciones molares de metal y ligando, se realizaron simulaciones monitoreando un amplio espectro de condiciones, a través del uso de las constantes de equilibrio ajustadas en esta tesis. En la figura 14.3 se muestran los resultados obtenidos, los que resumen el comportamiento de solubilidad de este inositol fosfato en presencia de Mg^{2+} o Ca^{2+}.

En los gráficos, las fronteras entre las zonas solubles e insolubles están dadas en términos de la concentración total de ligando y metal, y corresponden a condiciones para las cuales se espera un 1 % o un 99 % del ligando en la fase sólida. En general, para cada *set* de condiciones utilizado, el área de

predominancia de los complejos sólidos está rodeada por una zona externa constituida por sistemas solubles, asociada a muy bajas o muy altas concentraciones de Ins(1,3,4,5,6)P_5 (figura 14.3). En esta región se encuentran los complejos solubles 4:1 y 1:1 metal:ligando, predominantes a bajos o altos niveles del Ins*P* respectivamente.

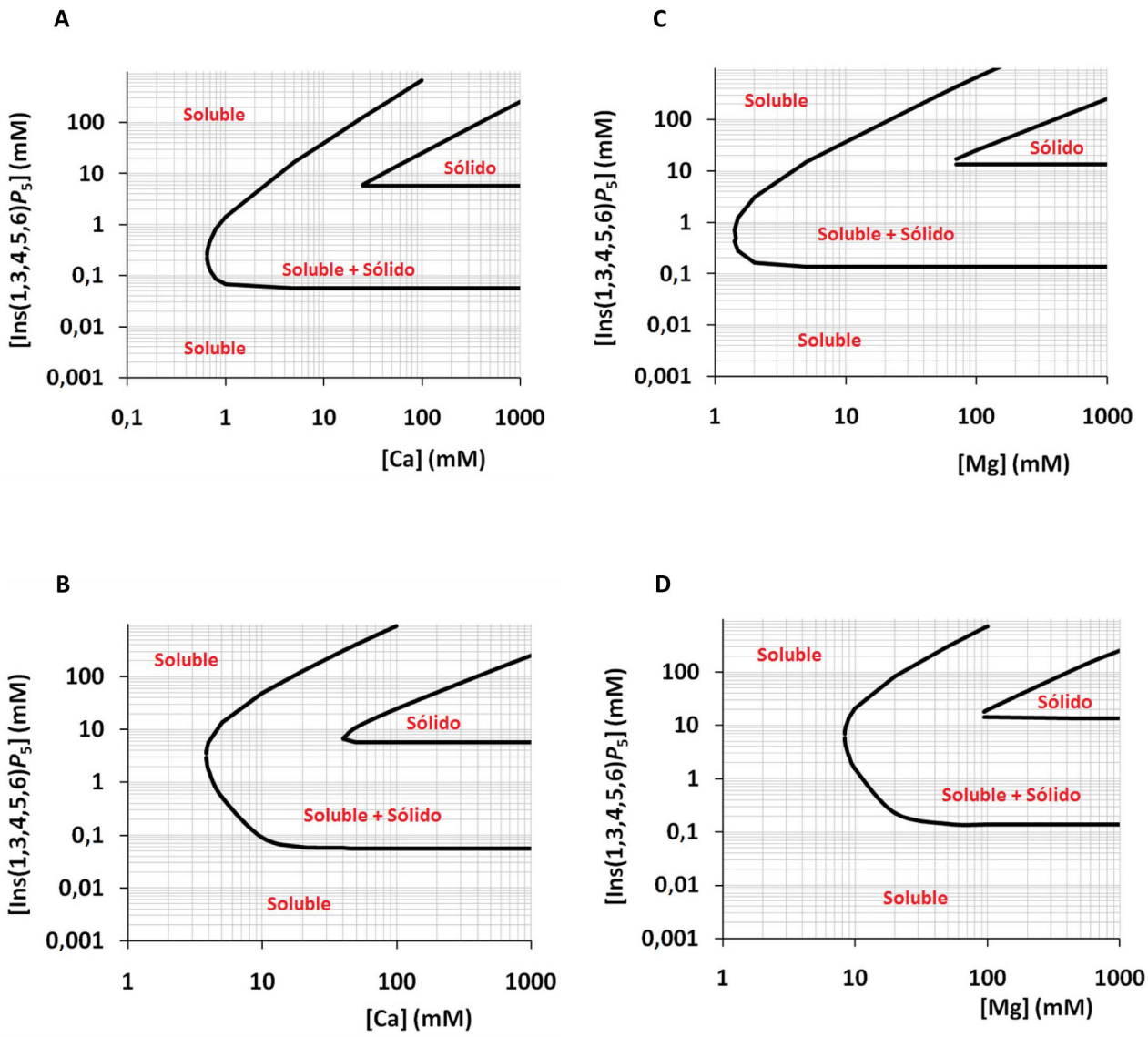


Figura 14.3. Comportamiento de solubilidad del Ins(1,3,4,5,6)P_5 en presencia de Ca^{2+} (A y B) o Mg^{2+} (C y D), a pH = 7,5 (A y C) o pH = 5,0 (B y D). Las líneas que marcan las fronteras entre las distintas zonas corresponden a condiciones para las cuales se espera un 1 % o un 99 % del ligando como sólido.

Los límites que dividen las condiciones de solubilidad respecto de las de precipitación tienen, para concentraciones significativas de catión, un

comportamiento "horizontal", es decir, los sólidos se detectan en el sistema por encima de una concentración fija de Ins(1,3,4,5,6)P_5. Este valor corresponde, de hecho, a la solubilidad de los complejos $[M_4(H_2L)]$, analizada en el capítulo 11. En contraposición, por debajo de cierta concentración total de ion metálico (5 mM de M^{2+} a pH = 7,5; 20 mM de Ca^{2+} o 60 mM de Mg^{2+} a pH = 5,0), los complejos 1:1 se vuelven predominantes, contribuyendo a la solubilidad total del Ins(1,3,4,5,6)P_5 y, en consecuencia, desplazando el límite con el sólido hacia mayores $[ligando]_{total}$. Adicionalmente, si el nivel de metal es más bajo aún, se alcanza un punto por debajo del cual, sin importar la concentración de Ins(1,3,4,5,6)P_5, las sales de magnesio y calcio no consiguen precipitar. Estos valores son $[Mg^{2+}]$ = 1,37 mM y $[Ca^{2+}]$ = 0,65 mM a pH = 7,5, los que se incrementan a medida que el pH disminuye (figura 14.3).

3.4. Ins(1,2,3)P_3 en sistemas biológicos

3.4.1. Predicciones en condiciones intracelulares en ausencia de Fe(III)

Los resultados presentados en la Sección III de esta tesis permiten proyectar las formas en las cuales se encuentra el Ins(1,2,3)P_3 en el interior de las células de mamíferos, tanto en ausencia como en presencia de hierro(III). Para este propósito, se tomó como concentración de ligando 0,6 µM, la cual es cercana a la media del rango reportado en este tipo de células[20,29]. Se utilizaron además, de acuerdo con lo presentado anteriormente en este mismo capítulo, $[K^+]$ = 0,15 M, T = 37,0 °C y $[Mg^{2+}]_{libre}$ = 0,5 mM. El diagrama de distribución de especies resultante en ausencia de Fe(III) se muestra en la figura 14.4.

A pH del núcleo y citosol celulares, el Ins(1,2,3)P_3 se encuentra en parte libre (30,3 %) y en parte asociado con K^+ (51,9 %) y Mg^{2+} (17,8 %). En el rango de pH asociado con compartimentos intracelulares vesiculares, como endosomas o lisosomas, este InsP_3 se predice también libre, aunque una parte se encontraría unido directamente al ion K^+.

Según el diagrama de la figura 14.4, las especies químicas predominantes a nivel intracelular son H_3L^{3-}, H_2L^{4-}, $[K(H_2L)]^{3-}$ y $[K(HL)]^{4-}$. Las estructuras moleculares de las mismas se muestran en la figura 14.5, junto con la distribución de su potencial electrostático molecular.

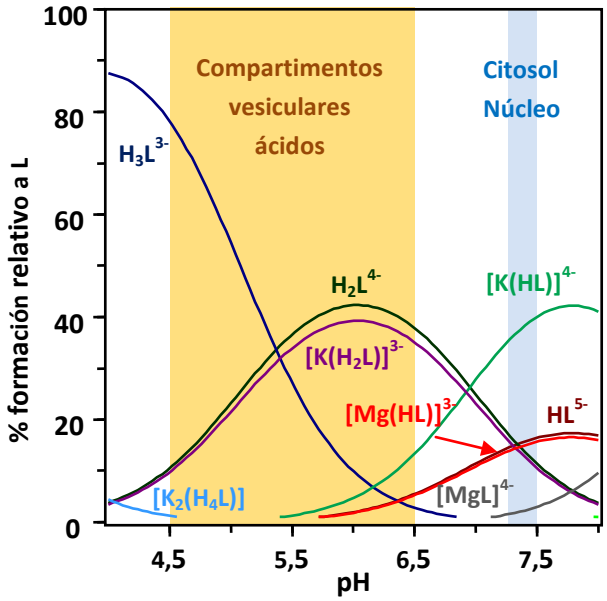


Figura 14.4. Diagrama de distribución de especies para el Ins(1,2,3)P_3 en condiciones intracelulares simuladas y en ausencia de hierro. Las predicciones son válidas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, [L] = 0,6 µM, $[K^+]$ = 0,15 M, $[Mg^{2+}]$ = 0,5 mM.

Respecto de ambas formas libres del ligando, la alta carga negativa que presentan sugiere interacciones electrostáticas importantes con cationes del medio. De forma interesante, las superficies de potencial electrostático muestran, en ambos casos, una fuerte localización de carga hacia el extremo de la molécula donde se encuentran los tres grupos fosfato. Esta es, en efecto, la causa de un fenómeno paradójico presentado anteriormente entre los resultados de esta tesis. El Ins(1,2,3)P_3 interacciona con los iones alcalinos más fuertemente que el fitato, incluso cuando para este último se detectan, en las mismas condiciones, especies aniónicas mucho más cargadas. Dada la gran concentración de carga negativa hacia uno de los extremos de la molécula, el Ins(1,2,3)P_3 logra generar cavidades con un potencial eléctrico significativamente más negativo que en el caso del InsP_6, atrayendo más intensamente a los iones M^+.

La alta concentración de ion K^+ en el medio intracelular induce la formación de dos complejos predominantes del Ins(1,2,3)P_3, $[K(H_2L)]^{3-}$ y $[K(HL)]^{4-}$. Como puede verse en las figuras 14.5C y D, el sitio preferido de unión del catión se encuentra entre dos grupos fosfato adyacentes.

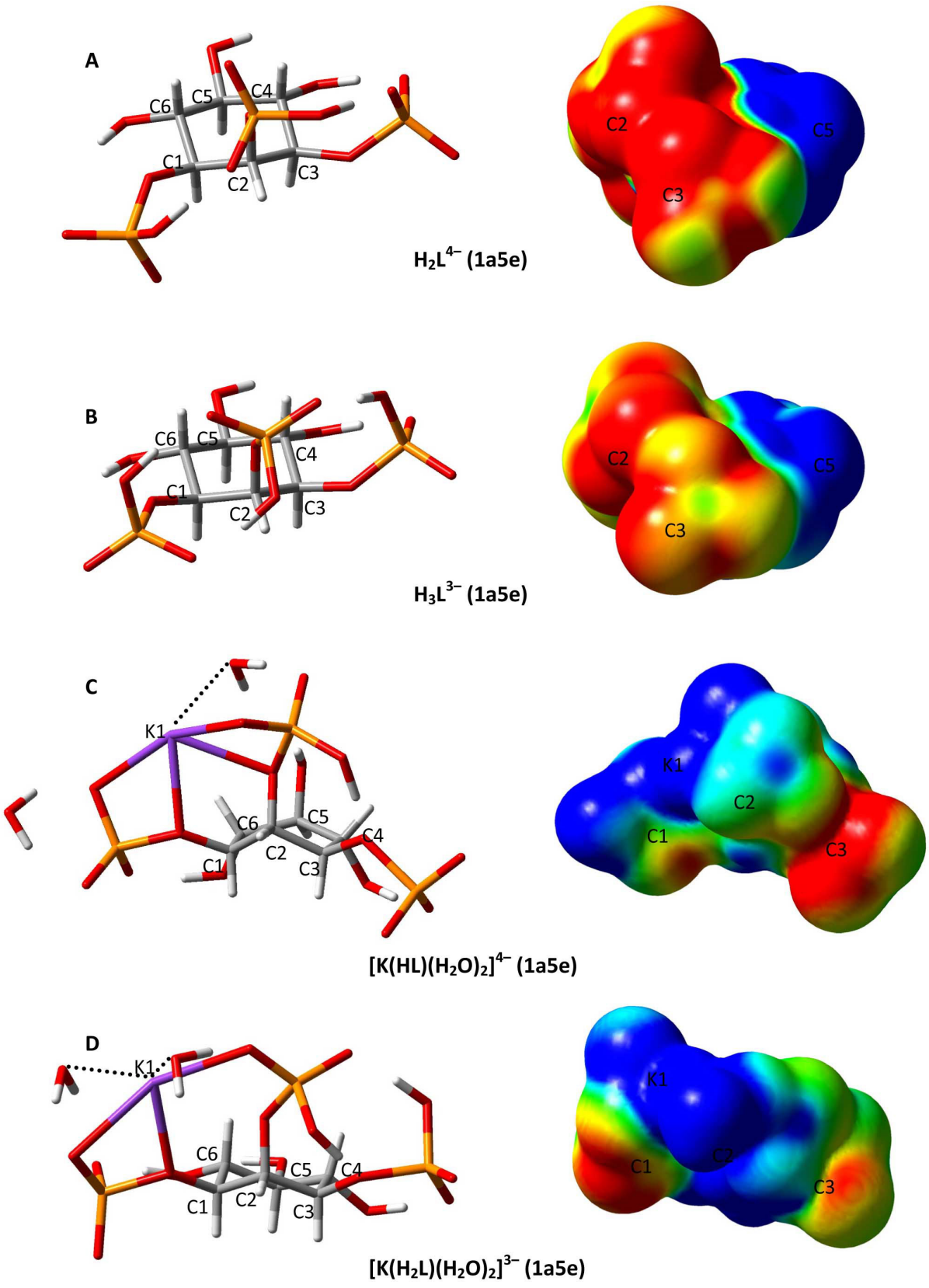


Figura 14.5. Geometría y potencial electrostático molecular sobre una superficie de isodensidad para las especies del Ins(1,2,3)P_3 predominantes en condiciones intracelulares simuladas y en ausencia de hierro (Valor de isodensidad = 0,0004 e).

Esta interacción provoca una neutralización a nivel local de la carga negativa del ligando, a la vez que reduce la repulsión intramolecular entre los grupos ionizables. Como se analizó en detalle en el capítulo 13, la complejación no incluye en este sistema cambio conformacional alguno en el rango de pH ensayado, por lo que, al igual que el ligando, la conformación preferida de los complejos es 1a5e.

3.4.2. Desempeño como ligando intracelular de Fe(III)

El uso de los datos termodinámicos recabados hasta aquí, en conjunto con las concentraciones de los componentes del sistema y otros parámetros característicos del medio intracelular, permiten obtener resultados coherentes con la alta selectividad que el Ins(1,2,3)P_3 muestra frente al Fe^{3+} respecto del ion Mg^{2+} (capítulo 12). Tomando como valores de entrada, además de las constantes de equilibrio correspondientes, [Ins(1,2,3)P_3] = [Fe^{3+}] = 1 µM, [K^+] = 0,15 M, T = 37,0 °C y $[Mg^{2+}]_{libre}$ = 0,5 mM, la asociación calculada del ion trivalente con el ligando es completa. No se detectan formas del metal o del ligando libres o asociadas con Mg^{2+}. Incluso más, si se aumenta la concentración de magnesio libre a 1 mM, los resultados son similares, según se advierte en el diagrama de distribución de especies correspondiente (figura 14.6).

El complejo de hierro(III) predominante en condiciones del núcleo y citosol celulares es $[Fe(OH)L]^{4-}$, el cual da cuenta de más del 90 % de las formas del metal. En presencia de cantidades equimolares de metal y ligando, se determina un 100 % de asociación Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) para concentraciones de Ins$P$ en los extremos del rango intracelular propuesto: 0,1 y 1,0 µM. Lo mismo ocurre si se emplean concentraciones aún mayores ([L] = [Fe^{3+}] = 10 µM), las que tomarían en cuenta una posible compartimentalización de los componentes del sistema. La interacción hierro(III)-Ins(1,2,3)P_3 se basa en reacciones de formación de complejos 1:1 metal:ligando, por lo que, si el Ins$P$ se encontrara en exceso, éste se espera en forma libre y/o formando complejos con los cationes predominantes en el medio, K^+ y Mg^{2+} (no se muestra).

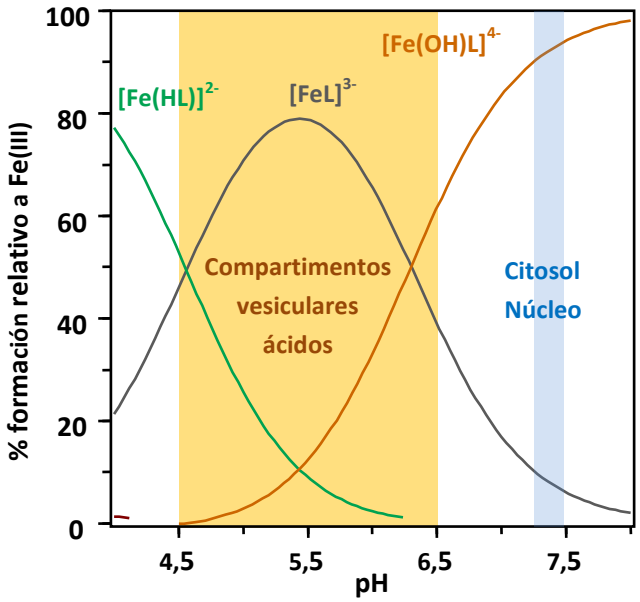


Figura 14.6. Diagrama de distribución de especies para el Ins(1,2,3)P_3 en condiciones intracelulares simuladas y en presencia de hierro. Las predicciones son válidas en NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 °C, [L] = [Fe^{3+}] = 1 µM, [K^+] = 0,15 M, [Mg^{2+}] = 1 mM.

Los compartimentos vesiculares ácidos, como los endosomas y lisosomas tardíos, están siendo gradualmente reconocidos como contribuyentes importantes al *pool* de hierro lábil intracelular [30-32]. Aunque la distribución del Ins(1,2,3)P_3 a nivel celular no se conoce, es concebible que el mismo exista en estos compartimentos; se cree que este Ins*P* es un producto de los diversos procesos de desfosforilación de los inositol fosfatos más pesados, a través de la acción de una enzima localizada en el retículo endoplasmático [33]. No se conoce aún hoy cómo los sustratos de esta proteína logran unirse a ella, pero sus productos, entre los que se encontraría el Ins(1,2,3)P_3, pueden alcanzar algunos endosomas y lisosomas tardíos mediante el tráfico vesicular. Dado el bajo valor de pH existente en estos compartimentos (pH = 4,5 - 6,5), se espera en términos generales, que los sideróforos aniónicos más comunes funcionen de manera limitada. Sin embargo, los datos recabados en esta tesis predicen una asociación cuantitativa Ins(1,2,3)P_3-Fe(III), para concentraciones equimolares de metal y ligando (figura 14.6). Dado que los compartimentos vesiculares ácidos contienen además grandes cantidades de ion calcio, se ejecutaron cálculos para modelar el comportamiento del sistema en presencia de 1 o 2

mM de Ca^{2+}. Los resultados son indistinguibles de los mencionados anteriormente.

Del análisis realizado se desprende que, a nivel intracelular, los complejos predominantes del Ins(1,2,3)P_3 en presencia de Fe(III) son $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$. Las estructuras y distribución del potencial electrostático molecular de ambos se muestran en la figura 14.7 (por detalles ver capítulo 13).

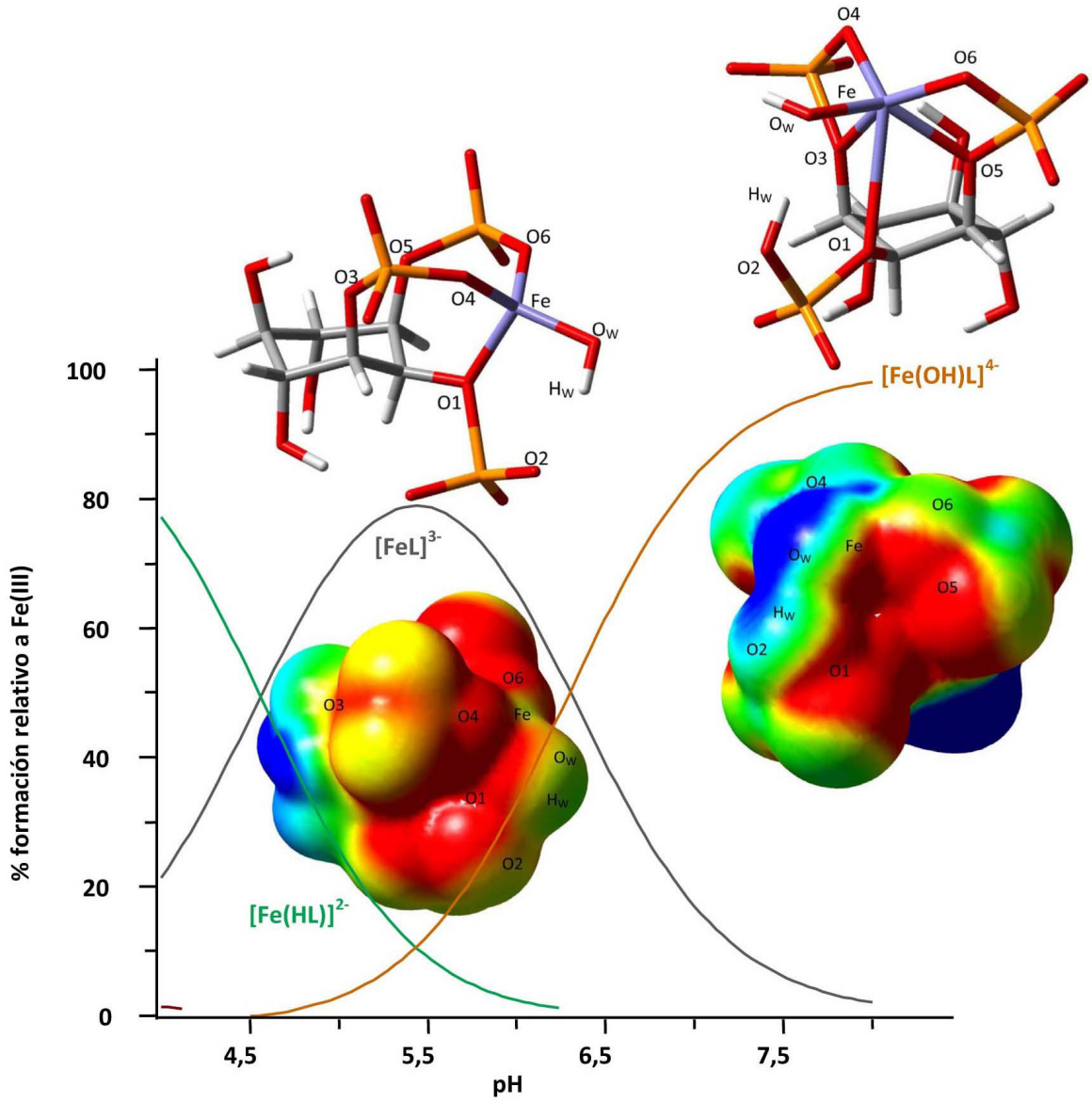


Figura 14.7. Geometría y potencial electrostático molecular sobre una superficie de isodensidad para las especies del Ins(1,2,3)P_3 predominantes en condiciones intracelulares simuladas y en presencia de hierro (Valor de isodensidad = 0,0004 e).

Además de presentar una conformación 5a1e, la característica más importante en los dos casos es la presencia de un grupo OH^- directamente unido al centro metálico. Estas posiciones de la esfera de coordinación del hierro resultaron no lábiles en experimentos computacionales de desplazamiento de azida, de acuerdo con observaciones experimentales[34]. Adicionalmente, ambas estructuras propuestas muestran un patrón de distribución del potencial electrostático diferente. En general, las zonas más cargadas negativamente están localizadas hacia los grupos ionizables, manteniendo en cierta medida la cavidad preformada que muestra el estado axial del ligando. Dado que el volumen del grupo OH^- no es despreciable, la posición y la dirección del mismo modulan de forma significativa los detalles estructurales y electrostáticos de la especie. Éstos serán relevantes, seguramente, a la hora del establecimiento de las interacciones proteína-Ins*P*, que constituyen la base del reconocimiento de las diversas formas del Ins(1,2,3)P_3 a nivel biológico.

Una cuestión queda por resolver. Todavía no se ha esclarecido si el conjunto de hierro complejado por el Ins(1,2,3)P_3 podría formar parte del *pool* de hierro lábil intracelular. Este último se define operacionalmente como la fracción del metal que puede ser extraída de sus ligandos endógenos por sondas fluorescentes específicas, como la calceína. Para abordar esta cuestión, se realizaron cálculos en las mismas condiciones que las empleadas hasta aquí ([Ins(1,2,3)P_3] = [Fe^{3+}] = 1 µM, [K^+] = 0,15 M, *T* = 37,0 °C, $[Mg^{2+}]_{libre}$ = 0,5 mM y pH = 7,4), pero en presencia de niveles de calceína cercanos a los utilizados comúnmente en los ensayos (20 µM)[35]. Los resultados revelan que la calceína complejaría el 100 % del hierro total, por lo que cualquier especie compleja Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) presente, sería detectada por esta sonda.

En suma, el Ins(1,2,3)P_3 parece contar con las características fisicoquímicas adecuadas para ser considerado dentro de la lista de candidatos a sideróforos intracelulares pequeños del *pool* de hierro lábil. A esto hay que adicionar que los resultados de los estudios voltamétricos evidencian una gran capacidad del Ins(1,2,3)P_3 para estabilizar el estado de oxidación +3 del hierro. Esto proporciona a este inositol fosfato una habilidad que pocos ligandos comparten: la de inhibir la generación de radicales libres citotóxicos, catalizada por el catión hierro. A nivel celular la ventaja consecuente es enorme, por lo

que es probable que el organismo haga uso eficiente de este Ins*P*, como transportador "seguro" de hierro entre las grandes reservas proteicas.

3.5. Interacción Ins*P*-proteína

3.5.1. Introducción

La adquisición de hierro por parte de las células es crítica para su supervivencia, crecimiento y diferenciación [36]. La maquinaria celular requiere de una fuente constante de hierro, el cual sirve como un componente funcional de proteínas que poseen grupos hemo y *clusters* de tipo hierro-azufre. La mayoría de las células de mamíferos y sus tejidos logran la captación y la regulación estricta de los niveles de hierro por mecanismos relacionados, en gran extensión, con la endocitosis mediada por receptores de membrana del complejo hierro-transferrina.

El transporte de hierro dentro y fuera de las células posee un obstáculo importante, debido a que este ion metálico, en el estado de oxidación +3, es insoluble en soluciones aeróbicas a valores de pH fisiológico [37]. Asimismo, la gestión de las especies solubles del hierro es por demás problemática, ya que éste posee la capacidad de pivotar entre dos estados de oxidación (+2 y +3) y catalizar reacciones de formación de especies radicalarias oxigenadas, altamente tóxicas para el organismo[38]. En consecuencia, son necesarios mecanismos especializados, capaces de aumentar la concentración de hierro soluble mientras se garantiza una inhibición efectiva de su reactividad redox. En efecto, estos procesos existen y se articulan en base a la maquinaria proteica, la cual une al hierro presente haciendo uso de arreglos estructurales conservados en la evolución (transferrina y ferritina) o a través de cofactores (hemo y sulfurados) [39]. Al margen de estas posibilidades, se ha reportado recientemente evidencia experimental que sugiere la existencia de mecanismos de solubilización y transporte de hierro paralelos, por vías que aún se desconocen en detalle [40-42].

Aunque a nivel citoplasmático el hierro se encuentra unido fuertemente a proteínas, se cree que una cierta fracción es complejada por ligandos quelantes de bajo peso molecular (*pool* de hierro lábil, libre o quelable) [43]. De acuerdo

con esto, varios estudios sugieren que células de mamíferos contienen sideróforos "pequeños", con la habilidad de captar hierro con gran afinidad [44,45]. Recientemente, la atención de los investigadores en el tema ha recaído sobre los resultados de algunos trabajos realizados sobre la lipocalina 24p3, también conocida como siderocalina (Scn) o lipocalina 2 (figura 14.8). Las lipocalinas son una familia de proteínas que unen ligandos de bajo peso molecular y poseen diversas funciones relacionadas con el reconocimiento molecular [46]. La siderocalina ha sido asociada a múltiples procesos biológicos, incluido la apoptosis celular [47], inmunidad innata [48] y desarrollo renal [49]. Varios grupos de investigación han demostrado que la Scn es capaz de unir hierro y transportarlo hacia o desde las células [1,47,49]. En una visión evolutiva, esta proteína pudo ser una alternativa a la transferrina en los orígenes de la vida, esencial para el desarrollo de órganos y tejidos [49-51].

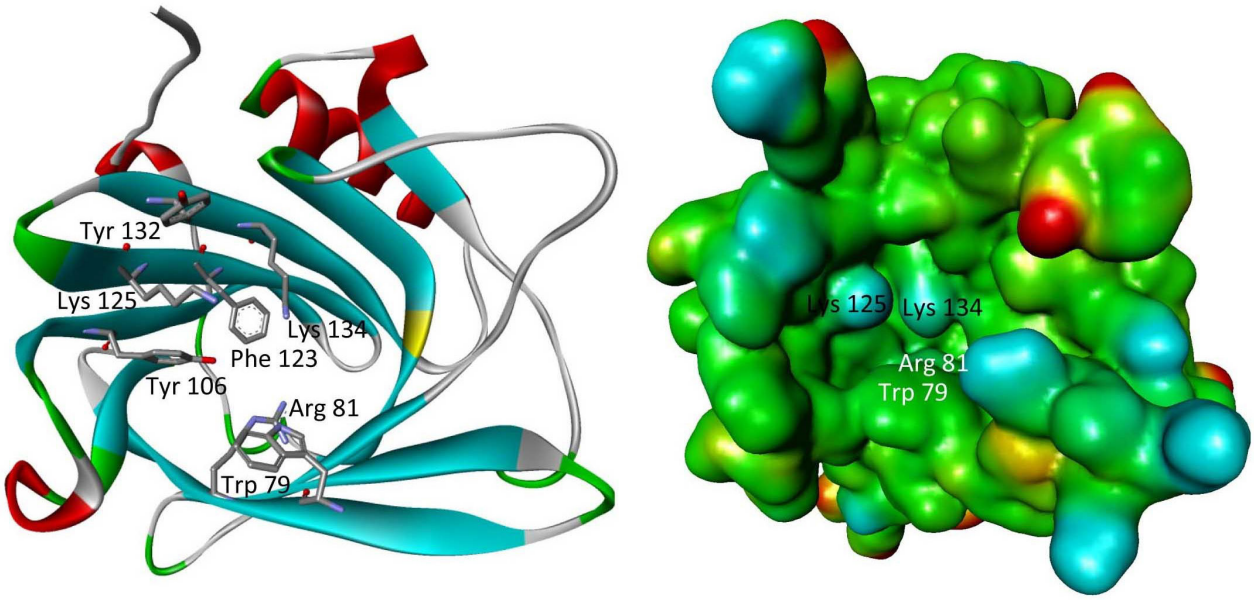


Figura 14.8. Representación esquemática de la siderocalina (Scn)[1]. Se muestran a la izquierda los residuos aminoacídicos del sitio activo. A la derecha, una representación de la carga parcial sobre una superficie generada por el solapamiento de las esferas de Van der Waals (zonas de carga positiva en celeste y negativa en rojo).

Conteniendo Fe, la siderocalina se une a un receptor en la superficie celular, es ingresada, y allí libera el ion metálico, incrementando su concentración

citosólica [47]. Por el contrario, en ausencia de hierro extracelular, la apo-Scn se une al mismo receptor, es también ingresada, pero en este caso une hierro y lo transfiere al exterior, reduciendo en consecuencia su nivel intracelular.

Desde hace años se conoce que desarticular el mecanismo de inclusión de hierro de las bacterias es la principal estrategia del hospedador contra las infecciones [52]. Una de las respuestas bacteriostáticas más generales consiste en aumentar la expresión de transferrina, receptores de lactoferrina y ferritina, haciendo decrecer la concentración extracelular de este ion metálico [53]. Sin embargo, una estrategia más específica incluye a la siderocalina [1,48,54]. La Scn no es capaz de unirse al hierro por sí misma, sino que necesita de un ligando pequeño que complejee al hierro y *a posteriori* se una a ella [1,47,49]. Para esto, la siderocalina cuenta con un sitio activo trilobular cargado positivamente, definido por los residuos de lisina 125 y 134, y arginina 81 (figura 14.8). Esta disposición aminoacídica, soportada sobre un barril beta, es muy eficiente para unir sideróforos cargados negativamente y/o con alta deslocalización de la densidad electrónica. En efecto, la Scn posee una gran afinidad por la enterobactina (Ent), el sideróforo bacteriano por excelencia (figura 14.9) [49]. En consecuencia, la siderocalina complementa la defensa antibacterial del hospedador, uniendo específicamente sideróforos bacterianos asociados o no al hierro. En este sentido es una proteína única; atrapa eficientemente al hierro de uso bacteriano a través de la captación selectiva del complejo Fe(III)-Ent.

En este contexto, un resultado experimental sobresale en la bibliografía especializada. La apo-Scn producida por bacterias deficientes en enterobactina adquiere la habilidad de unir al catión hierro luego de ponerse en contacto con células de mamífero. Se ha propuesto entonces que debe existir algún tipo de sideróforo putativo en las células de mamífero, el cual sería capaz de unirse a la Scn y mediar en el transporte del hierro [55,56]. En efecto, muy recientemente se han identificado algunos sideróforos endógenos, como catecol y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) [6,57], aunque en general muy poco se sabe todavía sobre este tema.

Como se adelantaba en capítulos precedentes, algunos inositol fosfatos han sido caracterizados en el pasado como ligandos con capacidad de prevenir de forma eficiente *in vitro* la reacción de Fenton [58-61]. Corresponden a aquellos

miembros fosforilados en 1,2,3, y comprenden el Ins(1,2,3)P_3, Ins(1,2,3,5)P_4, Ins(1,2,3,6)P_4, Ins(1,2,3,4,6)P_5, Ins(1,2,3,4,5)P_5 e InsP_6. Su actividad antioxidante se cree debida a su gran afinidad por el hierro(III), estabilizando este estado de oxidación. Dada esta evidencia y considerando la alta carga negativa que presentan las especies de estas moléculas en solución, parece promisoria la idea de que uno o más de estos Ins*P* cumplan con las características requeridas para ser ligandos aniónicos putativos en células de mamífero, relacionados con la siderocalina. En esta línea de razonamiento, se realiza aquí el estudio teórico comparativo de *docking* del sistema siderocalina-ligando-Fe(III), utilizando como posibles sustratos las especies libres y complejas de sideróforos bacterianos de alta afinidad (enterobactina, catecol, 2,5-DHBA) y dos inositol fosfatos (Ins(1,2,3)P_3 e InsP_6).

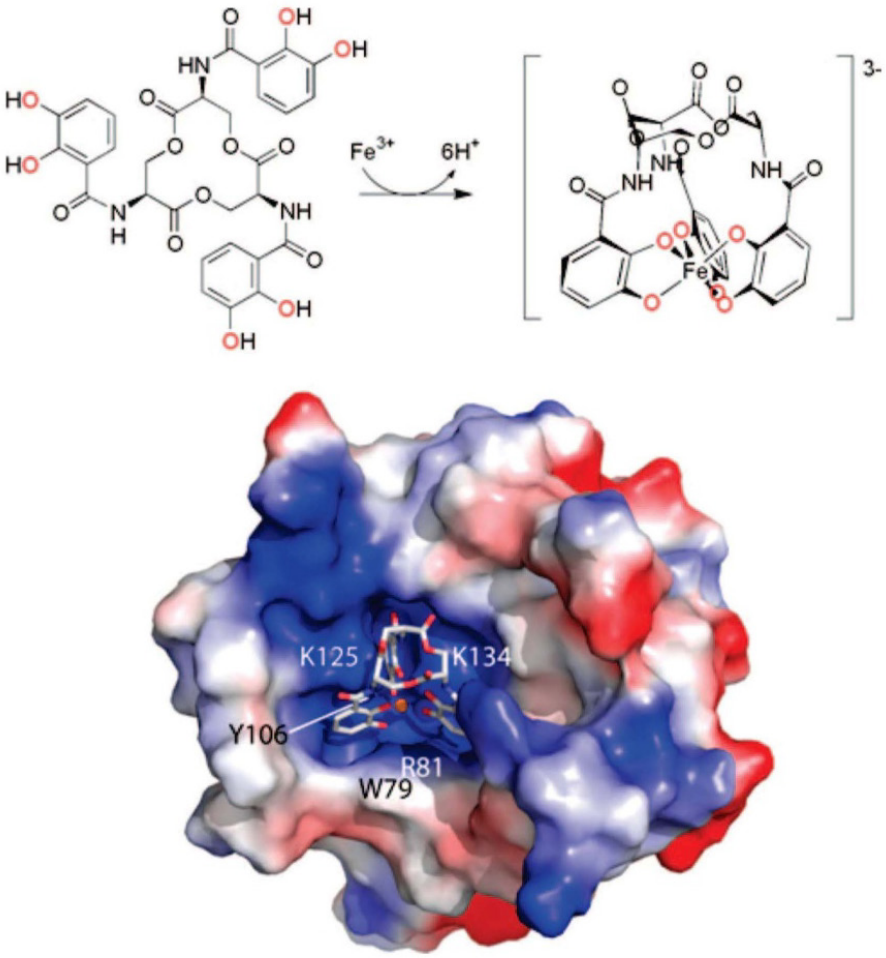


Figura 14.9. Complejación del hierro por la Ent (arriba). Modelado de la unión específica del complejo a la Scn (abajo). Tomado de la referencia[62].

3.5.2. Sistema Ins*P*-Fe(III)-siderocalina

Como paso previo, se validó la técnica a utilizar a través de un *redocking* del sistema Scn-sideróforo aromático-Fe(III), incluyendo como sustratos de alta afinidad la enterobactina y el catecol, para los cuales se conocen las estructuras cristalinas de los aductos. Asimismo, se analizó la interacción específica Scn-2,5-DHBA-Fe(III), haciendo especial énfasis en los aspectos estructurales, de los cuales todavía no existen datos. Los detalles de este procedimiento y los resultados obtenidos se exponen en el Anexo D.

Luego de la validación correspondiente, se aplicó la misma metodología al sistema conteniendo Ins(1,2,3)P_3. En la figura 14.10 se resumen los resultados para las especies del ligando en la conformación 1a5e. En general, la posición de anclaje del sustrato no varía apreciablemente con el grado de protonación de la especie. Como era previsible, la alta carga del Ins(1,2,3)P_3, localizada en un lado de la molécula, hace que el mismo se oriente de forma de enfrentar los grupos fosfatos a los residuos catiónicos: Lys 125 y Lys 134. Además, esta posición le permite maximizar el contacto con el lóbulo cercado por la Arg 81, el cual posee varios residuos capaces de formar enlaces de hidrógeno (Arg 81, Ser 68, Thr 54, Tyr 52, Tyr 138). Por último, el fosfato en C2 queda direccionado hacia el centro del sitio activo, donde interacciona directamente con el residuo de Tyr 106.

Existen, sin embargo, algunos residuos apolares como el Trp 79, Phe 123 y Phe 83, que poseen alta densidad de carga debido a la deslocalización de la misma en el sistema aromático. Estos aminoácidos también participan en el direccionamiento del inositol fosfato dentro del sitio activo, ya que se ejerce cierta repulsión entre la carga negativa de los fosfatos y los anillos aromáticos de estos residuos. En efecto, el Ins(1,2,3)P_3 expone en todos los casos sus carbonos 4, 5 y 6 (no fosforilados) hacia el Trp 79, en un intento por disminuir esta interacción no deseada. Si se observan las figuras con más detalle, se advierte cómo a medida que la carga negativa del ligando disminuye, se produce una pérdida progresiva de la fuerza de la interacción con los aminoácidos cargados del sitio activo (lisinas 125 y 134, y arginina 81). En la especie H_2L^{4-}, los fosfatos están más cerca entre sí debido a la compartición de protones, y sólo el fosfato en C3 se mantiene en su sitio original. Siguiendo las

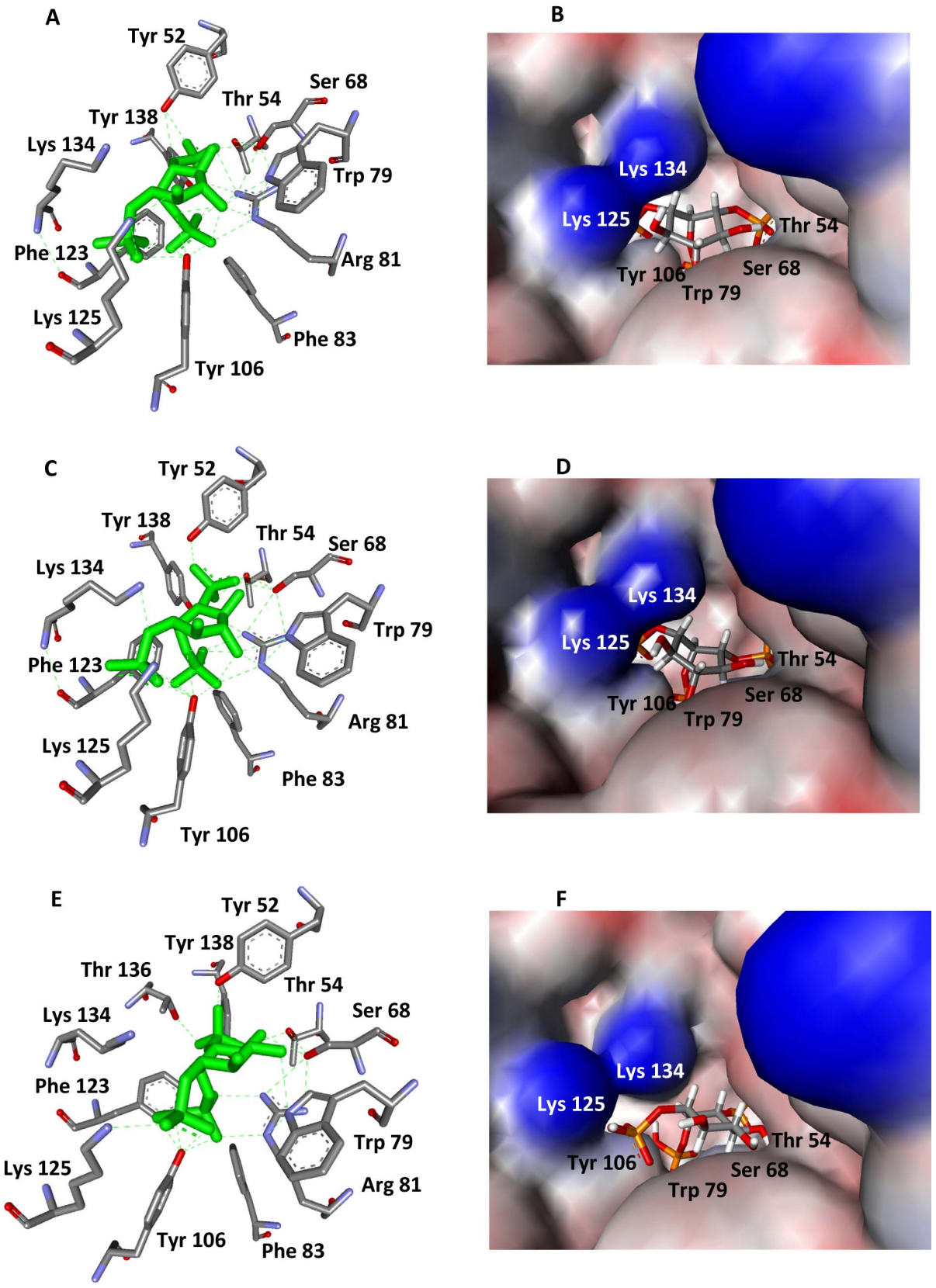


Figura 14.10. Unión del Ins(1,2,3)P_3 a la siderocalina. (A) L^{6-}, (C) HL^{5-} y (E) H_2L^{4-}. En (B), (D) y (F) se muestra el acople de los sustratos en (A), (C) y (E) al sitio activo.

figuras 14.10B, D y F se puede verificar como el ligando se desencaja gradualmente del sitio activo, exponiendo finalmente el fosfato en C1 hacia la solución.

En presencia de hierro, la disposición del sustrato cambia apreciablemente (figura 14.11). El metal provoca no sólo un cambio de la conformación del ligando (1a5e a 5a1e), sino además acerca los fosfatos entre sí. Para la especie $[FeL]^{3-}$, donde se ha visto que el fosfato en C2 tiene poca participación en la coordinación metálica, el complejo posee dos zonas cargadas negativamente: fosfato en C2 y fosfatos en C1 y C3 unidos por el átomo metálico. Estos grupos aniónicos se dirigen, como es esperable, a aquellas zonas del sitio activo cargadas positivamente. En detalle, hacia los dos lóbulos ocupados anteriormente por los fosfatos en C1 y C3 del ligando (figuras 14.10A y B). Nuevamente, en esta posición el complejo evita tener contacto con los residuos apolares del sitio, aunque, de todas formas, se encuentra en parte repelido por la fenilalanina 123.

En el complejo (5a1e) $[FeL(OH)]^{4-}$ (figuras 14.11C y D) el fosfato en C2 está más involucrado en la complejación del hierro, lo que tiene consecuencias directas en el modo de unión de la especie a la proteína. Ahora, la molécula posee una sola zona cargada negativamente: los tres fosfatos unidos al hierro. Este conjunto se dirige hacia el lóbulo donde se encuentran los residuos dadores y aceptores de enlaces de H, estableciendo múltiples interacciones. Uno de los fosfatos axiales sigue interaccionando con una de las lisinas, aunque ya en menor medida. Al igual que la especie $[FeL]^{3-}$, el anillo se aleja lo más posible del Trp 79, pero la interacción con los residuos Phe 123 y Phe 83 continúa siendo importante.

Una cuestión que queda por revisar es si este análisis estructural tiene un correlato en los valores estimados de ΔG del proceso de unión de los sustratos a la Scn (aductos 1:1 Scn:sustrato). Los resultados para los sistemas estudiados se detallan en la figura 14.12. En concordancia con lo discutido hasta aquí, a medida que se protona el Ins(1,2,3)P_3 la afinidad por la siderocalina disminuye levemente. De forma contraria a lo que podría pensarse, un cambio conformacional del ligando no induce una alteración significativa en la variación de la energía libre de unión; los valores de $\Delta G_{unión}$ para las especies L^{6-}

, HL^{5-} y H_2L^{4-} en el estado 5a1e son muy similares a los calculados para la conformación 1a5e.

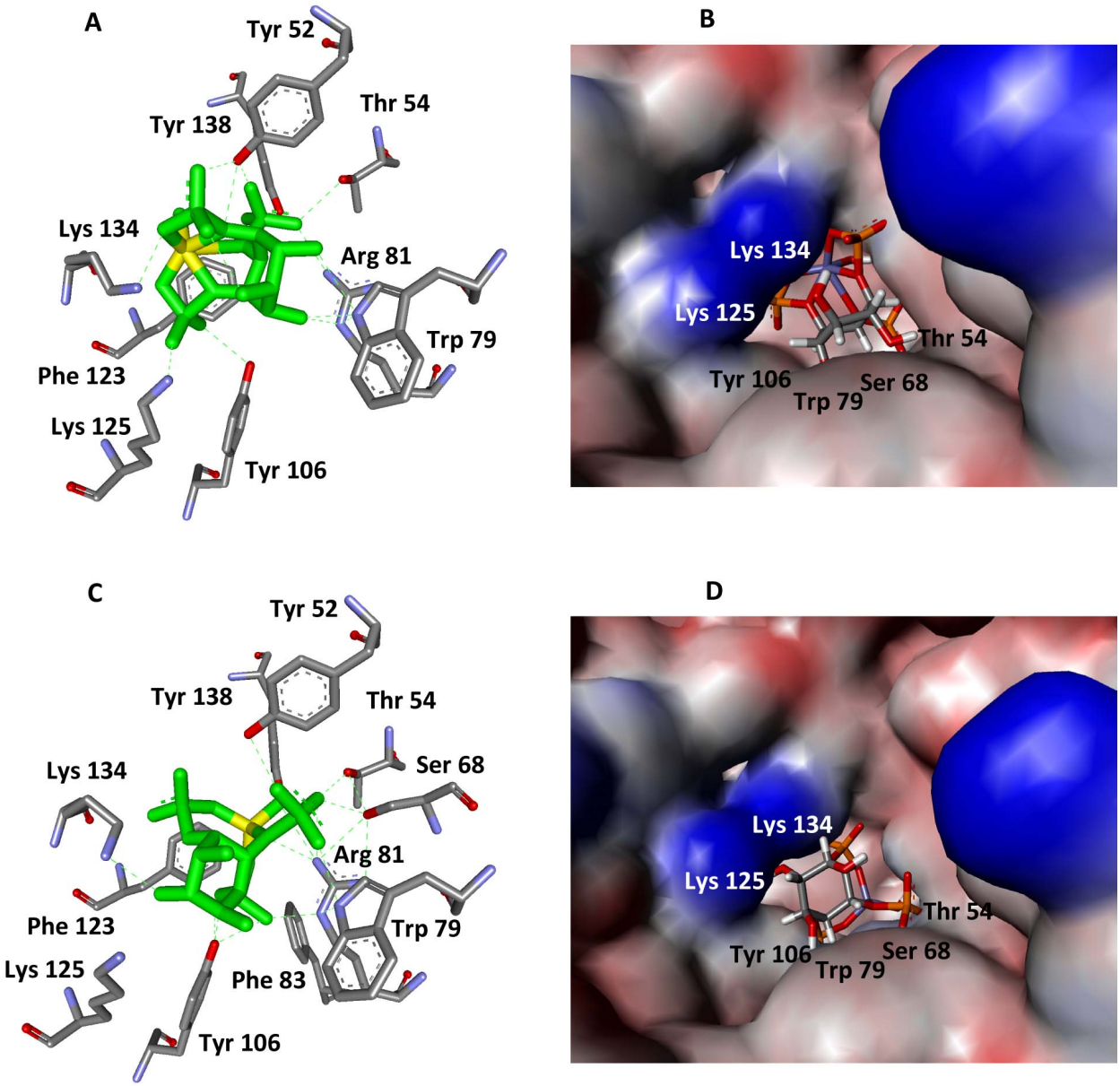


Figura 14.11. Unión de los complejos Ins(1,2,3)P_3–Fe(III) a la siderocalina. (A) $[FeL(H_2O)]^{3-}$ y (C) $[FeL(OH)]^{4-}$. En (B) y (D) se muestra el acople de los sustratos en (A) y (C) al sitio activo.

Los resultados para los complejos Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) son sensiblemente menores que los correspondientes al ligando libre, lo que estaría indicando una preferencia de la siderocalina por las especies complejas. De todas formas, la

afinidad estimada es significativa tanto para las formas libres como complejas del Ins(1,2,3)P_3, por lo que éste resulta un buen candidato entre los posibles sideróforos putativos asociados a la Scn.

Como se indica en la figura 14.12, la afinidad de la enterobactina, catecol, 2,5-DHBA y sus complejos con hierro por la Scn es igual o en general mayor que para las especies del Ins(1,2,3)P_3 (ver resultados en el Anexo D). No obstante, para derivar conclusiones compatibles con distintos escenarios de relevancia biológica es necesario conocer, además de los niveles de la Scn, las concentraciones de los posibles sustratos que coexisten en el sistema y su capacidad complejante de Fe(III) en esas condiciones. Desafortunadamente, la bibliografía especializada en el tema no cuenta con suficiente información fiable de este tipo.

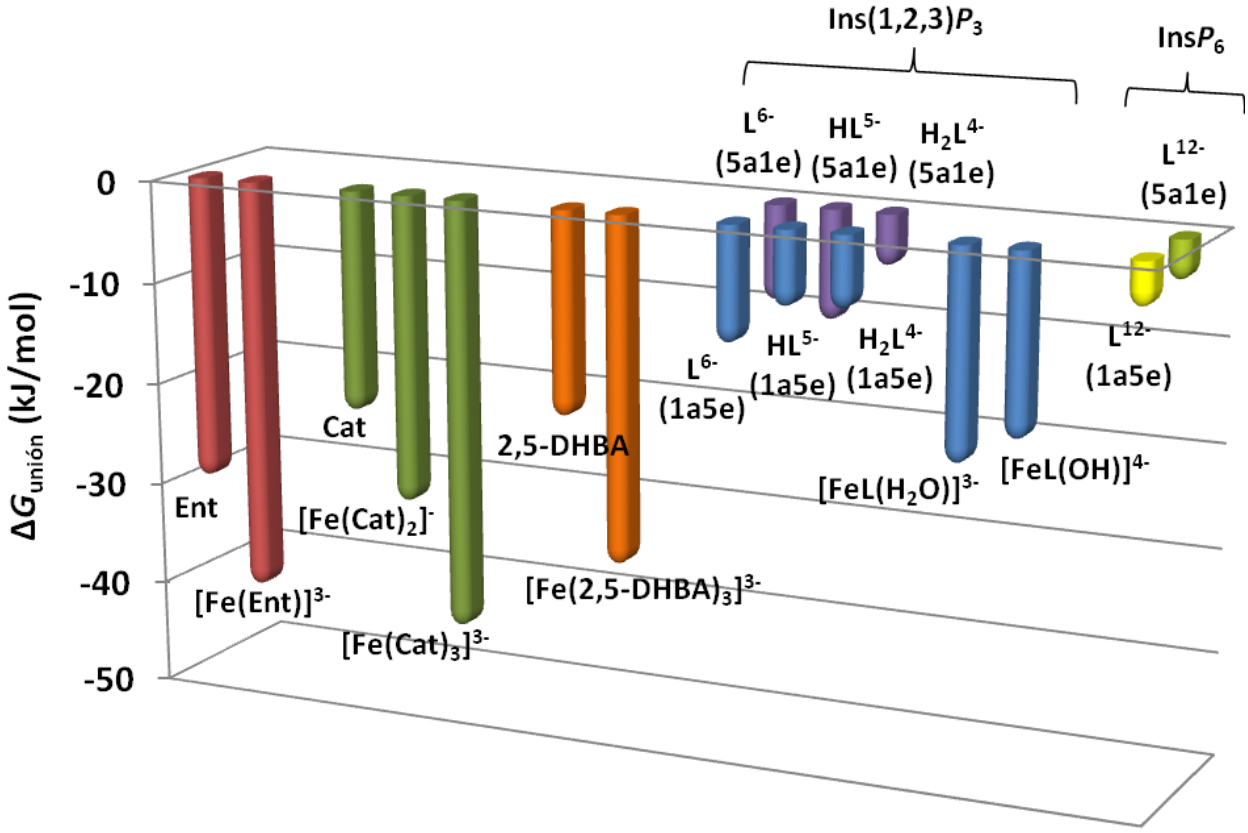


Figura 14.12. Valores del cambio en la energía libre para la formación de aductos 1:1 Scn: sustrato ($\Delta G_{unión}$), estimado por la función *Chemscore*. Los datos para los sistemas conteniendo enterobactina (Ent), catecol (Cat) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) fueron extraídos del Anexo D.

Puede racionalizarse, desde un punto de vista energético y estructural, la causa de esta menor afinidad del Ins(1,2,3)P_3 por la Scn. En principio, el sitio activo posee tres aminoácidos cargados positivamente (dos lisinas y una arginina) y otros tantos capaces de establecer enlaces de H con el sustrato. Sería lógico pensar que un anión tan cargado como el Ins(1,2,3)P_3 se vería atraído hacia estas zonas. En efecto lo hace, aunque con una menor afinidad. Si se observan detenidamente las figuras 14.10 y 14.11, se verifica que tanto el ligando como sus especies complejas ocupan parcialmente el sitio activo. La afirmación anterior se hace más clara si se comparan estas figuras con las correspondientes a la enterobactina (Anexo D), donde el sustrato interacciona con los tres lóbulos del sitio.

En busca de otras posibles causas, se realizó un cálculo de *docking* de otro inositol fosfato más voluminoso y cargado: el InsP_6 (5a1e). Dado que éste posee seis grupos fosfato y un mayor tamaño, puede de hecho cubrir gran parte del sitio activo. Como se muestra en la figura 14.13, los fosfatos intentan ocupar todos los huecos posibles entre los aminoácidos cargados positivamente, lo que da cuenta de una buena interacción electrostática. Además, se establecen enlaces de hidrógeno con varios residuos de su entorno. Se esperaría entonces un valor de $\Delta G_{\text{unión}}$ menor que para el Ins(1,2,3)P_3. Sin embargo, para ambos estados conformacionales del InsP_6 la afinidad por la siderocalina es la menor de todas las calculadas anteriormente (figura 14.12). Este fenómeno se origina, parcialmente, en el aumento de la carga negativa y el volumen molecular, que provocan una mayor repulsión electrostática y estérica con los residuos más apolares. No obstante, la disminución en la afinidad parece ser demasiado drástica para poder ser explicada solamente por este efecto.

De manera de esclarecer esta cuestión, en la figura 14.14 se desglosan los términos más importantes que componen el $\Delta G_{\text{unión}}$, estimado por la función *Chemscore* para los complejos 1:1 proteína:sustrato. Estos corresponden a tres factores: uno debido a las interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno formados ($\Delta G_{\text{enl H}}$), otro dado por las interacciones de carácter lipofílico (ΔG_{lipo}) y el último asociado a la pérdida de estados rotacionales del ligando por la unión al sitio activo (ΔG_{rot}). De ellos, los dos primeros son

usualmente negativos, por lo que aportan a la afinidad del sustrato por la proteína. El último es en general positivo, ya que corresponde a la pérdida de entropía del sistema por la inmovilización de la molécula en el sitio activo. Será entonces necesario, en valor absoluto, aumentar el $\Delta G_{\text{enl H}}$ y el ΔG_{lipo} y disminuir el ΔG_{rot} para garantizar una buena interacción.

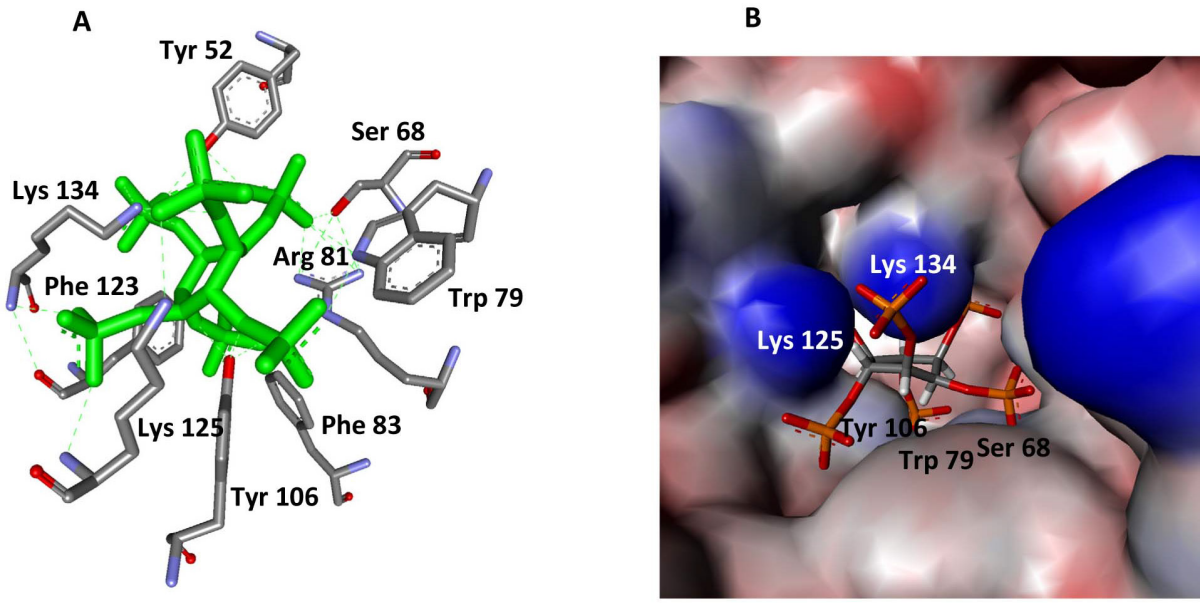


Figura 14.13. (A) Unión de la especie completamente deprotonada del InsP_6 (5a1e) a la siderocalina. En (B) se muestra el acople del sustrato al sitio activo.

Las formas libres de los inositol fosfatos poseen en solución un gran número de estados conformacionales posibles. Estos grados de libertad se reducen apreciablemente al unirse a la proteína, dando valores de ΔG_{rot} bastante grandes. Para una buena unión, el ligando debe generar interacciones polares y apolares que contrarresten este efecto. Dada la alta carga de las formas deprotonadas del Ins(1,2,3)P_3 e InsP_6, las interacciones lipofílicas con la proteína son minoritarias, mientras que las debidas a los enlaces de hidrógeno, aunque importantes, no logran compensar el efecto entrópico. En consecuencia, la afinidad resulta relativamente baja, en especial para el InsP_6.

Igualmente, la enterobactina conforma un sistema con un número grande de grados de libertad, el cual disminuye drásticamente con la unión a la

siderocalina. Sin embargo, en este caso el análisis es diferente, ya que las interacciones de tipo apolar son muy importantes, debido a la asociación de los anillos de catecol con otros sistemas apolares y aromáticos de la estructura proteica. Esto deriva en un $\Delta G_{unión}$ bastante negativo, y por tanto en una afinidad calculada mayor que para ambos Ins*P*.

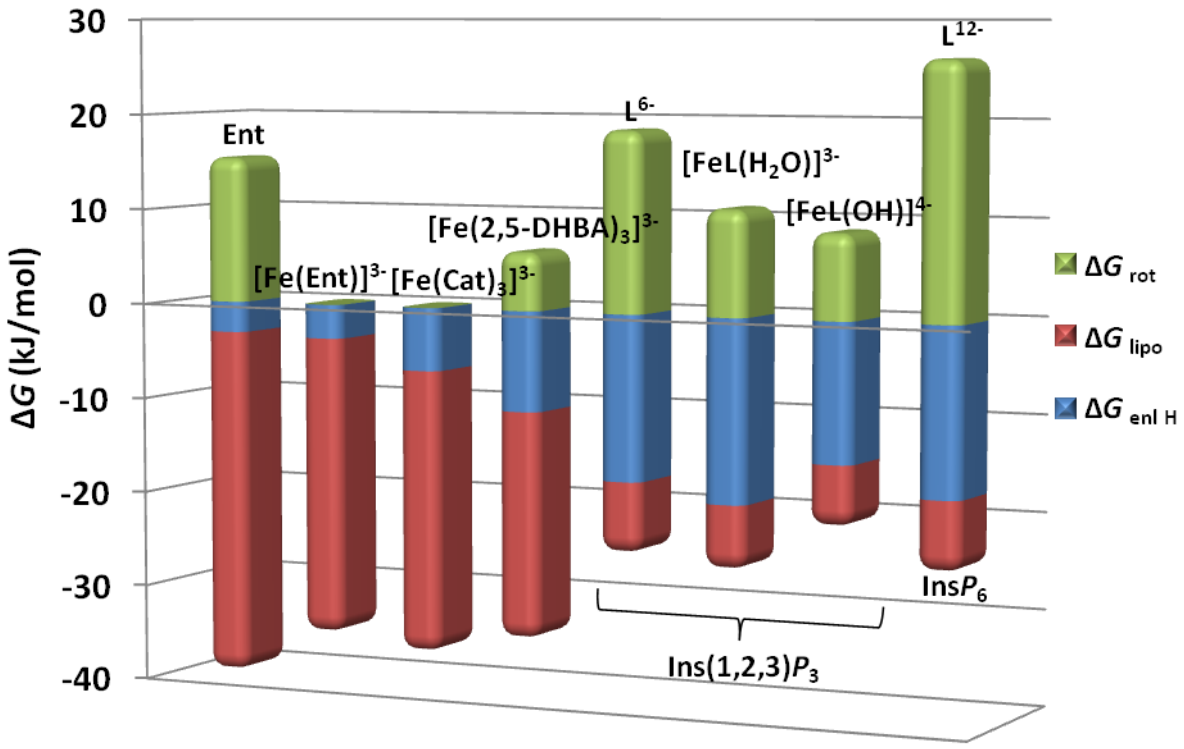


Figura 14.14. Distribución de los componentes más importantes del cambio en la energía libre de unión a la Scn para algunos sustratos, estimada por la función *Chemscore* (aductos 1:1 Scn:sustrato). ΔG_{rot} (componente rotacional), ΔG_{lipo} (componente lipofílico), $\Delta G_{enl\ H}$ (componente debido a los enlaces de hidrógeno formados).

En concordancia con lo que se observó para el sistema Scn-Ent-Fe(III) (Anexo D), parece claro que una de las funciones del metal es, en todos los casos, disminuir los grados de libertad del sustrato en solución, hacia estados conformacionales afines al sitio activo. Es así que en presencia del metal el ΔG_{rot} se reduce considerablemente, haciendo que los complejos sean más afines que las especies libres.

Por comparación directa entre los distintos sistemas surge una diferencia importante. Aquellos sustratos muy afines por la siderocalina parecen requerir de una característica genérica: grupos apolares y aromáticos. El sitio activo estaría preparado para maximizar de forma efectiva las interacciones de tipo lipofílico, mientras que no posee las características adecuadas para soportar un sustrato demasiado cargado. En este sentido, se logra explicar lo que ocurre al pasar de InsP_3 a InsP_6. No sólo se necesita aumentar el tamaño para mejorar la afinidad, también se deben establecer las interacciones complementarias (apolar o polar) según la estructura del sitio activo.

Es entonces interesante determinar qué tipo de estructuras son necesarias en el sitio activo de una proteína para aumentar la afinidad por los inositol fosfatos. Para esto, se realizó el estudio de *docking* de las formas completamente deprotonadas del Ins(1,2,3)P_3 e InsP_6, en ambos estados conformacionales, a una proteína que posee gran afinidad por ellos: la fitasa del *Aspergillus niger*. Las fitasas (*myo*-inositolhexakisfosfato fosfohidrolasas) son capaces de reconocer al InsP_6 e hidrolizar los grupos fosfatos con ciertas preferencias de posición sobre el anillo dependiendo del tipo de enzima. Estas proteínas pueden de hecho desfosforilar secuencialmente varios inositol fosfatos, hasta llegar a los correspondientes inositol monofosfatos. Las fitasas extracelulares no se encuentran presentes en plantas y animales, por lo que son aisladas comúnmente de bacterias y hongos. Actualmente, son muy importantes a nivel industrial debido a que se comercializan como aditivos para alimentos, en un esfuerzo por mejorar la calidad nutricional de la dieta de animales monogástricos [2].

Los miembros de la familia de las fitasas que poseen selectividad por la posición 3 del anillo de inositol poseen un sitio activo bastante conservado en la evolución (figura 14.15). Dos dominios, uno α/β y otro α, se acoplan para dar lugar al sitio activo, capaz de ejercer su acción catalítica sobre el sustrato y a la vez unir temporalmente el producto saliente. Los residuos aminoacídicos del sitio activo se encuentran dispersos entre ambos dominios, aunque mayoritariamente se ubican sobre el α/β.

El proceso de desfosforilación ocurre en dos etapas bien diferenciadas. En primer lugar se forma un intermediario de fosfohistidina, a través del ataque

nucleofílico del aminoácido His 59 sobre el fosfato en C3 del inositol fosfato. En una segunda fase, se hidroliza esta fosfamida, y el producto es protonado sobre el oxígeno del carbono C3, para luego liberarse al medio. Esta adición de un protón se realiza a través de la asistencia del residuo Asp 339, ubicado cerca del sitio catalítico [2]. Asimismo, el resto de los residuos que se muestran en la figura 14.15 están implicados en mayor o menor medida en el proceso de desfosforilación, uniendo el ligando y anclándolo a la proteína.

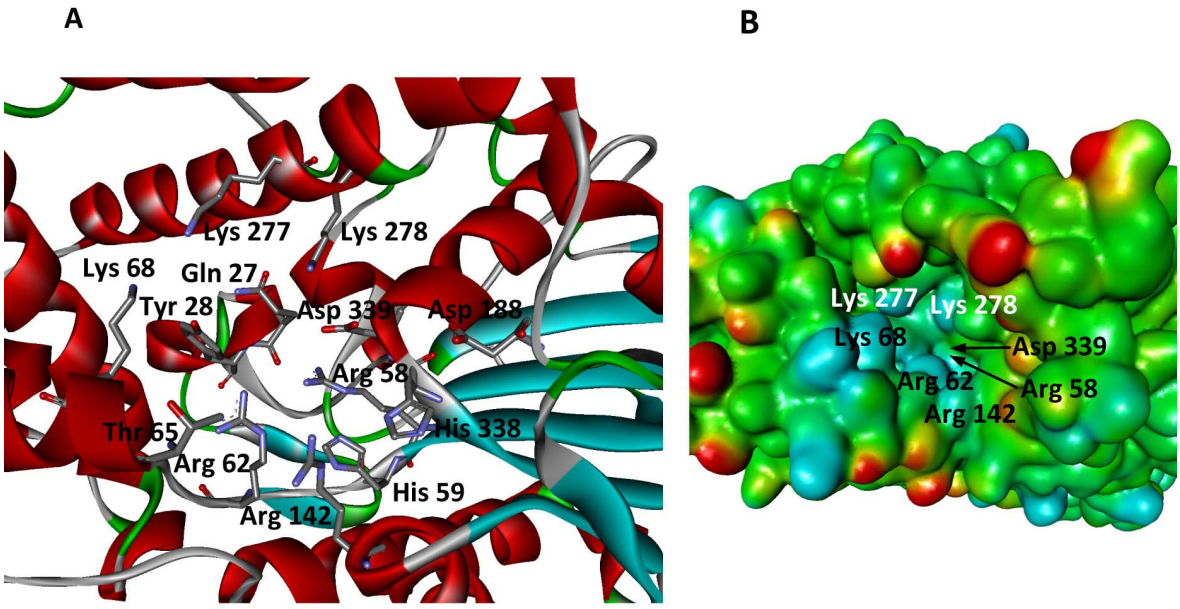


Figura 14.15. Representación esquemática de la Fitasa del *Aspergillus niger*. Se muestran a la izquierda los residuos aminoacídicos del sitio activo. A la derecha, una representación de la carga parcial sobre una superficie generada por el solapamiento de las esferas de Van der Waals (zonas de densidad de carga positiva en celeste y negativa en rojo).

En la figura 14.16 se muestra esquemáticamente el resultado de los estudios de *docking* de ambas conformaciones del InsP_6 completamente deprotonado al sitio activo de la Fitasa del *A. niger.* Ambos estados conformacionales interaccionan con la mayoría de los residuos expuestos en el sitio activo, tanto a través de uniones de tipo electrostático como por enlaces de hidrógeno. Para ambas conformaciones el fosfato en C3 se dirige hacia el sitio donde se espera se produzca el ataque nucleofílico, como parte del proceso de defosforilación catalizado por la enzima.

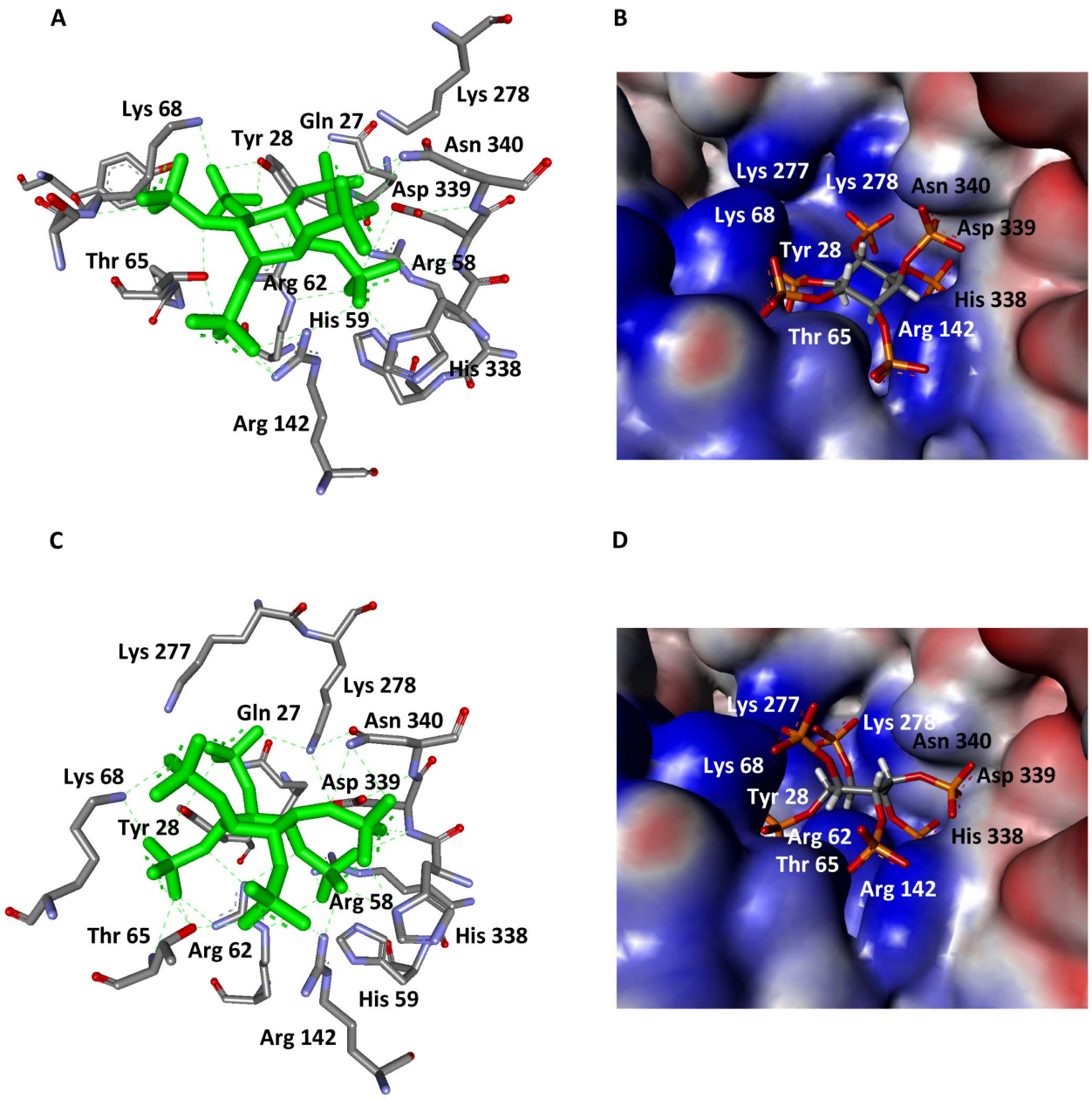


Figura 14.16. Unión de la especie L^{12-} del InsP_6 a la Fitasa del *A. niger*: (A) conformación 1a5e, (B) conformación (5a1e). En (B) y (D) se muestra el acople de los sustratos al sitio activo.

En contraposición a estos resultados, ha sido reportado que la conformación 5a1e no es adecuada desde el punto de vista topológico para unirse al sitio [2]. Esta conclusión se deriva de la estructura cristalina de la fitasa del *A. niger* con un sustrato bloqueante, el myo-inositolhexakissulfato (IHS), el cual se presenta asociado en la conformación 1a5e. Sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestran lo contrario, y el estado 5a1e se une incluso con un $\Delta G_{unión}$

levemente menor que el estado 1a5e (ver tabla 14.2), interaccionando con residuos que se encuentran más lejos del sitio de unión (Lys 277). Es probable que dadas las condiciones de cristalización levemente ácidas, la conformación predominante del IHS en solución sea la 1a5e, por lo que es la forma en que aparece finalmente en la estructura cristalina. Esto no debería descartar a las especies 5a1e del ligando como estados conformacionales igualmente efectivos a la hora de asociarse con esta proteína.

Analizando más en detalle la figura 14.16, se advierten ciertas características de la estructura proteica que se relacionan directamente con el mecanismo de acción de la fitasa. En rasgos generales, existe una gran densidad de carga positiva extendida a lo largo de todo el sitio activo. En efecto, esta zona puede dividirse en una mitad dominada por lisinas (68, 277, 278) y otra delimitada por argininas (62, 142, 58). Es muy probable que estos aminoácidos cargados positivamente posean la función principal de dirigir el sustrato directamente hasta el sitio activo, donde la lisina 62 ancla el anillo de inositol. Asimismo, otros aminoácidos son capaces de formar enlaces de hidrógeno (Tyr 28, Gln 27, Asp 339, Asn 340, Asp 188, Thr 65) y aferran el sustrato a la proteína con la orientación adecuada para ser procesado. La Arg 142 y la Thr 65 actúan como una gran "pinza" que inmoviliza el grupo fosfato en C1. Del mismo modo, la Asn 340 se asocia al grupo fosfato en C2, y otros residuos como la Lys 65 y Gln 27 se encargan de unir a los fosfatos en posición 5/6 y 4 respectivamente. Finalmente, la His 338 redirige el fosfato en C3 hacia la His 339, de forma de facilitar el ataque nucleofílico.

La tabla 14.2 resume los valores del cambio en la energía libre del sistema por la unión de ambas conformaciones del Ins(1,2,3)P_3 e InsP_6 al sitio activo de la siderocalina o la fitasa (aductos 1:1 proteína:sustrato). El $\Delta G_{\text{unión}}$ disminuye entre tres y cinco veces al pasar de la primera proteína a la segunda. Claramente, la fitasa es sustancialmente más efectiva que la siderocalina para unir ambos inositol fosfatos.

Para conocer más en detalle la causa de esta gran diferencia en la capacidad de unión es necesario analizar los diversos componentes que contribuyen en mayor medida a los valores de $\Delta G_{\text{unión}}$. En la figura 14.17 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 14.2. Valores estimados de $\Delta G_{unión}$ para los sistemas Fitasa-inositol fosfato y Scn-inositol fosfato (aductos 1:1 proteína:sustrato).

		$\Delta G_{unión}$(kJ/mol)	
		Siderocalina	Fitasa
Ins(1,2,3)P_3	L^{6-} (1a5e)	-11,1	-30,9
	L^{6-} (5a1e)	-9,10	-26,1
InsP_6	L^{12-} (1a5e)	-4,21	-19,6
	L^{12-} (5a1e)	-3,80	-25,2

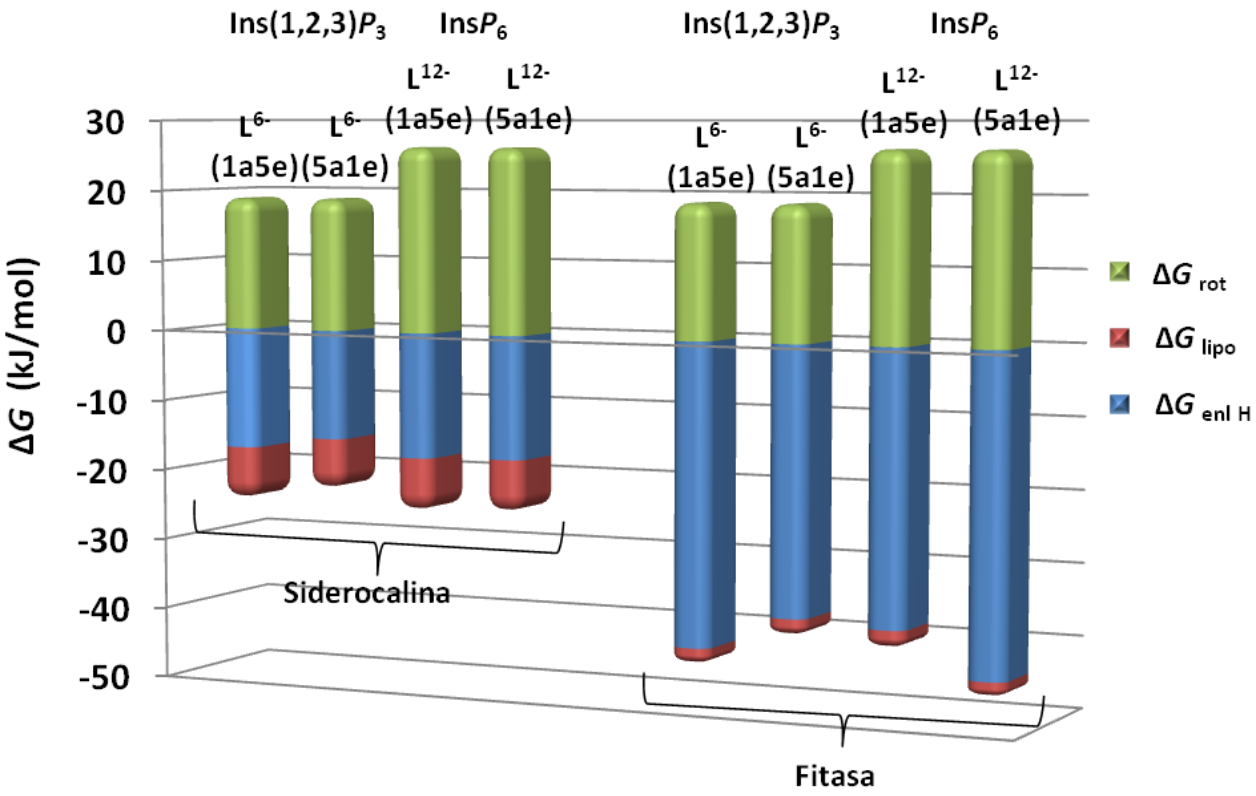


Figura 14.17. Distribución de los componentes más importantes del cambio en la energía libre de unión de algunos sustratos a la siderocalina y a la Fitasa del *Aspergillus niger*, estimada por la función *Chemscore* (aductos 1:1 proteína:sustrato). ΔG_{rot} (componente rotacional), ΔG_{lipo} (componente lipofílico), $\Delta G_{enl\ H}$ (componente debido a los enlaces de hidrógeno formados).

A diferencia de lo que ocurría con la siderocalina, en el caso de la fitasa los valores positivos del término debido a la pérdida de grados de libertad rotacionales son contrarrestados, en gran medida, por los términos asociados a las interacciones lipofílicas y polares. Esto provoca una disminución marcada en los valores de $\Delta G_{unión}$, estabilizando el aducto proteína-sustrato. Asimismo, la interacción de tipo lipofílica se ve minimizada, dado que el sitio activo de la fitasa carece casi por completo de residuos apolares dirigidos hacia el sustrato, lo que permite maximizar las interacciones de tipo electrostáticas y por enlaces de hidrógeno. En efecto, el número de aminoácidos de cadena polar y cargada presentes en el sitio activo de la fitasa (Tyr 28, Gln 27, Asp 339, Asn 340, Asp 188, Thr 65, Lys 68, Lys 277, Lys 278, Arg 62, Arg 142, Arg 58, His 338, His 339), supera por amplio margen a aquel correspondiente al sitio de unión de la siderocalina (Lys 125, Lys 134, Tyr 106, Tyr 138, Tyr 52, Ser 68, Thr 54, Arg 81). Adicionalmente, mientras que en el sitio activo de la fitasa no se presentan aminoácidos apolares, en la siderocalina existen algunos residuos apolares en contacto con el sustrato, como Trp 79, Phe 123 y Phe 83, los que poseen alta densidad de carga negativa deslocalizada en el sistema aromático.

Parece factible que la fitasa haya evolucionado hacia la generación de un sitio activo altamente cargado, en un intento por minimizar las interacciones lipofílicas que no son efectivas para unir sustratos tan cargados como los inositol fosfatos. Este espacio habrá sido utilizado para la ubicación de residuos cargados o polares que, ubicados estratégicamente a lo largo de todo el sitio de unión, anclen los grupos fosfato del sustrato y maximicen las interacciones de tipo electrostático y de enlaces de hidrógeno (figura 14.16). En esta carrera evolutiva, por el contrario, la siderocalina habría conseguido maximizar las interacciones apolares en el aducto, de forma de atraer sustratos con grupos aromáticos, como la enterobactina o su complejo de hierro. Para no perder selectividad hacia este tipo de moléculas apolares, habría preferido dejar sólo tres residuos cargados positivamente, dos lisinas y una arginina, de forma de anclar estos anillos aromáticos en ciertas posiciones estratégicas, mientras que el resto de los residuos apolares maximizan las interacciones de tipo lipofílico (ver Anexo D).

4. Conclusiones

En este capítulo se presentaron y discutieron, desde un punto de vista práctico, los resultados del modelado del comportamiento químico y estructural de los sistemas conteniendo InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 o Ins(1,2,3)P_3, en escenarios que simulan algunos sistemas biológicos, como los medios extracelular e intracelular de distintos organismos.

Con respecto al ion K^+, en condiciones 1:1 metal:Ins*P* el Ins(1,2,3)P_3 exhibe la interacción más fuerte en todo el rango de pH analizado. En presencia de exceso de ion metálico (100:1 K^+:Ins*P*), es el fitato el que presenta la interacción metal-ligando más fuerte. De entre los Ins*P* considerados, el que se une más fuertemente al ion magnesio es el InsP_6, formando los complejos aniónicos 1:1 metal:ligando y la especie neutra soluble [$Mg_5(H_2L)$]. Por su parte, la interacción con el ion Fe^{3+} es muy intensa para los tres inositol fosfatos. Sin embargo, por encima de pH neutro el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se convierte en el agente quelante de Fe^{3+} más efectivo dentro de los ligandos considerados, especialmente en comparación con el fitato. Estos resultados sugieren que el arreglo "123-trisfosfato" no es necesario para una alta afinidad Fe(III)-Ins*P*.

Mediante el uso de la información termodinámica recabada en esta tesis en un medio no interactuante, fue posible estudiar la competencia entre el ion Li^+ y el ion Mg^{2+} por el InsP_6, en el contexto del uso farmacéutico del catión alcalino. No se detecta asociación metal-ligando en condiciones citosólico-nucleares, por lo que, *in vivo*, la interacción del ion Li^+ con el InsP_6 sería muy poco relevante.

En el núcleo y citosol el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se espera asociado parcialmente al ion Mg^{2+}; el resto del ligando permanece, en su mayoría, en forma libre, mientras que una pequeña fracción se predice unida al catión K^+. La moderada interacción con el ion Mg^{2+} que exhibe el Ins(1,3,4,5,6)P_5, aunado a la alta concentración intracelular que posee este último, causan que, en presencia de concentraciones intracelulares de Fe^{3+}, se detecte una asociación completa metal-ligando. A nivel de los eritrocitos de tortugas y aves, que contienen concentraciones inusualmente altas de Ins(1,3,4,5,6)P_5, los resultados obtenidos predicen que el total del ligando presente se encuentra solubilizado, en forma de una mezcla de especies libres y complejas con K^+ y Mg^{2+}. Esta

evidencia sugiere que en estos eritrocitos, desde un punto de vista evolutivo, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 podría haber sido seleccionado entre sus congéneres fosforilados, en parte, como consecuencia de su significativa solubilidad en presencia del ion Mg^{2+}. Incluso en condiciones de mayor concentración de iones metálicos, como en el medio extracelular, el modelado del sistema muestra que el ligando se encuentra predominantemente como una mezcla soluble de los complejos $[Ca_4(H_2L)]$ (93 %) y $[Mg_4(H_2L)]$ (6 %). En consecuencia, las propiedades fisicoquímicas del Ins(1,3,4,5,6)P_5 permitirían la existencia de un *pool* significativo de especies solubles derivadas, no unidas a proteínas, tanto en medio extracelular como en compartimentos intracelulares ácidos.

En ausencia de Fe(III) y a pH del núcleo y citosol celulares, el Ins(1,2,3)P_3 se encuentra en parte libre (30,3 %) y en parte asociado con K^+ (51,9 %) y Mg^{2+} (17,8 %). En el rango de pH asociado con compartimentos vesiculares ácidos, este InsP_3 se predice esencialmente libre, aunque una parte se encontraría unido directamente al ion K^+. Las superficies de potencial electrostático de las especies libres del ligando muestran, en ambos casos, una fuerte localización de carga hacia el extremo de la molécula donde se encuentran esterificados los tres grupos fosfato. Esta es la causa de que el Ins(1,2,3)P_3 interaccione con los iones alcalinos más fuertemente que el fitato, incluso cuando para este último se detectan, en las mismas condiciones, especies aniónicas mucho más cargadas. En las mismas condiciones pero en presencia de cantidades equimolares de hierro(III), la asociación calculada Fe^{3+}-Ins(1,2,3)P_3 es completa. No se detectan formas del metal o del ligando libres o asociadas con Mg^{2+}. Si el Ins*P* se encontrara en exceso, éste se espera constituido por formas libres y/o complejas asociadas en cierto grado con los cationes predominantes en el medio, K^+ y Mg^{2+}. Del análisis realizado se desprende que, a nivel intracelular, los complejos predominantes del Ins(1,2,3)P_3 en presencia de Fe(III) son $[FeL]^{3-}$ y $[Fe(OH)L]^{4-}$. La característica más importante en los dos casos es la presencia de un grupo OH^- no lábil directamente unido al centro metálico. El hierro capturado por el Ins(1,2,3)P_3 es, desde el punto de vista termodinámico, asequible a la calceina, por lo que podría formar parte del *pool* de hierro lábil intracelular. En suma, el Ins(1,2,3)P_3 parece contar con las características

fisicoquímicas adecuadas para ser considerado dentro de la lista de candidatos a sideróforos intracelulares "seguros" del *pool* de hierro lábil.

Se analizaron mediante estudios de *docking* proteína-ligando los aductos formados por la siderocalina o la fitasa del *Aspergillus niger* y varios sustratos (enterobactina, catecol, 2,5-DHBA, Ins(1,2,3)P_3 e InsP_6), en ausencia y en presencia de hierro(III). En condiciones equimolares de sustrato y proteína, la afinidad de ambos inositol fosfatos y los complejos Fe^{3+}-Ins(1,2,3)P_3 por la Scn es igual o menor que la que exhiben los sustratos aromáticos evaluados. En contraposición, en las mismas condiciones la unión de ambos inositol fosfatos al sitio activo de la fitasa del *Aspergillus niger* resulta varias veces más efectiva. En este caso, el sitio activo posee una arquitectura mucho más adecuada, constituyendo un único lóbulo rodeado de aminoácidos cargados positivamente (lisinas y argininas). Los factores que caracterizan la interacción sustrato-proteína en sistemas conteniendo inositol fosfatos son: la pérdida de grados de libertad del sustrato, las interacciones electrostáticas y polares, y las interacciones de tipo lipofílico.

Dado que en términos absolutos existe una buena interacción entre la siderocalina y las especies derivadas del Ins(1,2,3)P_3, podría ser posible que éste constituya la base química de algunos de los sideróforos putativos en mamíferos asociados a la Scn. No obstante, la afinidad de la Scn por otros ligandos aromáticos (o sus complejos con Fe(III)) ensayados es igual o mayor. Dado que se desconocen con exactitud, en la mayoría de los casos, los niveles fisiológicos y la afinidad por el hierro de estas biomoléculas, no es posible al momento la realización de un análisis termodinámico completo en sistemas biológicos.

5. Referencias bibliográficas

1. Goetz, D. H.; Holmes, M. A.; Borregaard, N.; Bluhm, M. E.; Raymond, K. N.; Strong, R. K. *Molecular Cell* **2002,** *10*, 1033-1043.
2. Oakley, A. J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010,** *397*, 745-749.
3. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *Journal of Molecular Biology* **1997,** *267*, 727-748.
4. *Discovery Studio Visualizer,* version 2.5.5.9350; Accelrys Software Inc.: 2009

5. Clifton, M. C.; Pizarro, J. C.; Abergel, R.; Hoette, T. M.; Vigdorovich, V.; Raymond, K.; Strong, R. K. Structural characterization of the binding calyx in the anti-microbial protein Siderocalin. Unpublished Work, 2011.
6. Bao, G.; Clifton, M.; Hoette, T. M.; Mori, K.; Deng, S. X.; Qiu, A.; Viltard, M.; Williams, D.; Paragas, N.; Leete, T.; Kulkarni, R.; Li, X.; Lee, B.; Kalandadze, A.; Ratner, A. J.; Pizarro, J. C.; Schmidt-Ott, K. M.; Landry, D. W.; Raymond, K. N.; Strong, R. K.; Barasch, J. *Nature Chemical Biology* **2010,** *6*, 602-609.
7. Veiga, N.; Torres, J.; Domínguez, S.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100*, 1800-1810.
8. Torres, J.; Domínguez, S.; Cerdá, M. F.; Obal, G.; Mederos, A.; Irvine, R. F.; Díaz, A.; Kremer, C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005,** *99*, 828-840.
9. Harwood, A. J.; Agam, G. *Biochemical Pharmacology* **2003,** *66*, 179-189.
10. Abraha, A.; De Freitas, D. E.; Castro, C. A.; Geraldes, C. F. G. C. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1991,** *42*, 191-198.
11. Brown, G. S.; Hawk, R. M.; Komoroski, A. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1993,** *49*, 1-8.
12. Mota de Freitas, D.; Amari, L.; Srinivasan, C.; Rong, Q.; Ramasamy, R.; Abraha, A.; Geraldes, C. F. G. C.; Boyd, M. K. *Biochemistry* **1994,** *33*, 4101-4110.
13. Lam, H. R.; Christensen, S. *Journal of Neurochemistry* **1992,** *59*, 1372-1380.
14. Marcus, W. L. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* **1994,** *13*, 73-79.
15. Hashemi, J.; Kheirabadi, G.; Movahedian, A. *Journal of Research in medical Sciences* **2006,** *11*, 257-262.
16. Stuart, J. A.; Anderson, K. L.; French, P. J.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **1994,** *303*, 517-525.
17. Miller, A. L.; Suntharalingam, M.; Johnson, S. L.; Audhya, A.; Emr, S. D.; Wente, S. R. *Journal of Biological Chemistry* **2004,** *279*, 51022-51032.
18. French, P. J.; Bunce, C. M.; Stephens, L. R.; Lord, J. M.; McConnell, F. M.; Brown Creba, G. J. A.; Michell, R. H. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **1991,** *245*, 193-201.
19. Bunce, C. M.; French, P. J.; Allen, P.; Mountford, J. C.; Moor, B.; Greaves, M. F.; Michell, R. H.; Brown, G. *Biochemical Journal* **1993,** *289*, 667-673.
20. Barker, C. J.; Wright, J.; Hughes, P. J.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **2004,** *380*, 465-473.
21. Wu, M. M.; Llopis, J.; Adams, J. M.; McCaffery, M. S.; Kulomaa, T. E.; Machen, T. E.; Moore, H. P.; Tsien, R. Y. *Chemistry and Biology* **2000,** *7*, 197-209.
22. Grubbs, R. D. *BioMetals* **2002,** *15*, 251-259.
23. Gao, Y.; Wang, H. Y. *Journal of Biological Chemistry* **2007,** *282*, 26490-26502.
24. Bartlett, G. R. *Comparative Biochemistry and Physiology* **1976,** *55*, 211-214.
25. Villar, J. L.; Puigbo, P.; Riera-Codina, M. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **2003,** *135*, 169-175.
26. Irvine, R. F.; Schell, M. J. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001,** *2*, 327-338.
27. Günther, T. *Magnesium Research* **2007,** *20*, 161-167.
28. Grases, F.; Simonet, B. M.; Prieto, R. M.; March, J. G. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2001,** *12*, 595-601.
29. Barker, C. J.; French, P. J.; Moore, A. J.; Nilsson, T.; Berggren, P. O.; Bunce, C. M.; Kirk, C. J.; Michell, R. H. *Biochemical Journal* **1995,** *306*, 557-564.
30. Petrat, F.; de Groot, H.; Rauen, U. *Biochemical Journal* **2001,** *356*, 61-69.
31. Tenopoulou, M.; Kurtz, T.; Doulias, P. T.; Galaris, D.; Brunk, U. T. *Biochemical Journal* **2007,** *403*, 261-266.
32. Yu, Z.; Persson, H. L.; Eaton, J. W.; Brunk, U. T. *Free Radical Biology and Medicine* **2003,** *34*, 1243-1252.
33. Yu, J.; Leibiger, B.; Yang, S. N.; Caffery, J. J.; Shears, S. B.; Leibiger, I. B.; Barker, C. J.; Berggren, P. O. *Journal of Biological Chemistry* **2003,** *278*, 46210-46218.
34. Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1984,** *259*, 3620-3624.
35. Thomas, F.; Serratrice, G.; Beguin, C.; Saint Aman, E.; Pierre, J. L.; Fontecave, M.; Laulhere, J. P. *Journal of Biological Chemistry* **1999,** *274*, 13375-13383.
36. Andrews, N. C. *Blood* **2008,** *112*, 219-230.
37. Theil, E. C.; Goss, D. J. *Chemical Reviews* **2009,** *109*, 4568-4579.
38. Iwahashi, H.; Morishita, H.; Ishii, T.; Sugata, R.; Kido, R. *Journal of Biochemistry* **1989,** *105*, 429-434.
39. Rouault, T. A.; Tong, W. H. *Trends in Genetics* **2008,** *24*, 398-407.

40. Li, J. Y.; Paragas, N.; Ned, R. M.; Qiu, A.; Viltard, M.; Leete, T.; Drexler, I. R.; Chen, X.; Sanna-Cherchi, S.; Mohammed, F.; Williams, D.; Lin, C. S.; Schmidt-Ott, K. M.; Andrews, N. C.; Barasch, J. *Developmental Cell* **2009,** *16*, 35-46.
41. Levy, J. E.; Jin, O.; Fujiwara, Y.; Kuo, F.; Andrews, N. C. *Nature Genetics* **1999,** *21*, 396-399.
42. Gunshin, H.; Fujiwara, Y.; Custodio, A. O.; Direnzo, C.; Robine, S.; Andrews, N. C. *Journal of Clinical Investigation* **2005,** *115*, 1258-1266.
43. Breuer, W.; Shvartsman, M.; Cabantchik, Z. I. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2008,** *40*, 350-354.
44. Fernandez-Pol, J. A. *Cell* **1978,** *14*, 489-499.
45. Jones, R. L.; Peterson, C. M.; Grady, R. W.; Cerami, A. *Journal of Experimental Medicine* **1980,** *151*, 418-428.
46. Akerstrom, B.; Flower, D. R.; Salier, J. P. *Biochimica et biophysica acta* **2000,** *1482*, 1-8.
47. Devireddy, L. R.; Gazin, C.; Zhu, X.; Green, M. R. *Cell* **2005,** *123*, 1293-1305.
48. Flo, T. H.; Smith, K. D.; Sato, S.; Rodríguez, D. J.; Holmes, M. A.; Strong, R. K.; Akira, S.; Aderem, A. *Nature* **2004,** *432*, 917-921.
49. Yang, J.; Goetz, D. H.; Li, J. Y.; Wang, W.; Mori, K.; Setlik, D.; Du, T.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Strong, R. K.; Barasch, J. *Molecular Cell* **2002,** *10*, 1045-1056.
50. Yang, J.; Mori, K.; Li, J. Y.; Barasch, J. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **2003,** *285*, F9-F18.
51. Kaplan, J. *Cell* **2002,** *111*, 603-606.
52. Ong, S. T.; Ho, J. Z. S.; Ho, B.; Ding, J. L. *Immunobiology* **2006,** *211*, 295-314.
53. Jurado, R. L. *Clinical Infectious Diseases* **1997,** *25*, 888-895.
54. Devireddy, L. R.; Teodoro, L. R.; Richard, F. A.; Green, M. R. *Science* **2001,** *293*, 829-834.
55. Richardson, D. R. *Cell* **2005,** *123*, 1175-1177.
56. Schmidt-Ott, K. M.; Mori, K.; Li, J. Y.; Kalandadze, A.; Cohen, D. J.; Devarajan, P.; Barasch, J. *Journal of the American Society of Nephrology* **2007,** *18*, 407-413.
57. Devireddy, L. R.; Hart, D. O.; Goetz, D. H.; Green, M. R. *Cell* **2010,** *141*, 1006-1017.
58. Graf, E.; Empson, K. L.; Eaton, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1987,** *262*, 11647-11650.
59. Hawkins, P. T.; Poyner, D. R.; Jackson, T. R.; Letcher, A. J.; Lander, D. A.; Irvine, R. F. *Biochemical Journal* **1993,** *294*, 929-934.
60. Phillippy, B. Q.; Graf, E. *Free Radical Biology and Medicine* **1997,** *22*, 939-946.
61. Spiers, I. D.; Barker, C. J.; Chung, S. K.; Chang, Y. T.; Freeman, S.; Gardiner, J. M.; Hirst, P. H.; Lambert, P. A.; Michell, R. H.; Poyner, D. R.; Schwalbe, C. H.; Smith, A. W.; Solomons, K. R. H. *Carbohydrate Research* **1996,** *282*, 81-99.
62. Abergel, R. J.; Clifton, M. C.; Pizarro, J. C.; Warner, J. A.; Shuh, D. K.; Strong, R. K.; Raymond, K. N. *Journal of the American Chemical Society* **2008,** *130*, 11524-11534.

Capítulo 15

Especiación química de inositol fosfatos a nivel gastrointestinal

Como capítulo final de este trabajo se presentan los resultados de la especiación química de algunos inositol fosfatos a nivel gastrointestinal, a partir del uso de los datos termodinámicos recabados en esta tesis y otros adquiridos de fuentes externas. Se comienza planteando las características más sobresalientes del estado del arte en la temática, las que contextualizan la relación existente, en dietas de base vegetal, entre el fitato (y sus congéneres) y la biodisponibilidad de algunos minerales esenciales. Se presenta luego la metodología de trabajo, detallando el abordaje cuantitativo realizado, a través de la generación de una gran base de datos nutricionales y de composición de los fluidos del tracto gastrointestinal, además de los algoritmos necesarios para procesar esta información. Se culmina con la discusión de los resultados obtenidos para un tipo de sistema en particular: leche y cereal, analizando cómo el nivel de ingesta y la composición alimenticia afectan la especiación química de algunos InsP e iones metálicos como Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} y $Fe^{2+/3+}$, componentes que contribuyen a la calidad nutricional de la dieta.

1. Introducción
    1.1. El fitato en el reino vegetal: las fitinas

El InsP_6 forma en el reino vegetal depósitos sólidos que se encuentran en compartimientos vesiculares. Dichos depósitos son especialmente abundantes en las semillas (1 a 2 % en peso en cereales y oleaginosas), en las que el InsP_6 constituye la forma química principal de fósforo (60 a 90 % del fósforo total). Se acepta, en este contexto, que el papel del InsP_6 es contribuir al almacenamiento de fósforo, minerales e inositol, factores para la suplementación de las necesidades biosintéticas de los tejidos en crecimiento durante el período de germinación [1-6].

Los depósitos sólidos formados por el fitato son sales de cationes mono y divalentes cristalizadas en regiones discretas de granos y semillas. Se acumulan rápidamente durante el período de maduración, acompañándose de otras sustancias como almidón, proteínas y lípidos. En las dicotiledóneas, los fitatos están en el tejido embrionario[7]. Los fitatos con esta localización contienen Mg, K y en ciertos casos, Ca. En *Arabidopsis thaliana*, aparecen también fitatos de Mn, Ca y Zn en su endospermo transitorio[8]. Estos depósitos son movilizados durante la maduración del embrión, yendo el Mn (y presumiblemente también el Zn) a formar parte de las metaloenzimas. En las semillas de las plantas monocotiledóneas, además de en el embrión, aparecen depósitos de fitato en la aleurona [9]. Mientras que en los granos pequeños (arroz, trigo, centeno), más del 80 % del fitato está en la aleurona, en el maíz la mayoría del fitato está en el embrión[9,10]. Así, en los productos alimenticios en base a trigo, arroz y centeno, la refinación de la harina y otros derivados del grano implica la exclusión de la mayor parte del fitato; e inversamente, los productos "integrales" contienen casi la totalidad del fitato de la semilla.

La sal o mezcla de sales de fitato presentes en los productos vegetales toma el nombre genérico de fitina. Dados los resultados presentados en esta tesis, es probable que la fitina sea una mezcla de compuestos y, como se mencionó, los cationes presentes en ella varían. Las mayores variaciones se pueden observar entre especies. Por ejemplo, la fitina contiene potasio y magnesio en semillas de arroz y sésamo, pero se presenta como sal de calcio, magnesio y potasio en granos de soja y trigo [11,12]. Incluso hay variaciones en la composición de la fitina entre los globoides del embrión y de la aleurona en una misma especie [9,10]. Algunos estudios han abordado el tema de esclarecer las especies químicas en las que se encuentra el fitato en estos sólidos de reserva [13,14]. No obstante, sólo se ha evidenciado la presencia, en algunos tipos de semillas, de especies InsP_6-metal solubles en agua, en conjunto con otras sales de fitato altamente insolubles[15].

1.2. El fitato y su influencia en la bioaccesibilidad de minerales

Para los animales que se nutren de productos vegetales (cereales y legumbres en particular), los fitatos constituyen una enorme fuente de macronutrientes elementales, en particular fósforo, magnesio y potasio. Sin embargo, el InsP_6 ha

sido categorizado por gran parte de la comunidad científica como un componente antinutricional para animales y seres humanos. Esto se debe, principalmente, a su gran capacidad de unión con iones metálicos, proteínas y almidón, alterando dramáticamente la solubilidad, y por tanto la capacidad de digestión y absorción de estos componentes alimenticios por parte de los animales. Los efectos negativos más serios del fitato sobre la salud humana se asocian a la interferencia con la absorción de Fe y Zn, los dos principales micronutrientes deficitarios a nivel mundial[16]. Estos problemas son más pronunciados en personas con dietas de subsistencia marginal, basadas únicamente en semillas, granos y frutas. Así, el fitato constituye un problema muy relevante, en un contexto mundial actual donde más de mil millones de seres humanos, mayoritariamente localizados en países en vías de desarrollo, presentan deficiencias en micronutrientes. Esta relevancia se ve aumentada por el acelerado crecimiento de la población mundial, aunado al continuo incremento en la producción de "alimentos verdes" [4,17-21].

El efecto del fitato en la bioaccesibilidad de los minerales ha sido el foco de numerosas investigaciones y la publicación de varios artículos de revisión [22-29]. Una abundante literatura científica indica que la presencia de fitatos disminuye la captación de elementos como el Ca, Fe y Zn en los tractos digestivos monogástricos [30-32]. La problemática, tanto humana como animal, está asociada mayoritariamente a la ingesta de cereales. La cantidad de fitato en distintos tipos de cereales es variable pero puede llegar a ser superior al 1 %. Si bien la ingesta diaria promedio de fitato puede variar, dependiendo de la dieta, la estación, la edad, etc., promedialmente se sitúa en unos 750 mg por día y por persona, aunque puede alcanzar valores tan altos como 3000 mg diarios [11].

1.2.1. Influencia en la absorción de Zn

El cinc es un metal esencial cuya deficiencia produce innumerables trastornos, como retraso del crecimiento, pérdida del apetito, alteraciones cutáneas y anomalías inmunológicas [33]. Ha sido descrito en la literatura como el mineral esencial más afectado en su absorción por el fitato[32,34] y la relación fitato:Zn se ha propuesto como indicador de su biodisponibilidad [35]. Sin embargo, estos indicadores dietarios son dependientes de la metodología analítica empleada[36]. Además del fitato, se acepta que los Ins*P* pentafosforilados contribuyen a la

baja en la absorción del Zn a nivel intestinal, mientras que los miembros de menor grado de fosforilación serían relativamente inertes en este contexto[37,38]. Basados en datos de estudios más recientes, algunos autores han propuesto que un nivel adecuado de cinc puede mantenerse con dietas con una relación [fitato]/[Zn] de 15 o menor, siempre que la relación milimolar [Ca][fitato]/[Zn] no exceda 150-200 por cada 1000 kcal[39]. Existen estudios que, contrariamente, encuentran al calcio como un captador de fitato, dejando libre en el intestino al Zn para su absorción [40]. Otros factores parecen afectar en menor medida el nivel de cinc biodisponible, como por ejemplo la concentración presente de aminoácidos y ácidos orgánicos[41]. En los países en vías de desarrollo la ingesta promedio de fitato en un menú estándar puede exceder los 2000 mg/día, generando una situación de riesgo nutricional por deficiencia de Zn [42]. La población de mayor riesgo la constituyen las personas que siguen dietas vegetarianas y los niños, siendo este último el grupo más vulnerable[43].

1.2.2. Influencia en la absorción de Fe

El hierro es uno de los microelementos más importantes. La baja en el nivel de hierro ha sido asociada con alteraciones del sistema inmunológico, apatía y bajo rendimiento escolar en niños, además de con la disminución de la capacidad física en los adultos [33].

Hay dos tipos de hierro en la dieta humana: el hierro hemo, derivado de productos cárnicos, que consiste en el metal unido a un anillo porfirínico, y el hierro no hemo, proveniente de los alimentos de base vegetal. El hierro hemo solamente constituye del 10 al 20 % del hierro dietario, pero es el 50 % del hierro que efectivamente se absorbe [44]. El proceso de absorción del hierro hemo es mediado por receptores específicos a nivel de la mucosa intestinal [45,46]. Por otra parte, se sabe que la inclusión de hierro no hemo involucra la reducción del Fe(III) a Fe(II) [47] antes del cotransporte con protón a través de la membrana celular [48]. A diferencia del hierro hemo, su absorción depende de la matriz alimenticia y de otros factores del proceso de degradación, los cuales modulan la solubilidad del ion metálico, un requerimiento esencial al momento de la captación intestinal.

La mayoría del hierro no hemo se encuentra como Fe(III), el cual se mantendría en solución por moléculas quelantes como ácido ascórbico, péptidos y ciertos

azúcares. La ingesta de carne es también un factor trascendente para el aumento en la bioaccesibilidad del hierro no hemo, debido posiblemente a la formación de complejos solubles con la miosina [49]. Otros ligandos quelantes como ácidos orgánicos o aminoácidos contribuirían, del mismo modo, a la solubilidad y por tanto al porcentaje de hierro no hemo absorbido, siendo las sales de estos compuestos usualmente utilizadas como fortificantes o suplementos [50,51]. Sin embargo, otros compuestos han sido categorizados como factores antinutricionales, por inhibir la absorción de este ion metálico. Uno de ellos es el fitato, el cual forma complejos muy estables con el hierro(III), según se discutió en los capítulos 5 y 8. Además, se sabe que la presencia de los iones divalentes Ca^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} y Mn^{2+} también disminuye la captación de hierro por mecanismos que aún hoy no son claros [29]. Las interacciones entre todos estos inhibidores y promotores establecen el grado de absorción del hierro a nivel intestinal. De todas formas, el factor preponderante sigue siendo, según los expertos, el fitato, cuyos niveles son modulados por las características nutricionales de la dieta [29].

1.2.3. Influencia en la absorción de Ca y otros componentes de la dieta

El calcio es el mineral más abundante en el organismo humano y presenta múltiples roles estructurales y funcionales. Su deficiencia genera problemas graves en el crecimiento y sostén estructural[33]. El fitato disminuye la biodisponibilidad del calcio[52,53] y forma complejos con este ion metálico que parecen influenciar la absorción de hierro y cinc[54,55]. Lönnerdal y sus colaboradores han sugerido que sólo las formas hexa y pentafosforiladas del inositol inhiben la captación de calcio [38]. Hoy se sabe además que la capacidad inhibitoria del fitato hacia el calcio y el cinc es dependiente de la dosis aplicada [56].

El fitato inhibe la captación de Mg y promueve la de Cu en ratas [57,58]. Este último efecto fue atribuido a la unión del InsP_6 al Zn(II), el cual compite con el Cu(II) por los sitios de absorción. En humanos, por el contrario, no se ha encontrado un efecto significativo por parte del fitato en el nivel de cobre captado [59]. Finalmente, la influencia del fitato en la biodisponibilidad del Mn es un tema aún hoy discutido. Se ha encontrado inhibición de la absorción del metal en ratas [60], pero en humanos los resultados son contradictorios[61,62].

Además de su acción sobre el proceso de absorción de iones metálicos, el fitato también afecta la digestión y captación de otros factores dietarios. En efecto, el InsP_6 es capaz de combinarse de forma covalente con el almidón e incluso afectar las enzimas relacionadas con la digestión de este polímero [63]. Cuantiosos (y en general contradictorios) efectos del fitato sobre algunas enzimas digestivas, así como sobre la digestión de proteínas de la dieta, han sido descritos en la literatura [27]. Se conoce igualmente que el fitato reduce la digestibilidad de los lípidos [64].

1.3. El fitato y su efecto beneficioso para la salud

El fitato es un componente relevante en la dieta, debido a su capacidad antioxidante y a sus múltiples actividades farmacológicas reportadas, las cuales cubren desde hace varios años gran parte de la investigación básica y aplicada en este campo. El ejemplo más contundente de esto estriba en que esta molécula es un agente antineoplásico de amplio espectro contra variados tipos de cáncer que afectan la sangre, colon, hígado, pulmón, mamas, piel, páncreas, próstata y cuello uterino [65]. El fitato es capaz además de reducir el daño oxidativo relacionado con la formación de tumores. Este efecto se debe tanto a su capacidad de complejación efectiva del Fe(III), impidiendo la formación del radical $OH^{\cdot}$ a través de la reacción de Fenton [66], como a su propiedad de inhibir la xantina oxidasa[67]. La administración de fitato posee otros efectos beneficiosos para la salud humana: prevención de la aterosclerosis [68], la reducción sustancial de la concentración de lípidos en el suero [69] y la protección del miocardio frente al daño isquémico[70]. Posee asimismo una inusitada habilidad para inhibir la agregación de placas en sangre[70]. Debido a su reactividad frente a los cationes metálicos, el InsP_6 ha demostrado tener gran potencial para inhibir la formación de cristales de oxalato y fosfato de calcio, presentando un rol preventivo contra la formación de cálculos renales [71]. Una búsqueda detallada en la bibliografía especializada revela aún más estudios, adjudicando funciones beneficiosas vinculadas con el tratamiento de la infección del HIV y otras afecciones por inmunodeficiencia [72], con una acción de tipo gastroprotectora frente a úlceras[73] e incluso con la prevención de la enfermedad de Parkinson [74].

Todo un sector de la comunidad científica considera hoy que el carácter antinutricional del fitato es un simple efecto secundario, que sólo se hace evidente cuando se combinan grandes cantidades de la biomolécula con dietas pobres en elementos traza[75-83]. Algunos autores opinan que deben ser tomados otros factores en cuenta al evaluar la "seguridad nutricional" de esta molécula. Por ejemplo, debe considerarse la relación InsP_6:minerales totales en la dieta, el procesamiento e incluso la metodología de cocción del alimento[84-86]. Se ha establecido que si los iones metálicos esenciales están presentes en la relación adecuada respecto al fitato, no ocurre modificación del balance mineral. Ha sido reportado que en individuos que consumen una dieta de tipo mediterránea, con una administración de 1 a 2 gramos de fitato por día, no existen efectos adversos en la biodisponibilidad mineral[80,82,83]. Conjuntamente, estudios a largo plazo de los efectos de la ingesta de fitato alimentario o en forma pura, arrojaron resultados negativos sobre una posible deficiencia mineral en humanos[75,77,78]. En un reporte reciente, se ha concluido que cuando una dieta vegetariana se compara con una dieta basada en productos cárnicos, ambas con el mismo contenido en fitato, la deficiencia de Zn en humanos no está relacionada con el nivel de InsP_6[87].

Adicionalmente a esto, los efectos de esta molécula en los organismos vivos serían dependientes del nivel diario de captación, el cual estará influido, en todo caso, por la dieta administrada y por el grado de absorción a nivel gastrointestinal[29]. Relacionado con este último punto, por ejemplo, las discrepancias que aparecen en los estudios nutricionales podrían deberse a la o las formas químicas en las que el fitato se encuentra en el ambiente gastrointestinal, lo que influye críticamente en su disponibilidad [72]. Estas formas químicas, su concentración y sus estados de agregación constituyen la base de la descripción de la especiación química del sistema, aspecto que se pretende abordar de forma preliminar en el presente capítulo.

1.4. Datos nutricionales: consumo de alimentos de base vegetal

Las guías de consumo de alimentos y las GABA (Guías Alimentarias Basadas en Alimentos) ponen a los cereales y las leguminosas como uno de los dos grupos alimentarios base de la dieta recomendada uruguaya. El panorama nutricional mundial es muy variado, pero aún en países como el nuestro, con dietas con

alto consumo de carne, la ingesta de productos de origen vegetal es todavía elevada.

Según un trabajo publicado en 2005 por el Programa Nacional de Nutrición [33], en Uruguay los cereales estuvieron presentes en la dieta, de forma casi constante, en un promedio de 138 kg/persona/año en el período 1989-2002. El trigo representa el 69 % de este suministro, seguido por el maíz (20,6 %) y el arroz (10,1 %). Las frutas y hortalizas han tenido un incremento en el suministro a la población, pasando de 98,4 kg/persona/año en 1989-1991 a 138 kg/persona/año en 1999-2001. De dos estudios realizados en 1996 y 2000, se desprenden resultados interesantes respecto de los hábitos de consumo uruguayos, los cuales se basan en cereales y leguminosas. En el análisis de los alimentos de consumo más frecuente se destaca el grupo de los cereales, siendo los hogares del interior los mayores consumidores de este rubro (36 % de las calorías diarias). Sin embargo, en Montevideo se consume una mayor cantidad de frutas y verduras (10,1 % de las calorías diarias). Las verduras de mayor consumo son acelga, morrón, cebolla, espinaca, lechuga, tomate, zanahoria y zapallo. La cantidad de cereales presentan un peso relativo similar para los distintos estratos sociales estudiados. No obstante, en la población urbana adquieren más importancia los panificados en tanto que en la rural se consumen más harinas y cereales *ready to eat*.

Como se mencionó anteriormente, los alimentos de origen vegetal, y muy especialmente los cereales, tienen un alto contenido de fitato. Es así que, de acuerdo a lo recomendado, la población de nuestro país ingiere enormes cantidades de esta biomolécula (aproximadamente 2000 mg/día/persona, más del doble que el promedio mundial). Esto puede considerarse muy adecuado, ya que el InsP_6 presenta numerosos efectos beneficiosos para la salud. Pero, en ciertas condiciones dietarias, aún no demasiado esclarecidas, este componente natural y beneficioso de los alimentos se transforma en un antinutriente.

En nuestro país coexisten problemas nutricionales deficitarios, tales como la carencia de micronutrientes, junto con los problemas nutricionales por exceso, como el sobrepeso, la obesidad y algunas enfermedades crónicas. A modo de ejemplo, en el año 2000 se detectó una prevalencia de anemia del 53 % en una muestra de 148 lactantes del interior del país, de entre 8 y 11 meses. Esta

situación es muy delicada, ya que podría agravarse durante el crecimiento si la dieta es abundante en cereales y leguminosas.

1.5. Posibles estrategias para la mejora de la bioaccesibilidad de los minerales

Resulta de gran importancia identificar y evaluar los factores dietarios que afectan la absorción de iones metálicos. Con este conocimiento como herramienta fundamental, se podrán mejorar los lineamientos de gestión nutricional en cuanto al diseño de nuevas y mejores dietas, con menor proporción de inhibidores y mayor proporción de promotores de la biodisponibilidad de estos macro y micronutrientes.

Con el objetivo de contrarrestar la deficiencia en macro y micronutrientes esenciales, es necesario aumentar la absorción intestinal de los iones metálicos, evitando el efecto antinutricional del fitato presente en los alimentos. Raboy, un experto a nivel mundial en el tema, ha descrito tres aproximaciones para mejorar la absorción de iones esenciales en presencia de fitato [88]:

a) elevar la concentración de los minerales directamente en los alimentos,

b) disminuir los niveles del antinutriente, en este caso del InsP_6,

c) modificar adecuadamente la dieta de forma de mejorar la bioaccesibilidad de los minerales y del fitato al mismo tiempo.

La opción (a) no resulta recomendable, entre otras cosas porque conlleva un aumento en la cantidad de fosfato liberada al medio ambiente (vía precipitación y posterior eliminación fecal), provocando la eutrofización masiva de los cursos de agua [89].

La solución (b) es la más comúnmente adoptada, aunque tiene el enorme inconveniente de disminuir los efectos beneficiosos que presenta el fitato dietario. El molido de los cereales es un ejemplo de este tipo de metodología. Remueve el fitato, aunque retira además la mayor parte de los minerales, fibra dietaria y macroelementos como el fósforo, un macronutriente esencial para los seres vivos. De forma similar, el remojado o la extracción en medio acuoso puede remover hasta dos tercios del fitato por la acción de una fitasa endógena

[90]. Si bien este proceso causa la desaparición del InsP_6, éste se transforma en sus derivados menos fosforilados, algunos de los cuales también disminuyen la absorción de metales esenciales.

La estrategia (c) permite maximizar la absorción de los minerales esenciales sin modificar la captación del fitato. De esta manera podemos mantener los efectos beneficiosos del inositol fosfato, sin que se afecte la biodisponibilidad de los iones esenciales, ni de fósforo. El uso de esta estrategia implica controlar la posición de equilibrio de las reacciones químicas involucradas en el proceso de digestión. Ningún trabajo hasta el momento ha encarado de forma rigurosa el tema.

2. Propuesta

Según se expuso, la población uruguaya, así como la de muchos países en desarrollo, posee una dieta con gran contenido de alimentos de base vegetal, por lo que consume importantes cantidades de fitato. Estos hábitos, comprenden un riesgo potencial por deficiencia en iones minerales esenciales, como Fe, Zn y Ca, entre otros. Los parámetros fisicoquímicos relevantes a tener en cuenta son los que, según se ha reportado, influyen en la absorción de Ca(II), Mg(II), Zn(II) y Fe(III) [91], a saber:

a) *condiciones del ambiente gastrointestinal*: se agrupan dentro de este punto el pH, la temperatura, la fuerza iónica, el volumen y composición detallada de los fluidos involucrados, y el tiempo de retención en cada compartimento del tracto gastrointestinal,

b) *tipo de ion*,

c) *la relación molar entre el ion metálico y el fitato*: este es un punto especialmente poco explorado, ya que se asume una relación de combinación variable. El efecto inhibitorio de la absorción de minerales es usualmente sensible a la dosis, aunque no está claro aún si es la concentración de fitato *per se* o la relación fitato-iones metálicos el parámetro dominante en cuanto a la influencia en la bioaccesibilidad de los minerales. Han sido reportadas relaciones molares fitato-Zn > 10 asociadas con síntomas deficitarios [92], aunque en general estos cocientes no se adecuan como herramientas de valor

predictivo. Se reconoce la existencia de varias razones que pueden explicar esto. Principalmente, se asume la existencia de una estequiometría variable entre el InsP_6 y los iones metálicos, debido a la dependencia con las condiciones de fuerza iónica, pH y temperatura, las cuales varían a través de todo el tracto digestivo,

d) *la cantidad y composición de la matriz alimenticia*: aquí se incluye la influencia de otros iones (Na(I), K(I), etc.), así como la unión a aminoácidos, ácidos orgánicos, proteínas, fibras, etc. También se incluye la alteración de la bioaccesibilidad de iones metálicos que causa la presencia de otros inositol fosfatos,

e) *la hidrólisis enzimática de los fitatos*: a medida que los grupos fosfato son progresivamente removidos del InsP_6, disminuye su carga promedio y por lo tanto su interacción con los diferentes cationes. La hidrólisis enzimática generalmente se lleva a cabo durante el procesamiento biológico (actividad fitasa propia del ser humano, y fitasas microbianas) y la preparación del alimento (fitasa endógena y exógena). Como consecuencia, entre un 30 y un 90 % del fitato presente originalmente en el vegetal llega al colon indigerido.

Para realizar un estudio de la especiación química del fitato en el tracto gastrointestinal, se necesitaría tomar como punto de partida la siguiente información disponible en la literatura:

a) la composición química de los productos alimentarios,

b) la composición química de los fluidos involucrados en el proceso de digestión,

c) las condiciones fisicoquímicas de los distintos compartimentos del tracto gastrointestinal.

A partir de esta información, y conociendo todos los procesos químicos en los que participan el fitato y los iones metálicos, es posible determinar las especies químicas que forma el InsP_6 en cada compartimiento del tracto gastrointestinal. La solubilidad de las mismas constituiría un indicador de la bioaccesibilidad de los iones esenciales e inositol fosfato.

En este contexto, la propuesta de este capítulo se enmarca dentro de un plan a largo plazo para el estudio de las propiedades nutricionales de los diversos

Ins*P*. Constituye como tal el primer esfuerzo por sistematizar el estudio cuantitativo en este campo, suministrando datos completos del comportamiento químico del fitato y otros Ins*P* en presencia de numerosos iones metálicos a nivel gastrointestinal, con el fin de comprender cabalmente los procesos químicos implicados en la absorción de los iones esenciales y fósforo. Este conocimiento podría emplearse en el futuro para generar pautas adecuadas de alimentación que minimicen el efecto antinutricional del fitato, sin disminuir sus efectos beneficiosos. La base de datos termodinámicos generada en esta tesis, junto con los datos de ingestas estándar uruguaya y las condiciones fisicoquímicas del ambiente gastrointestinal, permitirán conocer las formas químicas del fitato en su recorrido por el tracto gastrointestinal. Dentro de la metodología propuesta, se considerarán los distintos factores químicos y fisiológicos del proceso de digestión, así como el contenido nutricional detallado de cada alimento.

3. Metodología de trabajo

Se utilizaron todos los datos termodinámicos obtenidos en este trabajo. Se empleó la información disponible sobre los parámetros fisicoquímicos relacionados con el proceso completo de digestión [93]: composición química y volumen de los fluidos involucrados, tiempo de retención en cada compartimento, pH, fuerza iónica, potencial redox, etc. Se hizo uso, asimismo, de datos de la composición química de los alimentos considerados en la ingesta. Toda esta información fue ingresada al programa de cálculo JESS (*Joint Expert Speciation System*) [94-96]. JESS es un *software* muy poderoso, que no sólo cuenta con su propia base de constantes de equilibrio, la cual gestiona según la metodología experimental, la temperatura y la fuerza iónica, sino que permite además analizar la especiación química de sistemas complejos sobre la base de varios miles de constantes de protonación, complejación y precipitación (ver detalles de la aplicación más adelante). Se analizó finalmente la bioaccesibilidad de los iones de interés, estimada para la ingesta considerada a partir de la proporción soluble de los mismos en el compartimento de absorción.

3.1. Datos nutricionales de los componentes del modelo

Para comenzar el proceso de adquisición de la información necesaria, se realizó una búsqueda exhaustiva de datos de composición de variados alimentos. El objetivo principal de esta fase fue la configuración de una gran base de datos nutricional, que trascienda a la aplicación específica presentada en este capítulo, y permita un acceso rápido a los diversos valores de concentración de los componentes presentes en los alimentos de la ingesta. Esta base de datos nutricional se expone en detalle en el Anexo E.

Los datos de la composición general de alimentos a ser considerados se obtuvieron de las referencias[97,98]. Para completar esta base datos, se agregaron los valores de composición específicos para diversas marcas comerciales de cereales producidos por las empresas Kellogg's, Quaker, General Mills, Health Valley y Post Cereals[99-103]. Para transferir los valores de composición nutricional de estos cereales, desde % de ingesta diaria a mg/100 g de cereal, se hizo uso de los valores de *% daily values* dados por la U.S. Food and Drug Administration [104]. Los datos de Ins*P* en diversos alimentos se extrajeron de las referencias [24,98,105,106].

En los trabajos referenciados en el párrafo anterior, los datos disponibles de contenido de aminoácidos en la fracción proteica de los cereales y productos derivados son limitados. Como aproximación, se completaron los datos faltantes con los disponibles para los granos de cereal enteros, reportados en [107]. Como segunda aproximación, para el caso en particular de aquellos productos que contienen mezcla de cereales, la composición aminoacídica se determinó como el promedio del contenido de aminoácidos de los cereales constituyentes. En el caso del pan de germen de trigo, la composición de los aminoácidos se igualó a la del pan blanco de trigo. Sin embargo, esta información para los diversos tipos de pan de trigo (blanco, germen, integral) resultó incompleta. Para mejorar la misma se hizo una nueva consideración. Si se promedia el factor de disminución de la masa total de aminoácidos, desde la harina de trigo al pan blanco elaborado, resulta 0,64(7). Partiendo de la composición de la harina de trigo, y aplicando este factor a los valores de los aminoácidos que faltan, se determinaron nuevos datos para los tres tipos de pan de trigo. Todos estos aminoácidos se encuentran formando parte de las proteínas incluidas en el alimento. En el marco de este modelo, se consideró

como primera aproximación que a nivel estomacal, luego de la digestión, el nivel de hidrólisis proteica es del 70 %.

Otro factor importante a tener en cuenta, aunque difícil de evaluar, es la proporción del fósforo total correspondiente a fosfato inorgánico. En el caso de los cereales, utilizando los valores de composición de inositol fosfatos (fósforo de tipo orgánico), se corrigieron los datos de fósforo total recabados, de forma de que el contenido de fósforo restante se lo asimiló, como primera aproximación, a fosfato de tipo inorgánico. En el caso de alimentos como la leche, donde el nivel de fósforo es apreciable, se consideró que el contenido de fosforo inorgánico es un 70 % del total de fósforo determinado [108].

3.2. Composición de fluidos y condiciones en el tracto gastrointestinal

3.2.1. Composición de saliva, jugo gástrico y fluido duodenal

Se realizó una búsqueda de datos de composición química para los diversos fluidos que participan en el proceso de digestión, desde la ingestión hasta la absorción a nivel duodenal. La base de datos generada se expone en detalle en el Anexo E. En los casos en donde los reportes indican un intervalo de concentraciones posibles para un componente dado, se empleó para los cálculos el valor medio correspondiente.

La composición química de la saliva y el jugo gástrico se obtuvo de [93,109]. En el caso del duodeno, el análisis de la composición química del "jugo duodenal" resultó más complejo. Se consideró que la composición del fluido duodenal se establece por combinación del jugo secretado por el páncreas y la vesícula biliar[110]. La concentración de los componentes presentes en cada jugo (páncreas y vesícula biliar) se extrajo de las tablas de la compañía Ciba-Geigy [109]. Como aproximación, se calculó la concentración total en el duodeno considerando el volumen de bilis almacenado por la vesícula (58 mL[109]) y el volumen de la secreción del páncreas (110 mL). Este último se estimó como producto del tiempo medio de estadía de los alimentos en el duodeno (37,5 min [93]) y la velocidad de secreción del jugo pancreático (2,93 mL/min [109]). Los datos de composición faltantes se completaron con los valores reportados por P.W. Jones [110].

3.2.2. Condiciones en el tracto digestivo

Las condiciones en cada compartimento del tracto gastrointestinal han sido revisadas en algunos trabajos científicos relativamente recientes. En todas se considera la temperatura corporal media como 37 °C. A nivel bucal, el pH ha sido reportado entre 5,6 y 7,6 [111]. Algunos trabajos consideraron a la fuerza iónica cercana a 0,15 M [111], mientras que otros han preferido calcularla mediante programas especializados[112]. Esta última aproximación parece la más acertada, dada la naturaleza variable del sistema gastrointestinal. La velocidad de secreción promedio de saliva luego de la estimulación es de 3,75 mL/min [109], mientras que el tiempo estimado de estadía de los alimentos en este compartimento es muy variable, de 10 segundos a 2 minutos[93].

Dado el corto tiempo de estancia de los alimentos, el análisis de la especiación química a nivel bucal no tiene sentido práctico. Un dato relevante es el volumen total de saliva secretada, el cual debe sumarse al volumen del sistema en el resto del tracto gastrointestinal. Como primera aproximación, se consideró que se produce saliva por 30 min, tiempo estimado para una ingesta tipo. Considerando además el dato de velocidad de secreción salival promedio citado arriba, el volumen total de saliva estimado es 113 mL.

El pH del estómago es variable, con valores que oscilan entre 1,5 y 4,0 [109,113]. Al igual que a nivel bucal, en los cálculos de trabajos anteriores la fuerza iónica se ha fijado en 0,15 M [111] o ha sido determinada por el *software* utilizado [112]. El volumen de jugo gástrico en ayuno es de 50 mL [109] y la velocidad de secreción posprandial promedio es de 101 mL/h. Considerando un tiempo promedio de digestión en el estómago de 2 horas [113], el volumen total de jugo gástrico se estimó en 252 mL. Respecto del potencial redox en este órgano, el valor depende de dónde se haga la medida. En este trabajo se ha utilizado el correspondiente al cuerpo del estómago, el cual es de unos 40 mV [114], cercano a la media de los valores obtenidos hacia el final del esófago [115].

En el duodeno, la neutralización del contenido estomacal lleva al sistema a un pH entre 7 y 8 [109,113]. Por su parte, la fuerza iónica ha sido anteriormente estimada por los programas de especiación empleados [110,112]. El potencial redox es bastante variable y es dependiente del tramo del intestino que se esté considerando. Para el estudio planteado aquí, se ha utilizado el valor promedio

reportado de -65,6 mV, encontrándose potenciales más negativos al avanzar por el intestino delgado [116].

3.3. Componentes del modelo

Luego del análisis detallado de los componentes más importantes que forman parte de los alimentos más comunes y los fluidos secretados en el tracto gastrointestinal, se procedió a seleccionar aquellos para los cuales existen datos termodinámicos confiables en la literatura. Los componentes que han sido considerados en el modelo aplicado se resumen en la tabla 15.1.

Tabla 15.1. Componentes del modelo aplicado.

Componentes			
Li	F	Gly	Lactosa
Na	Cl	Arg	Glicerol
K	Br	His	Sorbitol
Mg	I	Ile	Xilitol
Ca	Se	Leu	Ácido cítrico
Sr	Urea	Lys	Ácido clorogénico
Ba	Ácido úrico	Met	Ácido láctico
Mn	Histamina	Phe	Ácido málico
Fe	Ácido glucurónico	Thr	Ácido oxálico
Co	D-glucosamina	Trp	Ácido salicílico
Ni	Vit D	Tyr	Ácido tartárico
Cu	Vit B1	Val	Ácido N-acetilneuramínico
Zn	Vit B2	Glu	Bilirrubina
Cd	Nicotinamida	Cys	InsP_3
Al	Ácido pantoténico	Asp	InsP_4
NH_4^+	Vit B6	Ser	InsP_5
HCO_3^-	Biotina	Pro	InsP_6
SO_4^{2-}	Ácido fólico	Glucosa	
SCN^-	Vit C	Galactosa	
P	Ala	Fructosa	

Como primera aproximación, los elementos metálicos y no metálicos fueron considerados como sus especies catiónicas o aniónicas más comunes (tabla 15.2). El programa de especiación utilizado es capaz de, partiendo de estos estados iniciales, determinar la especiación química completa de cada uno de los componentes que coexisten en el escenario ensayado.

Tabla 15.2. Especies de partida de algunos componentes del modelo.

Componente	Especie	Componente	Especie
Li	Li^{+}	Cu	Cu^{2+}
Na	Na^{+}	Zn	Zn^{2+}
K	K^{+}	Cd	Cd^{2+}
Mg	Mg^{2+}	Al	Al^{3+}
Ca	Ca^{2+}	P	PO_4^{3-}
Sr	Sr^{2+}	F	F^{-}
Ba	Ba^{2+}	Cl	Cl^{-}
Mn	Mn^{2+}	Br	Br^{-}
Fe	Fe^{3+}	I	I^{-}
Co	Co^{2+}	Se	SeO_4^{2-}
Ni	Ni^{2+}		

Se realizaron, asimismo, algunas aproximaciones al modelo. Los datos termodinámicos de la vitamina D fueron asimilados a los correspondientes a la vitamina D3, debido a la disponibilidad de información. En el caso de la biotina, se utilizó como aproximación los datos de constantes de equilibrio de la d-biocitina. Para representar a los "InsP_3" se hizo uso de los datos termodinámicos del Ins(1,2,3)P_3, los que se completaron con los correspondientes al sistema Ins(1,2,6)P_3-Zn^{2+}. Tanto el Ins(1,2,6)P_3 como el Ins(1,2,3)P_3 se encuentran en el trigo, debido a la acción de la fitasa correspondiente[12], por lo que la anterior afirmación constituye una aproximación razonable. Asimismo, para representar a los "InsP_4" se utilizaron los datos termodinámicos del 4,6-bispirenoil-Ins(1,2,3,5)P_4 con H^{+} y Fe^{3+}, mientras que para los "InsP_5" se recurrió a los datos termodinámicos del Ins(1,3,4,5,6)P_5, analizados en esta tesis.

Al margen de esto, algunos compuestos no fueron considerados dentro del modelo empleado, debido a la falta de datos termodinámicos fiables, a un número muy pequeño de ellos, o al reporte de los mismos en condiciones muy alejadas a las del sistema en estudio. La gran mayoría de estos compuestos son moléculas pequeñas o de tamaño medio. De ellas, sólo una parte son solubles en agua. De este subconjunto la inmensa mayoría no presentan una estructura química que los clasifique como ligandos eficientes, en especial si son comparados con el ácido fítico y el resto de los inositol fosfatos incluidos en el modelo. Una lista de estos compuestos no considerados en los cálculos se presenta en el Anexo E.

3.4. Concentraciones de los componentes en cada compartimento

Tomando en cuenta la información de los apartados anteriores, se determinó la concentración de cada componente del sistema en el estómago y duodeno. Para esto se utilizó un algoritmo cuya serie de ecuaciones se detalla en el Anexo E.

3.5. Simulación de la especiación química

3.5.1. Generalidades

El cálculo computacional de la especiación química de estos sistemas nutricionales complejos, fue realizado en base a los principios del equilibrio químico en solución y al estado sólido, y las leyes de la termodinámica que los rigen. El *software* del que se hizo uso, denominado JESS, fue desarrollado por May y Murray [94-96], y tiene en cuenta todas las posibles interacciones entre los componentes del sistema en un entorno químico simulado. Evalúa, asimismo, el grado de extensión de las diversas reacciones, y puede predecir la predominancia de las especies presentes en ciertas condiciones de concentración de componentes, temperatura, fuerza iónica, pH y p*E*. Para realizar esto, el andamiaje teórico del JESS da soporte a la resolución de varias ecuaciones simultáneas de balances de masa y carga, a través de un algoritmo iterativo de tipo Newton-Raphson.

3.5.2. Base de datos termodinámicos

Como parte del paquete de programas, el JESS posee una de las bases de datos termodinámicos más grandes que se conocen, con más de 70000 reacciones y 200000 constantes de equilibrio registradas. Es una extensa biblioteca de constantes de equilibrio y diversos parámetros termodinámicos de una infinidad de procesos fisicoquímicos, la cual ha sido verificada individualmente en sus fuentes originales. Adicionalmente, haciendo uso de un estricto procedimiento de control calidad, todos los valores han sido categorizados en su fiabilidad por los creadores del *software*, a través de la aplicación de un factor de confianza entre 0 (pobre) y 9 (excelente). Esto permite realizar fácilmente cálculos de la especiación química de variados sistemas, a partir de aquellos datos obtenidos sólo en condiciones que aseguran su confiabilidad.

Con el objetivo de completar la base termodinámica del JESS, se incluyeron en el análisis los valores de las constantes de equilibrio de los sistemas conteniendo InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3, en ausencia y en presencia de variados iones metálicos, determinadas en condiciones similares a las fisiológicas y en un medio no interactuante (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Las mismas fueron agregadas al programa con un factor de confianza de 9.

Dado que la última fecha de actualización de la base de datos del JESS data del año 2000, se incluyeron las constantes de equilibrio reportadas recientemente para otros componentes orgánicos del modelo, seleccionadas de la base IUPAC [117] teniendo en cuenta ciertos criterios estrictos. Los detalles de este procedimiento, así como una lista de los valores elegidos, se exponen en el Anexo E.

3.6. Aproximaciones del análisis de la especiación química

El estudio se realizó, en primer lugar, con un criterio puramente termodinámico. Se utilizaron todos los datos fisicoquímicos existentes para las especies posibles a formarse en las condiciones de especiación en cada compartimento. Sin perjuicio de lo anterior, se consideró en el análisis un modelo alternativo (modelo cinético, ver más adelante), el que toma en cuenta efectos cinéticos sobre los procesos de precipitación, como la sobresaturación.

En ningún caso se incluyeron en la discusión fenómenos de adsorción ni interacciones químicas con macromoléculas presentes en el medio, debido a la falta de datos termodinámicos fiables.

Dado que el sistema puede encontrarse en condiciones que se alejan moderadamente de aquellas en donde fueron obtenidos los datos termodinámicos de partida, el JESS es capaz de realizar correcciones de los valores de constantes y otros parámetros a las condiciones del sistema. Para esto utiliza tanto procedimientos tradicionales como su propio método, denominado UCC (por *Unconditional Correction Coefficient*). En este último, se consideran todos los *sets* de valores en diversas condiciones de temperatura y fuerza iónica dentro de un modelo matemático, haciendo posible la interpolación o extrapolación de los datos a las condiciones requeridas.

4. Resultados y discusión

Para iniciar el estudio del sistema leche + cereal, se consideró una ingesta tipo aproximada de un vaso de leche entera (200 g) y 50 g de cereal. Para realizar un primer análisis se eligió un cereal de maíz, que posee un bajo contenido en inositol fosfatos. Las concentraciones totales en estómago y duodeno son las que se detallan en la tabla E4 del Anexo E.

Debido a la gran concentración de fosfato existente (aportada en su gran mayoría por la leche), los sólidos que termodinámicamente se encuentran por encima del nivel de saturación son principalmente minerales conteniendo calcio, hierro y fosfato. Dada la complejidad de los innumerables procesos de precipitación posibles, se determinó el índice de saturación (SI) para describir el estado de saturación de las diversas fases sólidas desde un punto de vista termodinámico. La definición de este parámetro es SI = log (PI/K_{ps}), donde PI es el producto de las concentraciones de los iones y K_{ps} corresponde a la constante termodinámica de producto de solubilidad. Es ampliamente utilizado para estimar la precipitación potencial de los diferentes sólidos a partir de la especiación en solución acuosa de un sistema en particular. Cuando SI es negativo la solución está por debajo de la saturación, y no es termodinámicamente favorable la precipitación de la fase correspondiente. Si por el contrario el índice es mayor que cero, la precipitación de la fase sólida

puede ocurrir. Por tanto, los valores de SI para las diferentes fases constituyen, en general, un criterio para evaluar la tendencia y extensión de los diversos procesos de precipitación [118].

En el caso analizado, las fases sólidas que dominan la especiación química del sistema son las apatitas ($Ca_5X(PO_4)_3(s)$ con X = Cl^-, F^-, OH^-) y algunos minerales de Fe(III), siendo el más importante $Fe_4Ca(OH)_8(PO_4)_2(H_2O)_7(s)$. La precipitación de los fosfatos de calcio es un proceso altamente complejo, modulado por diversos parámetros fisicoquímicos. En particular, es dependiente de las concentraciones de los iones participantes, el grado de sobresaturación, la fuerza iónica, temperatura, iones espectadores, pH y tiempo de estadía en la solución[119-121]. Según se ha determinado, el proceso de precipitación de los fosfatos de calcio sigue la regla de Ostwald, la cual establece que la fase sólida que se forma inicialmente es la menos estable desde el punto de vista termodinámico. Estas fases metaestables funcionan como precursores de sólidos más estables, a través de procesos de recristalización operativos sólo a grandes tiempos de permanencia en el medio[122]. En estos sistemas conteniendo calcio y fosfato, la fase más estable es en general la hidroxiapatita ($Ca_5OH(PO_4)_3(s)$), la cual se forma lentamente (entre 1 y 11 horas) dependiendo, entre otros factores, del pH [119]. Los precursores más comunes formados inicialmente son sales relativamente simples y comprenden $CaHPO_4{\cdot}2H_2O$, $Ca_4H(PO_4)_3{\cdot}2{,}5H_2O$ y $Ca_3(PO_4)_2{\cdot}xH_2O$ (amorfo) [123].

Con respecto a la precipitación de fosfatos de hierro, los sistemas se comportan de forma similar a los de calcio, aunque existe menos información al respecto. Uno de los sólidos de hierro y fosfato más comunes en la naturaleza es $FePO_4{\cdot}2H_2O$ [124]. Cálculos termodinámicos sugieren que formas hidratadas de $FePO_4$ son predominantes y controlan la concentración del fosfato en medios ácidos [124-127]. A pH por debajo de 2 se detecta la formación inicial de fosfato de hierro amorfo, el que deriva en fases más estables luego de un tiempo prolongado [128]. Más aún, ha sido reportado que fases amorfas de este sólido con un número variable de aguas de hidratación precipitan a pH entre 7 y 8 de soluciones conteniendo Fe^{3+} y PO_4^{3-} [129].

Por tanto, dado lo expuesto, se utilizarán dos modelos de especies al momento de analizar la especiación química del sistema. Por un lado, se considerarán todas las especies formadas desde el punto de vista termodinámico (modelo

termodinámico). Por otra parte, se tendrán en cuenta los efectos cinéticos citados, no permitiendo la formación de apatitas y minerales complejos de Fe(III), pero dejando que precipiten otros sólidos (modelo cinético). Esta estrategia permitirá realizar un estudio amplio de las especies formadas, evaluando en detalle la competencia que se establece en solución y al estado sólido entre el fosfato y el fitato por el calcio, hierro y el resto de los iones metálicos incluidos en el sistema.

4.1. Fitato y otros Ins*P*

Las graficas de la figura 15.1 muestran la abundancia de las especies del fitato presentes a nivel estomacal. Dado los bajos valores de pH en este compartimento y la alta concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} presente, la competencia entre los iones H^+ y estos dos cationes metálicos por el ligando es importante. A pH = 1,5 el fitato se encuentra muy protonado, lo que impide la formación de complejos metálicos. No obstante, a medida que el pH aumenta, comienzan a formarse especies menos protonadas del fitato, y con ellas las especies metálicas derivadas. En efecto, considerando el modelo termodinámico, a pH = 2,3 existe un 6 % del ligando en forma de la especie $[Mg(H_6L)]^{4-}$, el cual aumenta a 26 % a pH por encima de 3. Un incremento ulterior de pH conlleva la precipitación de una cantidad apreciable del fitato en forma de fitato de magnesio. Por otra parte, el modelo cinético presenta un panorama diferente. En este caso se establece un impedimento cinético a la formación de las apatitas, las cuales en el marco del modelo anterior consumen prácticamente todo el calcio existente. Es así que, en presencia de grandes cantidades de Ca^{2+}, el fitato forma la especie $[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$, altamente insoluble, involucrándose totalmente ya a pH cercano a 3.

En el duodeno, el perfil de la especiación química cambia (figura 15.2). Como es previsible extrapolando la tendencia observada en el estómago, el fitato se une completamente al magnesio presente según el modelo termodinámico. Imponiendo restricciones cinéticas, a pH = 7 el ligando capta además calcio al estado sólido. Como se verá más adelante, al aumentar el pH comienza a precipitar dolomita ($CaMg(CO_3)_2(s)$) en el sistema, disminuyendo la concentración de ion magnesio libre (en menor concentración que el ion Ca^{2+}) y por tanto inhibiendo la formación del fitato correspondiente. En efecto, a

valores de pH mayores a 7,3 el fitato se encuentra 100 % precipitado como su sal de calcio.

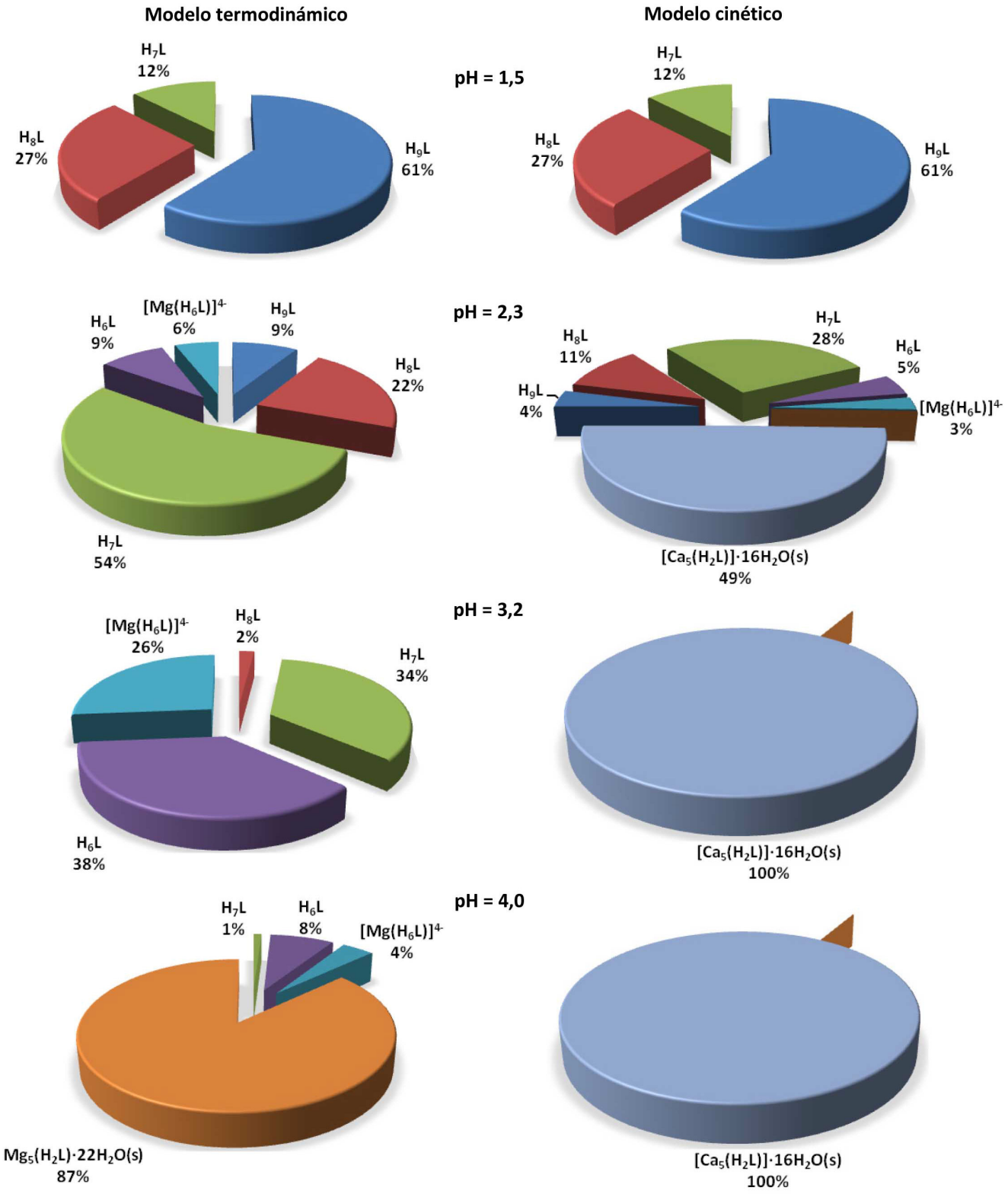


Figura 15.1. Especies del fitato a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

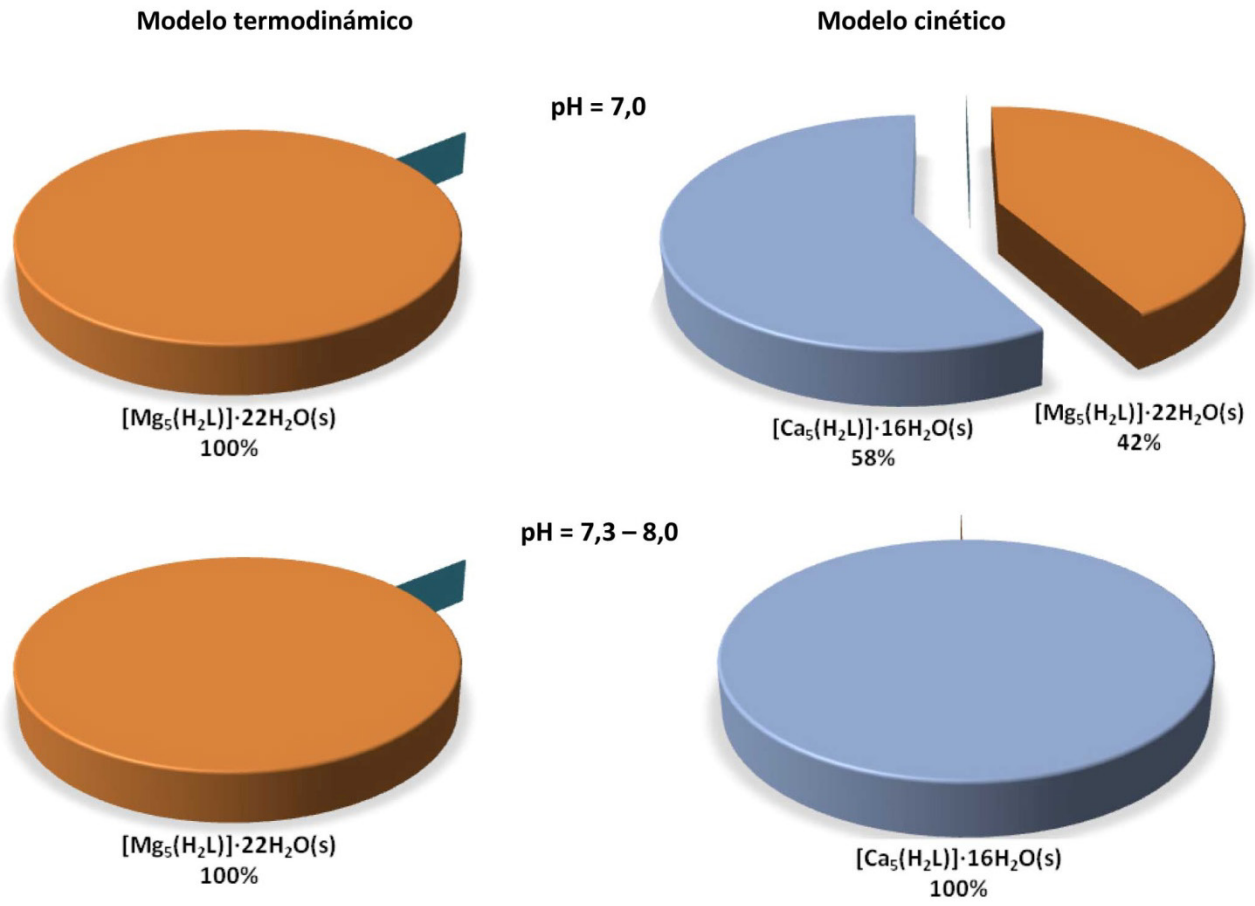


Figura 15.2. Especies del fitato a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

En conclusión, a nivel estomacal el fitato se encontrará libre o formando complejos metálicos. Estos pueden llegar a ser solubles o insolubles dependiendo del pH existente. A nivel duodenal, en cambio, se espera un 100 % de precipitación del ligando. Los iones blanco del fitato en este tipo de ingesta serán claramente el Ca y/o el Mg, dependiendo de la cinética de precipitación de las apatitas.

A nivel estomacal, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se encuentra en general libre (figura 15.3). A medida que el pH aumenta se suceden las diversas especies del ligando cada vez con menor grado de protonación. A pH = 4, considerando el modelo termodinámico, solo el 1 % del ligando se encuentra asociado a Mg. Dentro del modelo cinético, el calcio queda libre para unirse al Ins(1,3,4,5,6)P_5, pero lo hace también en muy baja proporción.

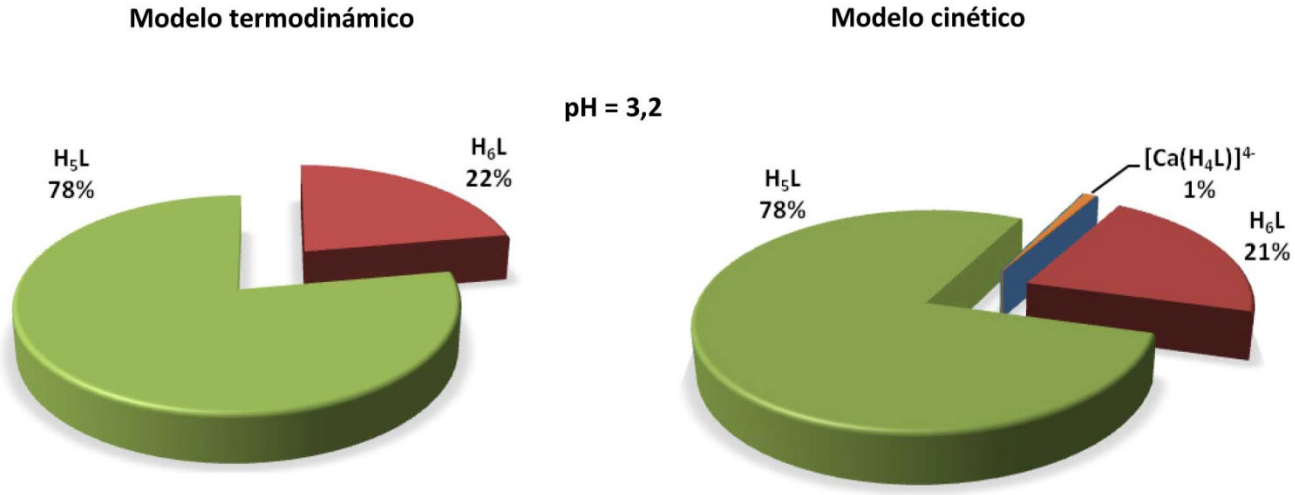


Figura 15.3. Especies del Ins(1,3,4,5,6)P_5 a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz, pH = 3,2).

La figura 15.4 muestra las especies presentes de este InsP_5 en el duodeno, donde el perfil se vuelve más complejo. En general, para ambos modelos, las especies H_4L^{6-} y H_3L^{7-} son predominantes. El resto del ligando se reparte en su mayoría en complejos solubles con Mg^{2+}, Na^+ y, en el caso de la aplicación de restricciones cinéticas, con Ca^{2+}. De forma interesante, el ligando se asocia levemente además al NH_4^+, aportado por la saliva y el jugo gástrico.

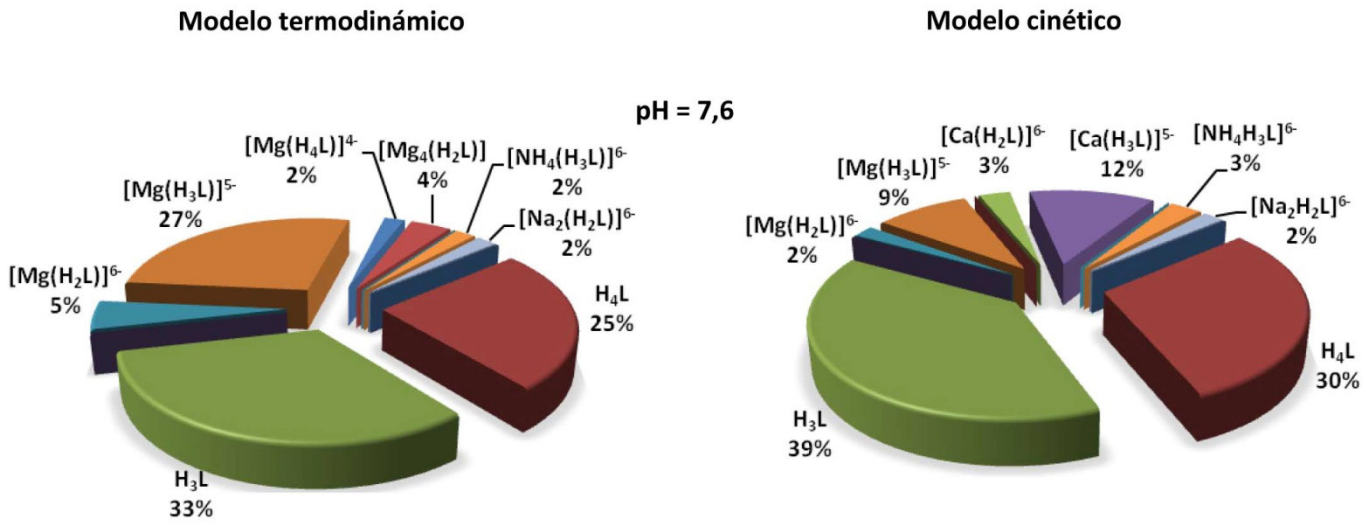


Figura 15.4. Especies del Ins(1,3,4,5,6)P_5 a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

En suma, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 permanece en solución, ya sea libre o formando complejos metálicos en su mayoría con sodio, magnesio o calcio. En base a los datos termodinámicos disponibles, no parece contribuir a la disminución en la biodisponibilidad de iones metálicos a nivel intestinal. Por el contrario, mantendría en esta ingesta una parte del magnesio y del calcio alimenticio en solución, para su absorción a nivel del intestino delgado.

Para representar a los "InsP_4" se utilizaron los datos termodinámicos del 4,6-bispirenoil-Ins(1,2,3,5)P_4 con H^+ y Fe^{3+}. Por tanto el análisis es de carácter provisorio y se limita a las especies libres del ligando y los complejos con hierro. En este caso en particular, ambos modelos coinciden en un único perfil de especiación (no se muestra). Todas las especies que se predicen presentes en el medio corresponden a diversas formas protonadas del ligando libre, por lo que no se esperaría, teóricamente para este tipo de ingesta, que los "InsP_4" contribuyan de forma significativa a la complejación de hierro a nivel gastrointestinal.

El Ins(1,2,3)P_3 se encuentra en el medio ácido del estómago altamente protonado. En la figura 15.5 se puede advertir que las especies predominantes en el rango de pH 1,5 – 4,0 corresponden a las especies H_4L^{2-} y H_3L^{3-}.

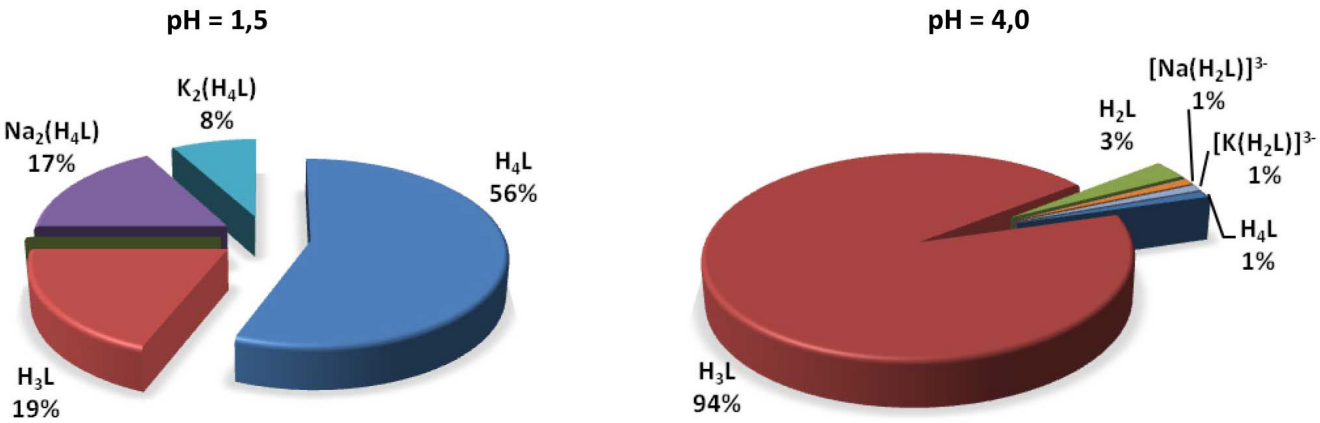


Figura 15.5. Especies del Ins(1,2,3)P_3 a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

Sin embargo, debido a la gran afinidad del Ins(1,2,3)P_3 por los iones alcalinos, el ligando forma complejos con el ion sodio y el ion potasio presentes en gran

concentración en el medio. Dado que la forma del ligando H_4L^{2-} posee la capacidad de formar complejos dinucleares estables en medio fuertemente ácido, a medida que el pH aumenta y H_3L^{3-} se vuelve predominante, la abundancia relativa de las especies complejas se reduce.

La deprotonación del ligando conduce a un incremento en el número de especies complejas presentes en el sistema. Esto provoca que los diagramas que representan la especiación química en el duodeno se tornen más complejos (figura 15.6). Los complejos metálicos con sodio, potasio y magnesio dominan el perfil de especies. A medida que aumenta el pH las especies con Na^+ y K^+ se vuelven más importantes, ya que la presencia de complejos con Mg^{2+} está limitada, como se verá más adelante, por la precipitación del fitato, carbonato y fosfato correspondientes.

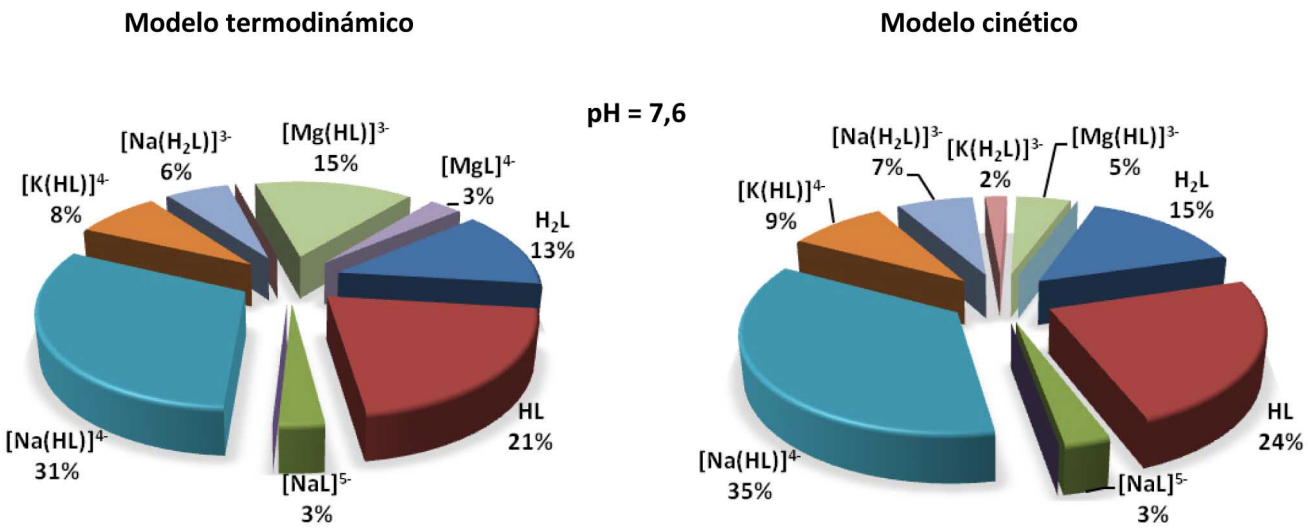


Figura 15.6. Especies del Ins(1,2,3)P_3 a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

Cuando no se considera la precipitación de las apatitas (modelo cinético), el perfil de especies no cambia demasiado. Los complejos con magnesio disminuyen en abundancia y aparece en muy baja proporción el complejo $[Ca(HL)]^{3-}$. Esto se debe a que tanto el calcio como el magnesio se encuentran formando sólidos, en su mayoría con los aniones fitato, carbonato y fosfato, lo que provoca una disminución apreciable en la concentración de ion metálico libre.

En conclusión para el sistema elegido, el Ins(1,2,3)P_3 se mantendría en solución en el tracto gastrointestinal, complejando sodio y potasio en gran extensión, y magnesio y calcio dependiendo de la cinética de precipitación de las fases sólidas que los contienen. Se puede afirmar que, dado el bajo contenido en "InsP_3", en estas condiciones estos inositol fosfatos actúan aumentando ligeramente la disponibilidad de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} a nivel intestinal.

4.2. Magnesio

Según se muestra en la figura 15.7, en el rango de pH comprendido entre 1,5 y 3,2 ambos modelos coinciden en un mismo perfil de especies químicas. El ion Mg^{2+} es la forma predominante del metal en el estómago.

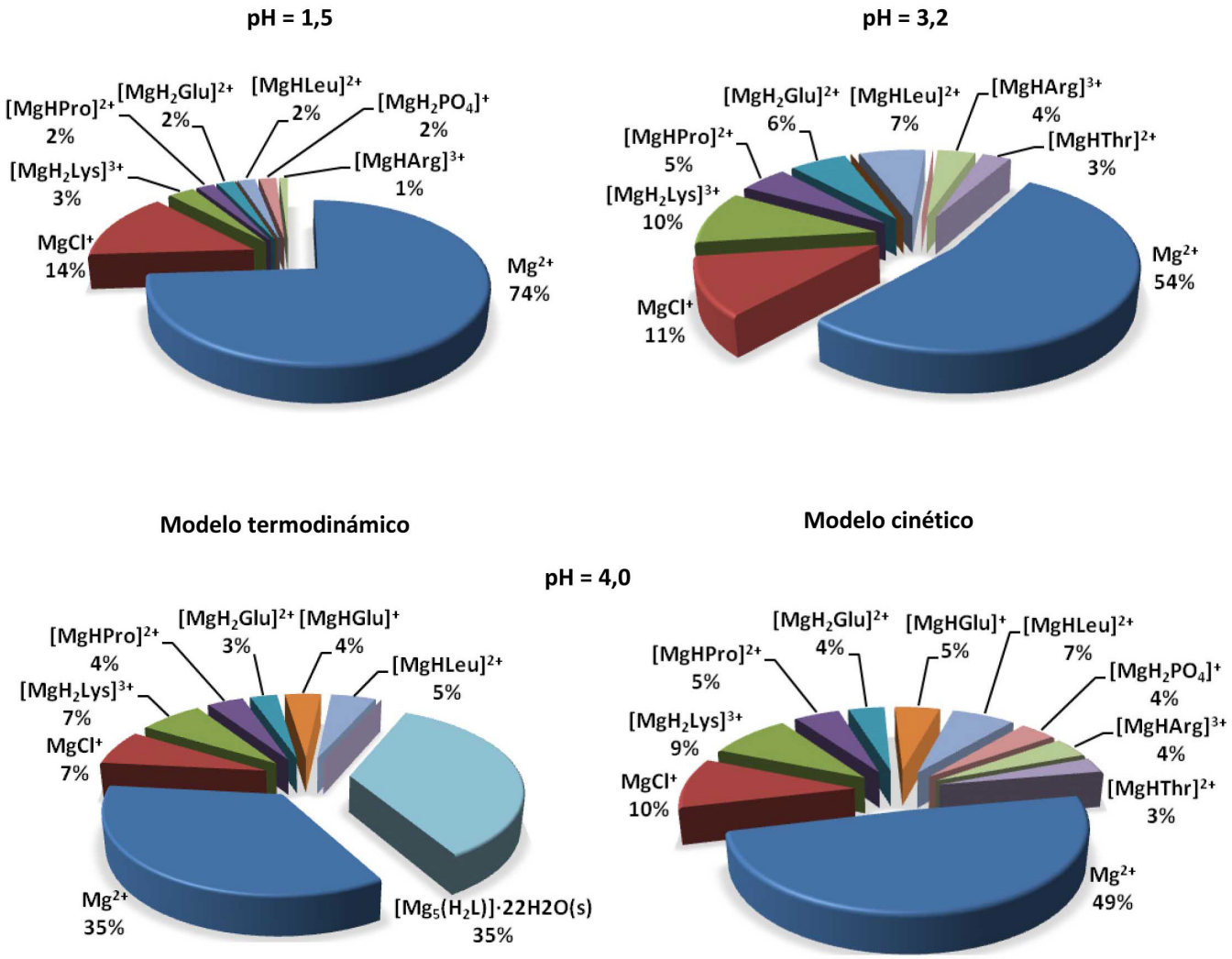


Figura 15.7. Especies de magnesio a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

Sin embargo, una gran proporción (entre 26 y 46 %) se encuentra unido a una variedad de ligandos, que incluyen Cl^- (aportado mayoritariamente por el jugo gástrico), PO_4^{3-}, y aminoácidos capaces de formar complejos protonados: lisina, prolina, ácido glutámico, leucina, arginina y treonina. A pH = 4,0, el modelo termodinámico predice la precipitación de un 35 % del magnesio presente en forma de fitato de magnesio. En este caso, los ligandos citados anteriormente aportan a la solubilidad del magnesio, compitiendo con el fitato por el ion metálico. El modelo cinético, sin embargo, muestra una distribución de especies acorde a la tendencia observada a valores de pH inferiores. A medida que el pH aumenta en el estómago, los aminoácidos se deprotonan y su capacidad de complejación aumenta. En este modelo el fitato deja de ser relevante, ya que se encuentra totalmente unido al calcio, formando la especie insoluble $[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$.

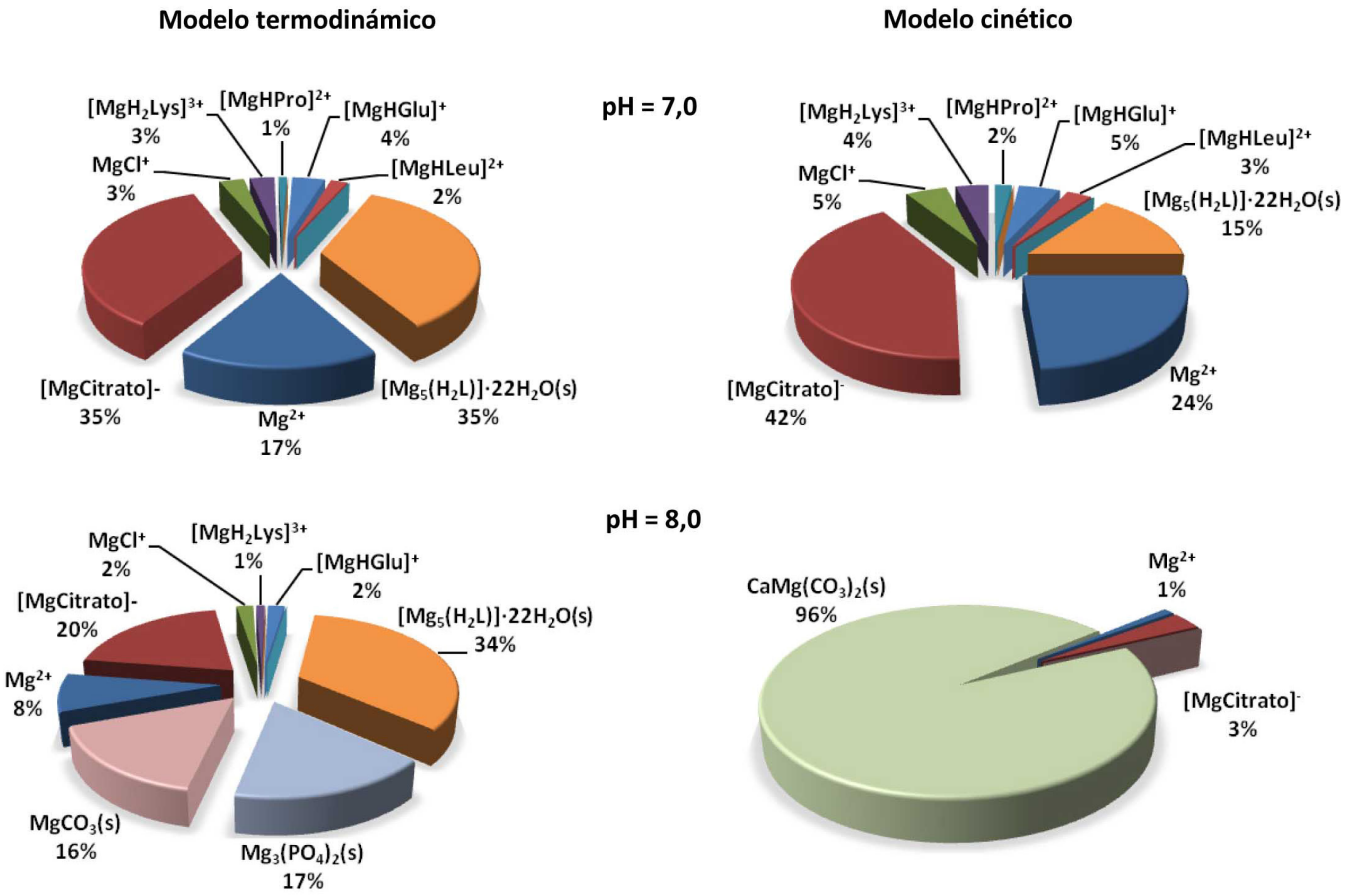


Figura 15.8. Especies de magnesio a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

A nivel del duodeno, el modelo termodinámico predice una distribución de especies similar hasta pH = 7,6 (figura 15.8). Aproximadamente un 35 % del magnesio se encuentra precipitado en forma de fitato de magnesio, mientras que el resto se encuentra libre o unido a cloruro, fosfato, algunos aminoácidos o citrato. Nuevamente, al igual que en el estómago, estos ligandos contribuyen a mantener el magnesio mayoritariamente en solución, y por tanto aumentan su disponibilidad en los sitios de absorción a nivel intestinal. Es de destacar el papel del anión citrato en este caso, siendo la especie $[MgCitrato]^-$ la principal contribuyente de la fracción soluble del metal en el sistema. A pH = 8,0, el perfil cambia moderadamente, y en presencia de grandes cantidades de fosfato (aportado por la leche) y carbonato (aportado por el páncreas y la bilis) se incluyen ahora dos fases sólidas adicionales: $MgCO_3(s)$ y $Mg_3(PO_4)_2(s)$. Esta precipitación provoca una disminución marcada en el contenido de magnesio biodisponible. Las características cinéticas de estos procesos de precipitación modularán este fenómeno.

En el modelo cinético, la inhibición de la formación de las apatitas genera la precipitación del fitato como fitato de calcio. Al disminuir la concentración de este ligando, el anión carbonato, en concentración apreciable en el duodeno, precipita junto al calcio restante y magnesio para formar dolomita, el cual domina el diagrama de distribución de especies desde valores de pH por encima de 7,3. Esto constituye una caída significativa en el nivel de magnesio soluble, aunque serán nuevamente las características cinéticas de la formación de la dolomita las que dictarán, en última instancia, la proporción de magnesio accesible para la absorción. Asimismo, en este modelo el citrato vuelve a aparecer como ligando “solubilizador”, manteniendo una parte del magnesio en la fase acuosa.

4.3. Calcio

El modelo termodinámico indica que en presencia de grandes cantidades de Cl^-, la especiación química del calcio en el estómago está dominada por la precipitación de la cloroapatita (ver figura 15.9). La predominancia de esta fase sólida aumenta dramáticamente con un aumento de pH, hasta contener prácticamente todo el calcio presente a pH = 4. Ambos aniones de este sólido, Cl^- y fosfato, así como algunos aminoácidos, aportan a la solubilización del

calcio presente, aunque sólo de forma moderadamente eficiente a pH bajos. El modelo cinético muestra, en contraposición, un perfil de especies más complejo, en donde el calcio se encuentra casi completamente todo en solución y en su mayoría libre. Hasta un 8 % del mismo se espera precipitado como fitato. Nuevamente el cloruro, fosfato y algunos aminoácidos contribuyen a mantener el ion metálico disuelto en la solución. En estas condiciones, se agrega a esta lista el citrato, que lograría formar complejos poco predominantes a valores de pH cercanos a 4.

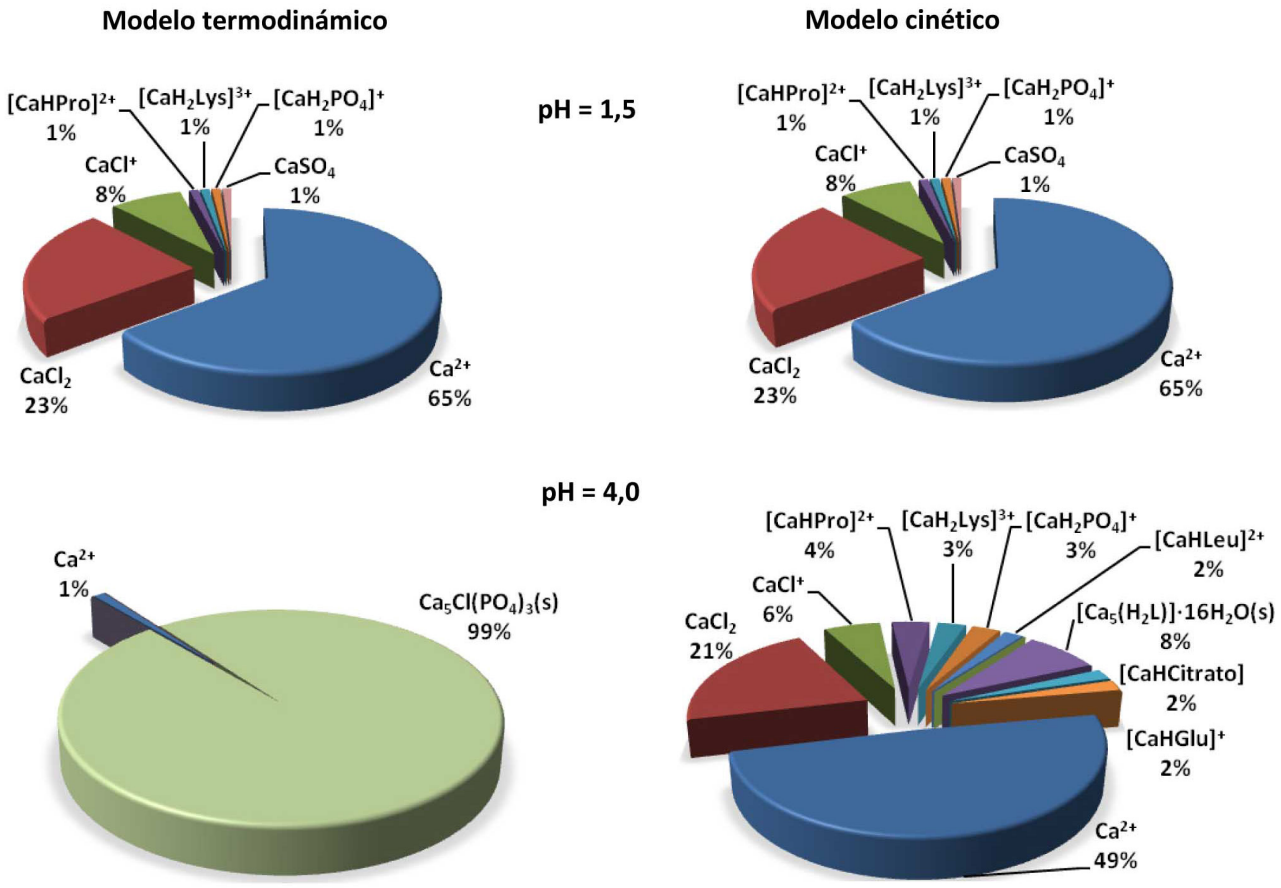


Figura 15.9. Especies de calcio a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

Como se espera de la extrapolación de los resultados del modelo termodinámico a nivel estomacal, en el duodeno el calcio se predice 100 % precipitado como cloroapatita (figura 15.10). Si se omite esta fase sólida, el modelo cinético establece un cambio en el diagrama de distribución de especies, aunque se mantiene el mismo resultado general: la mayoría del calcio

se encuentra asociado a aniones como fosfato y carbonato, en fases sólidas que precipitarían en el intestino delgado.

De forma adicional, se encuentra en el sistema hasta un 5 % del metal formando fitato de calcio insoluble. Nuevamente, el citrato parece jugar un papel no menor en la formación de complejos solubles con el ion Ca^{2+}, aumentando levemente la biodisponibilidad del metal.

Como conclusión, es factible que el calcio esté solubilizado en gran proporción en el estómago para este tipo de ingesta. Dependiendo de las condiciones podrá precipitar en parte como cloroapatita. Con la neutralización del medio y el aumento en la concentración de carbonatos en el duodeno, el calcio se espera en su mayoría precipitado, con un remanente en solución asociado mayoritariamente al ion citrato.

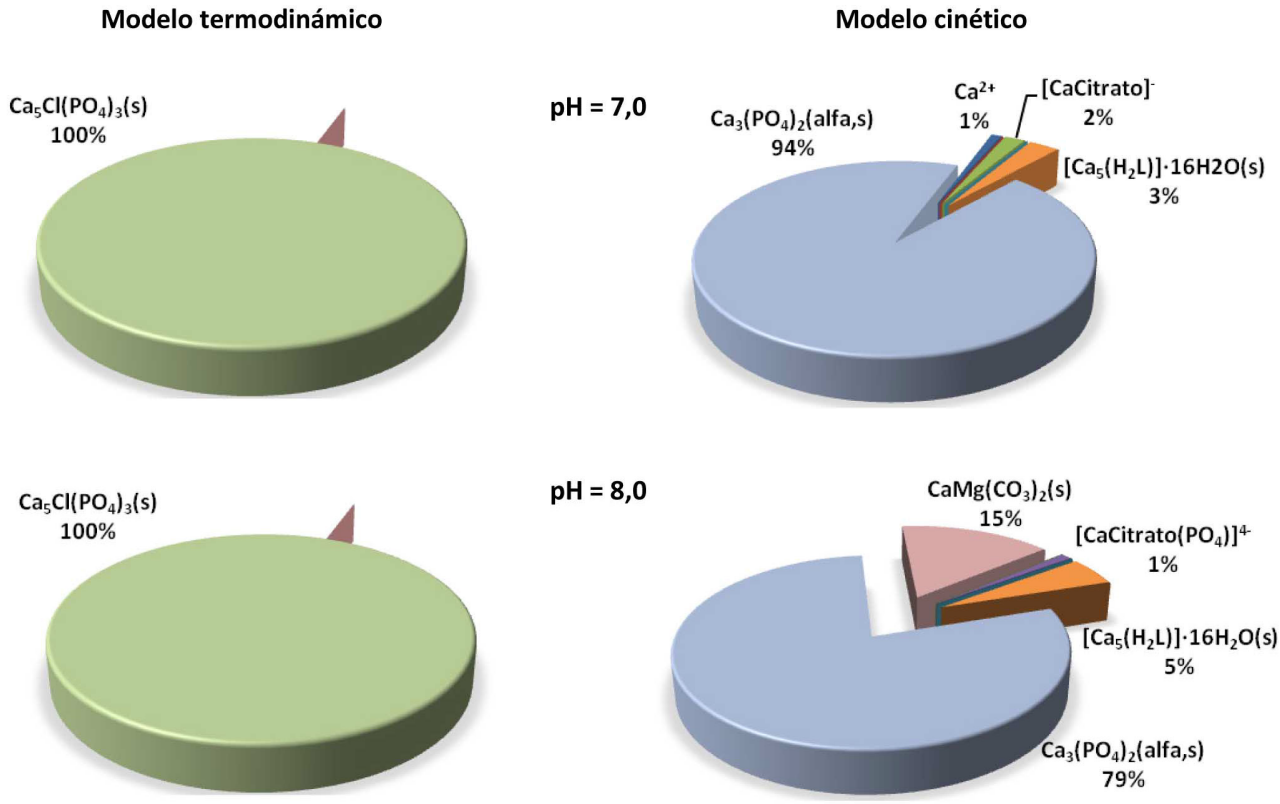


Figura 15.10. Especies de calcio a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

4.4. Manganeso

Las figuras 15.11 y 15.12 resumen el comportamiento del manganeso a nivel del tracto gastrointestinal. En rasgos generales, el ion metálico se encuentra en solución en el estómago y formando un fosfato insoluble en el duodeno.

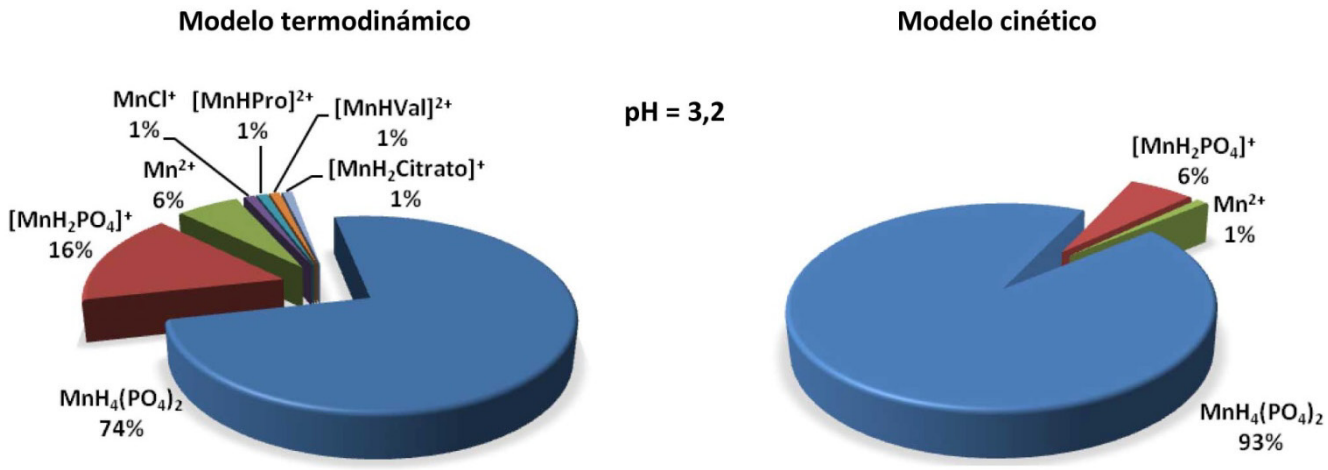


Figura 15.11. Especies de manganeso a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

El modelo termodinámico indica una baja significativa en la cantidad libre de PO_4^{3-} por la precipitación de la cloroapatita. Esto conlleva una disminución en la concentración de las especies fosfatadas, y un aumento consecuente en las especies solubles con cloruro, aminoácidos y citrato, que, como ya ha sido establecido, son ligandos "solubilizadores" de los iones metálicos polivalentes.

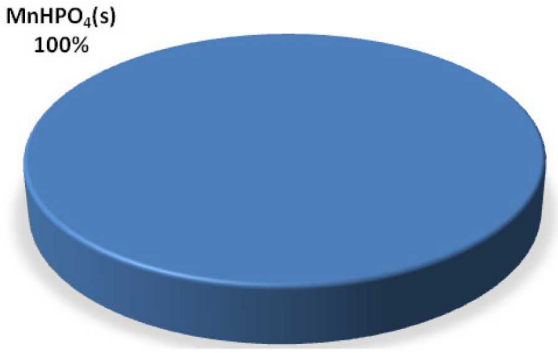


Figura 15.12. Especiación química del manganeso a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

La química del manganeso en este tipo de ingesta se espera que esté afectada por el fosfato. El grado de avance del proceso de precipitación de la especie $MnHPO_4(s)$ dependerá de la concentración del anión fosfato (requisito termodinámico) y de la velocidad de precipitación respecto del tiempo de estancia en las zonas de absorción (requisito cinético).

4.5. Cobre

La distribución de especies para el ion Cu^{2+} se detalla en la figura 15.13. Ambos modelos, termodinámico y cinético, coinciden en el mismo perfil de especies. Éste se mantiene invariable con el pH dentro de cada compartimento (estómago y duodeno).

En el medio ácido estomacal, la arginina complejea completamente al cobre, dando lugar a la especie $[Cu(HArg)]^{3+}$. Al pasar al duodeno, el marcado aumento de pH provoca la deprotonación de algunos aminoácidos y, por tanto, la formación de varios complejos metálicos involucrando histidina, tirosina, treonina, leucina, arginina, serina, fenilalanina y valina. En este tipo de ingesta, el cobre se encontraría en todo momento accesible para su absorción, siendo su perfil de especiación dominado de forma sustancial por la carga aminoacídica ingerida.

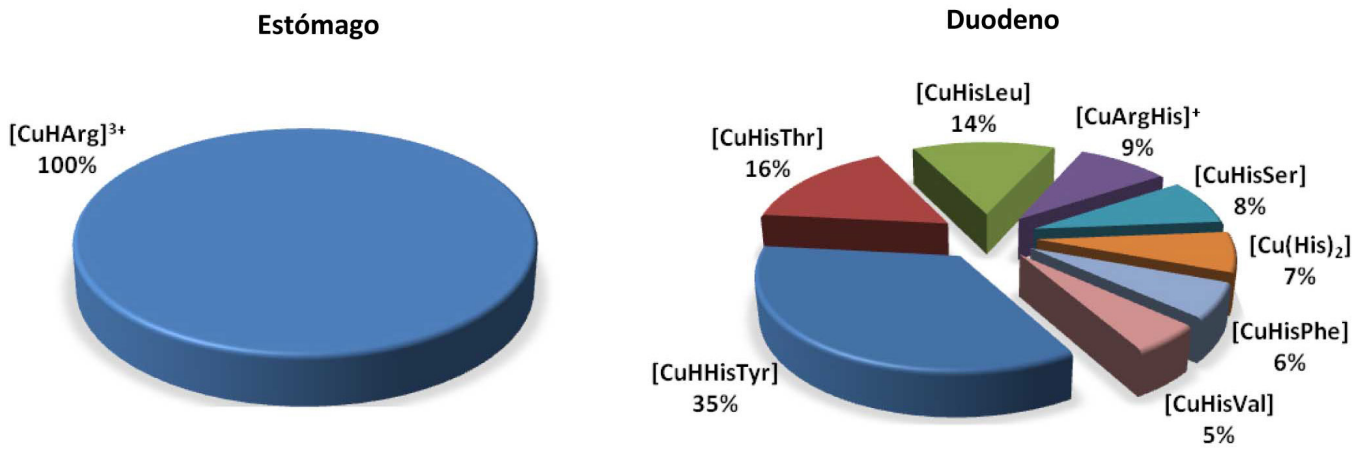


Figura 15.13. Especiación química del cobre a nivel gastrointestinal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

4.6. Cinc

La química del ion Zn^{2+} en este sistema se restringe a la fase acuosa; no se espera ninguna fase sólida en el sistema, incluso a valores de pH tan altos como 8 (figuras 15.14 y 15.15). Esto se debe al gran número de especies complejas estables que surgen de la unión en solución del ion metálico a diversos ligandos que se hacen presentes en el medio.

A nivel estomacal, ambos modelos predicen resultados muy similares, diferenciándose sólo en las especies conteniendo fosfato. El Zn permanece en su mayoría libre o coordinado al cloruro, aspartato, citrato y algunos aminoácidos dentro de los cuales se destaca la prolina. Con el aumento de pH el citrato se deprotona, convirtiéndose en el ligando más importante, secuestrando a pH = 4 casi la mitad del ion metálico total.

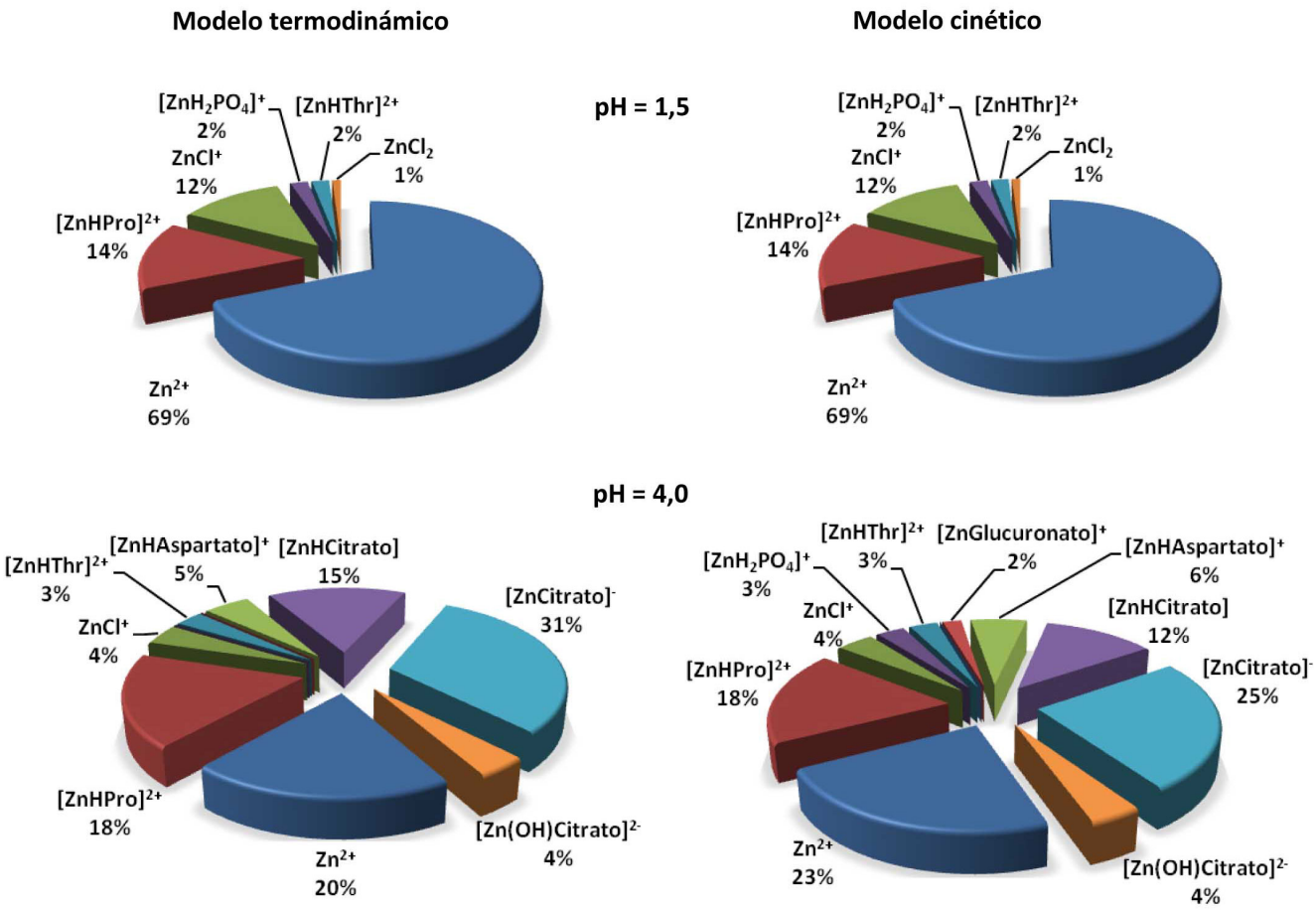


Figura 15.14. Especiación química del cinc a nivel gástrico (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

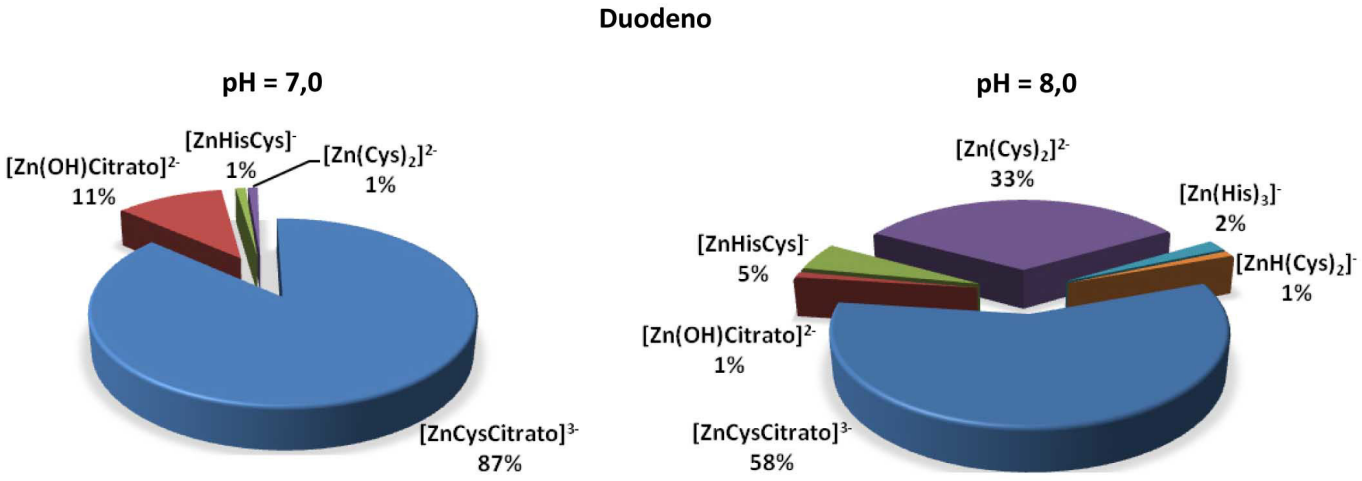


Figura 15.15. Especiación química del cinc a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

Siguiendo con la tendencia esperada, en el duodeno la mayoría del Zn^{2+} se encontraría asociado al citrato. Aparecen además en los diagramas de distribución de especies dos aminoácidos: cisteína e histidina. Ambos forman complejos estables, aportando a la solubilidad del metal en este compartimento. La biodisponibilidad de este metal es máxima en estas condiciones, según establecen ambos modelos.

4.7. Hierro

La distribución de especies del hierro en el estómago se muestra en la figura 15.16. Ambos modelos indican resultados muy similares. A valores de pH bajos, el ion metálico se encontraría en su mayoría unido a la treonina, con la cual forma las especies complejas $[Fe(HThr)]^{2+}$ y $[Fe(H_2Thr)]^{3+}$. El ligando mantiene un alto grado de protonación en estos compuestos y el hierro se encuentra en estado de oxidación +2. Con el aumento de pH aparece en el perfil de especies la glucosamina, componente del jugo gástrico, con la cual el hierro forma dos complejos muy estables. En efecto, a pH = 4, más de la mitad del hierro total se encuentra coordinado a este ligando. La glucosamina ha sido reportada por su gran capacidad de estabilización del estado de oxidación +2 de este metal, característica que retiene en un amplio rango de pH [130].

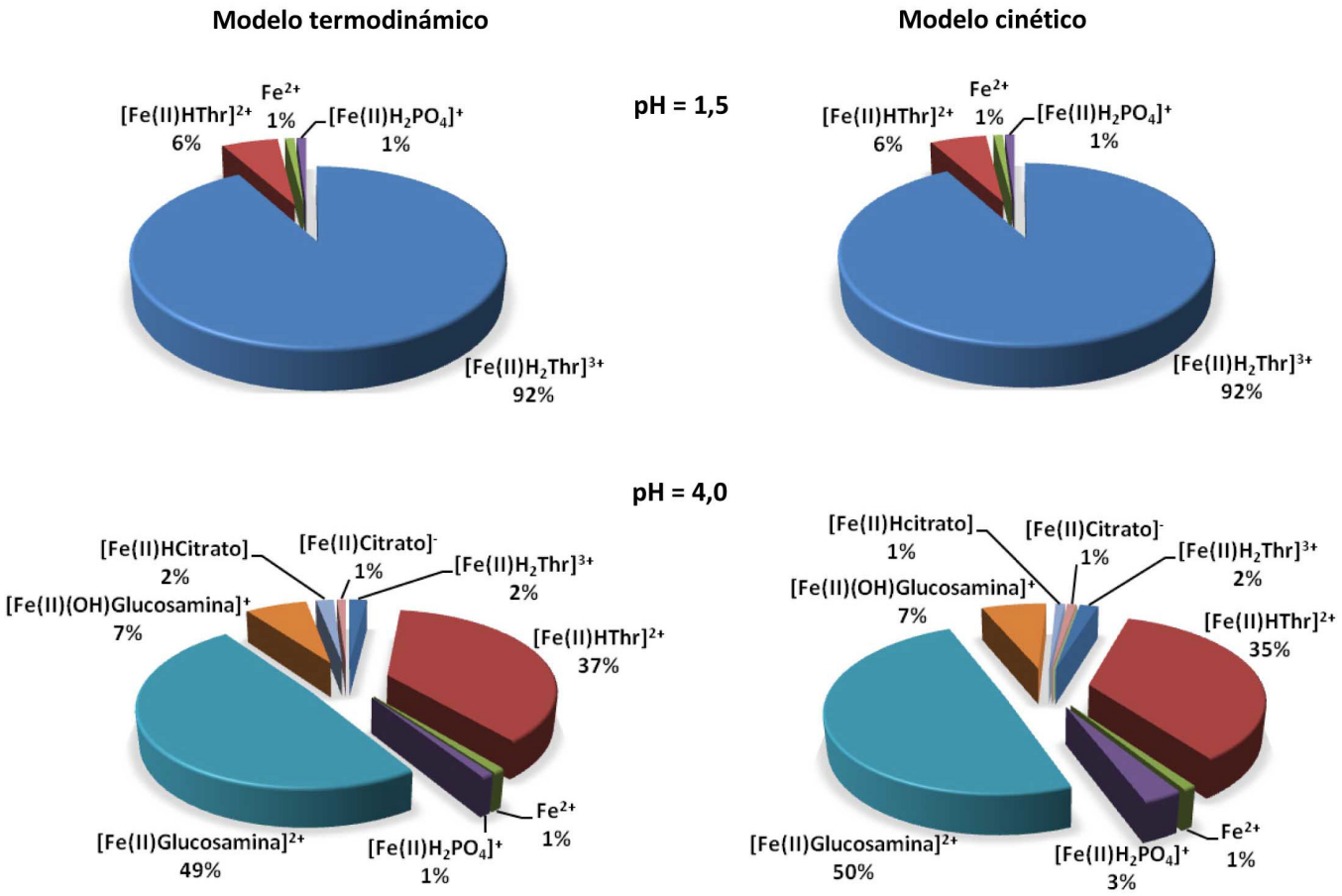


Figura 15.16. Especiación química del hierro a nivel estomacal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

En el duodeno, por el contrario, ambos modelos predicen resultados diferentes (figura 15.17). Aunque en este compartimento el potencial redox es negativo (-65,6 mV), el modelo termodinámico establece una oxidación prácticamente completa del hierro y su precipitación en forma de un hidroxifosfato complejo de hierro y calcio: $Fe_4Ca(OH)_8(PO_4)_2(H_2O)_7(s)$. Si se imponen restricciones cinéticas a la formación de fases sólidas complejas de hierro, el perfil cambia drásticamente. En este caso, el estado de oxidación del hierro se mantiene en +2, y los complejos con glucosamina dominan la especiación química del metal.

A modo de conclusión, el perfil de especiación del hierro en el tracto gastrointestinal se encuentra claramente dividido por compartimento. En el estómago, el hierro se espera completamente en solución en el estado de oxidación +2, siendo complejado por varios ligandos, dentro de los que se

destacan la treonina y la glucosamina. En el duodeno, el marcado aumento en el pH provocaría la estabilización del estado de oxidación +3, a partir de la formación de un fosfato insoluble. La cinética de precipitación de esta fase sólida determinaría el grado de solubilidad y por tanto la biodisponibilidad del hierro en los sitios de absorción.

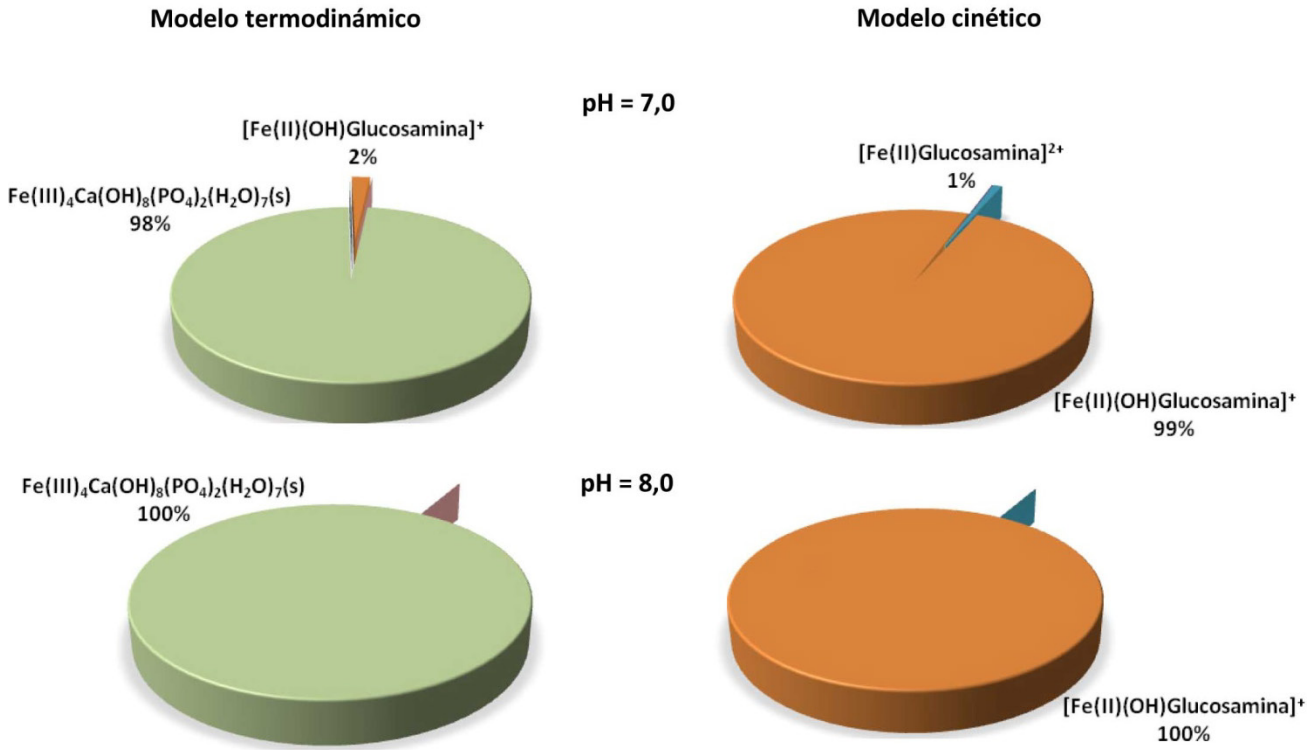


Figura 15.17. Especiación química del hierro a nivel duodenal (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

4.8. Ins*P* *vs*. ligandos presentes en la ingesta: secuestro de iones metálicos

Del análisis anterior se desprende que, en rasgos generales para este tipo de ingesta, los ligandos más importantes que se unen a los iones metálicos considerados son diferentes dependiendo de la fase que se esté considerando.

4.8.1. Solución acuosa

Los iones metálicos se mantienen solubilizados en esta fase gracias al aporte de varios ligandos presentes en los diversos compartimentos del tracto

gastrointestinal. A valores de pH bajos, el ion cloruro retiene en medida apreciable varios de los cationes estudiados. El ion fosfato participa aunque en mucho menor medida, excepto en el caso particular del Mn, donde juega un papel sustancial en la especiación química del sistema. Con el aumento de pH, la deprotonación del citrato provoca la formación de complejos metal-citrato solubles, los cuales son especialmente predominantes en el caso del Zn^{2+}. La glucosamina parece dominar el *pool* de compuestos solubles del hierro, compitiendo con la precipitación de fases sólidas muy poco solubles. Finalmente se encuentran los ligandos más versátiles: los aminoácidos. Estos son capaces de formar complejos metálicos con la mayoría de los cationes presentes, y su capacidad de complejación se ve, en conjunto, poco afectada en el rango de pH considerado. Son particularmente importantes en el perfil de especies del cobre, donde unen el 100 % del metal de la ingesta.

4.8.2. Estado sólido

La química de este sistema al estado sólido es compleja, debido al gran número de fases que potencialmente pueden precipitar. No obstante, es necesario su estudio, debido a que la solubilidad de los iones metálicos es un requisito indispensable para su absorción a nivel de la mucosa intestinal, modulando su biodisponibilidad. La base de datos del JESS cuenta en este caso con 189 compuestos sólidos, de los cuales una parte (entre 15 y 20, dependiendo de las condiciones) poseen un log(SI) > 0. Utilizando un criterio puramente termodinámico, se deriva que los ligandos más importantes a nivel de los procesos de precipitación son el propio fitato, el ion fosfato y el ion carbonato. En el marco del modelo aplicado, el ion fosfato es el único anión cuya concentración se está estimando a grandes rasgos, debido a que no hay estudios fiables sobre la fracción inorgánica del fósforo total de la leche. En consecuencia, resulta interesante analizar la especiación química al estado sólido, en función del pH y la concentración de ion fosfato. En la figura 15.18, se resumen los resultados a nivel estomacal.

A pH inferior a 2 no se formarían sólidos. Sin embargo, al aumentar el pH comienzan a formarse fases sólidas cuya naturaleza depende de la concentración de fosfato en el medio. A concentraciones altas de fosfato (como la utilizada en los cálculos anteriores: 9,32 mM), la cloroapatita se forma hasta

retener prácticamente todo el calcio presente a pH = 4 (meseta en el gráfico). En estas condiciones, en donde la concentración de calcio en solución ha disminuido drásticamente, a pH cercano a 4 el fitato logra deprotonarse lo suficiente como para formar el sólido $[Mg_5(H_2L)]\cdot 22H_2O$. A medida que la concentración de PO_4^{3-} disminuye, la cloroapatita comienza a perder predominancia y el fitato de calcio se forma hasta agotar todo el ligando libre, solubilizando consecuentemente la correspondiente sal de magnesio. En general, el predominio de la fase sólida del ion fosfato es indiscutible.

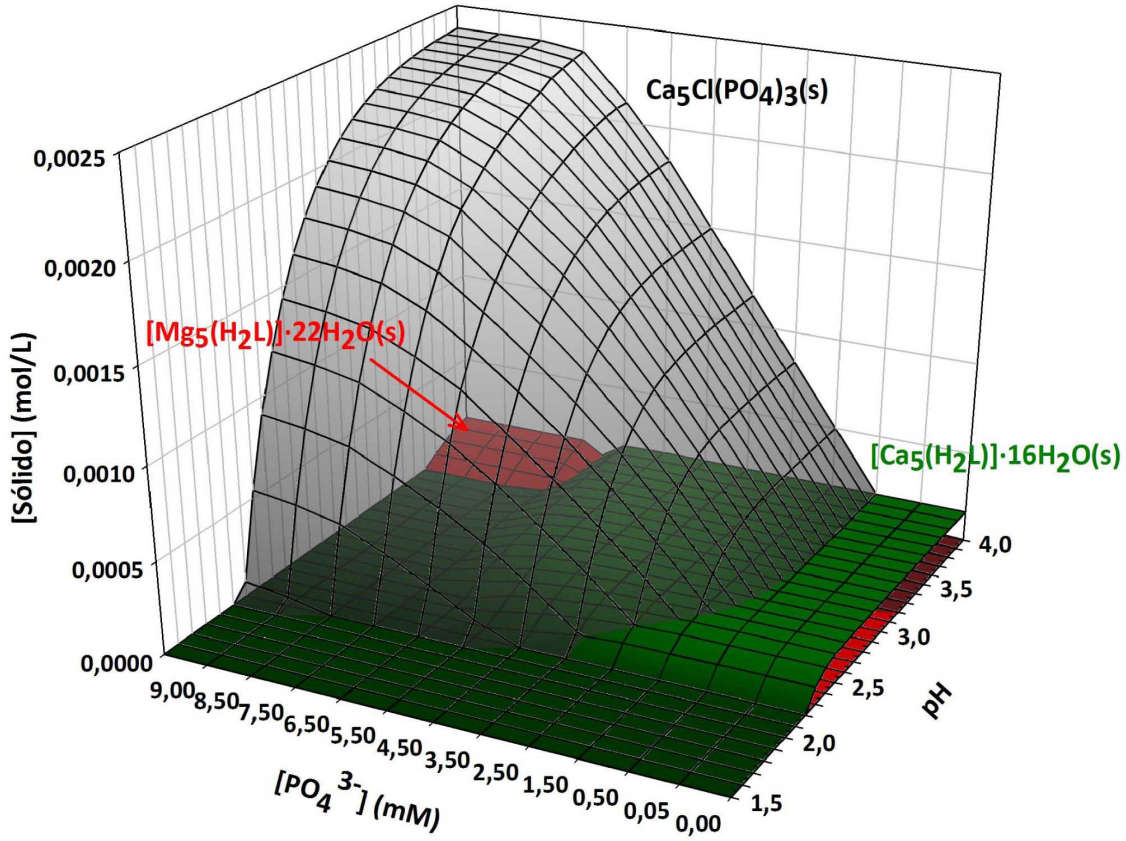


Figura 15.18. Variación de la "concentración" de las fases sólidas con el pH y la concentración de anión fosfato en estómago (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz).

En el duodeno, el cambio en las condiciones de pH y el aporte de carbonatos por el páncreas y la vesícula biliar provocan un aumento importante en el número de fases sólidas presentes. A medida que varía la concentración de ion fosfato, los procesos de precipitación están regidos por dos tipos de fases mayoritarias: fosfatos y carbonatos (figura 15.19A).

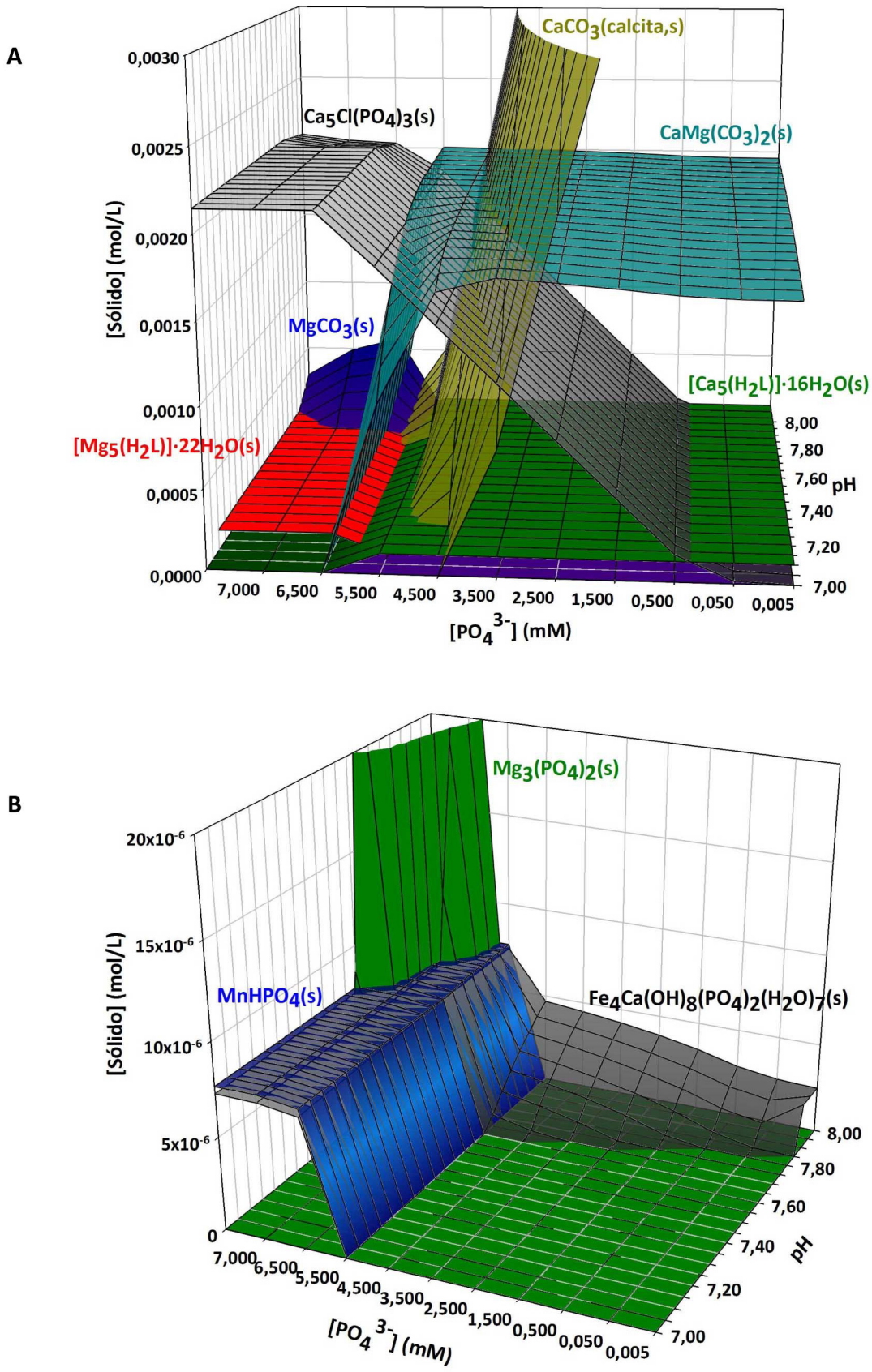


Figura 15.19. Variación de la "concentración" de fases sólidas con el pH y la concentración de anión fosfato en duodeno (200 g de leche entera + 50 g de cereal de maíz). (A) Fases mayoritarias. (B) Fases minoritarias.

Con independencia del pH del compartimento, a alta concentración de fosfato (valor estimado utilizado en los cálculos de las secciones anteriores: 7,3 mM), la cloroapatita retiene la mayoría del calcio disponible. Con sólo una modesta disminución de la carga de fosfato en la ingesta, el ion carbonato captura el calcio y el magnesio, dando lugar a dos fases insolubles: calcita ($CaCO_3$) y dolomita ($CaMg(CO_3)_2$). Debido a la basicidad del carbonato, al bajar el pH las superficies de estos dos sólidos en la figura 15.19A se curvan ligeramente, evidenciando una leve competencia entre los dos iones metálicos y el protón por el anión.

En menor concentración se encuentran los fitatos de magnesio y calcio, cuya predominancia relativa se encuentra modulada por la formación de la cloroapatita. En efecto, en presencia de este sólido, la concentración de calcio libre es muy baja, y el fitato prefiere unirse al ion Mg^{2+}. A pH suficientemente alto (cercano a 8), el anión carbonato logra deprotonarse como para asociar además algo del magnesio presente. Por otra parte, para pequeñas concentraciones de anión fosfato, el ion CO_3^{2-} es incapaz de capturar todo el calcio, y una parte de éste se une al fitato, formando la especie $[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$.

En la parte B de la figura 15.19 se detallan los resultados obtenidos para aquellas fases sólidas minoritarias que se esperan en el sistema. Como puede advertirse, todas corresponden a fosfatos, enfatizando aún más la importancia de este anión. El fosfato de magnesio parece ser una fase realmente minoritaria, ya que se forma en condiciones muy específicas: sólo a grandes concentraciones de fosfato y altos valores de pH. Adicionalmente, aunque el $MnHPO_4(s)$ posee un rango de estabilidad más amplio, una pequeña baja en la carga de fosfatos de la ingesta devuelve el ion metálico a la solución. Considerando además efectos cinéticos de precipitación, es posible que gran parte, sino todo el manganeso esté biodisponible a nivel duodenal. Finalmente, la fase $Fe_4Ca(OH)_8(PO_4)_2(H_2O)_7(s)$, que une la mayoría del hierro presente, es estable principalmente a concentraciones de ion fosfato apreciables (>5,5 mM). Por debajo de estos valores, la ocurrencia de este sólido se verá acotada sólo a valores de pH cercanos a 8. Así como se mencionó para el manganeso, si junto a estos resultados se consideran posibles restricciones cinéticas a la precipitación de esta fase, la proporción de hierro no biodisponible debe ser

sensiblemente menor que 100 % (valor para el modelo termodinámico en la sección anterior).

Es importante destacar que, aunque los iones fosfato y carbonato dan cuenta de una gran parte del calcio precipitado a nivel gastrointestinal, el fitato se espera completamente precipitado con calcio y/o magnesio en gran parte de las condiciones estudiadas. Esto da cuenta, además de la baja solubilidad de estas sales, de la gran capacidad de complejación de este ligando, el cual se encuentra en una concentración 60 veces inferior a la del fosfato y 130 veces inferior a la del carbonato.

4.9. Especiación química del sistema: dependencia con el nivel de ingesta

Una cuestión que surge de este análisis es la posible variación del perfil de especies químicas con la porción ingerida de cereal. El estudio de este aspecto hará posible verificar si existe una correlación significativa entre la cantidad de cereal que acompaña a la leche y el nivel de iones esenciales precipitados y en solución. Según se muestra en las tablas 15.3 y 15.4 un aumento del 100 % en la porción de cereal no conlleva un cambio apreciable en la especiación química en solución.

Las especies solubles mantienen en general su orden de predominancia con el pH. El único cambio relativamente importante en el perfil de especiación se debe al aumento en la carga aminoacídica de la ingesta, el cual hace que en algunos casos ocurra algún cambio en el orden de predominancia esperado.

Al estado sólido, el cobre y el cinc permanecen en solución incluso con 100 g de cereal por porción. En el caso particular del manganeso y del hierro, su especiación química tampoco se vería influida de forma significativa por el nivel de ingesta de cereal de maíz. Como ya se mencionó, la probable aparición de las fases sólidas correspondientes dependerá tanto del establecimiento de ciertas condiciones específicas (pH, concentración, etc.) como de la cinética de los diversos procesos de precipitación operativos.

El perfil de especies sólidas cambia para Mg y Ca, siendo modulado por la masa ingerida de cereal. Las figuras 15.20 y 15.21 representan el porcentaje de Mg^{2+} y Ca^{2+} en las fases sólidas formadas en el duodeno en función el pH.

Tabla 15.3. Porcentaje de las especies de algunos de los componentes del sistema en estómago (200 g de leche entera + 50 ó 100 g de cereal de maíz).

		Modelo termodinámico (% sobre el componente)								Modelo cinético (% sobre el componente)							
	pH	1,5		2,3		3,2		4,0		1,5		2,3		3,2		4,0	
	Masa cereal de maíz (g)	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100
InsP_6	$[H_9L]^{3-}$	60	55	9	6	0	0	0	0	60	55	4	6	0	0	0	0
	$[H_8L]^{4-}$	27	29	22	19	2	1	0	0	27	29	11	18	0	0	0	0
	$[H_7L]^{5-}$	12	16	55	58	34	33	1	3	12	16	28	59	0	0	0	0
	$[H_6L]^{6-}$	0	1	9	12	37	47	8	26	0	1	5	12	0	0	0	0
	$[H_5L]^{7-}$	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	$[Mg(H_6L)]^{4-}$	0	0	6	5	26	18	4	7	0	0	3	5	0	0	0	0
	$[Mg_5(H_2L)]\cdot 22H_2O(s)$	0	0	0	0	0	0	87	63	0	0	0	0	0	0	0	0
	$[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	100	100	100	100
InsP_5	$[H_7L]^{3-}$	24	21	4	3	0	0	0	0	24	21	4	3	0	0	0	0
	$[H_6L]^{4-}$	69	71	64	59	22	18	4	3	69	71	63	59	21	18	4	3
	$[H_5L]^{5-}$	6	8	32	37	77	81	92	92	6	8	33	38	78	81	85	88
	$[H_4L]^{6-}$	0	0	0	0	0	1	3	4	0	0	0	0	0	1	3	4
	$[Mg(H_4L)]^{4-}$	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
	$[Ca(H_4L)]^{4-}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7	4

InsP_4	$[H_6L]^{2-}$	100	100	99	99	92	91	65	61		100	100	99	99	92	91	63	60
	$[H_5L]^{3-}$	0	0	1	1	8	9	35	39		0	0	1	1	8	9	37	39
InsP_3	$[H_4L]^{2-}$	56	47	29	25	6	5	1	1		56	47	29	24	6	5	1	1
	$[H_3L]^{3-}$	19	18	57	56	90	89	93	92		19	18	58	56	90	90	93	92
	$[H_2L]^{4-}$	0	0	0	0	1	1	3	4		0	0	0	0	1	1	4	4
	$[Na_2(H_4L)]$	17	28	10	15	2	4	0	1		17	28	9	15	2	3	0	1
	$[K_2(H_4L)]$	8	7	4	4	1	1	0	0		8	7	4	4	1	1	0	0
	$[Na(H_2L)]^{3-}$	0	0	0	0	0	0	1	2		0	0	0	0	0	0	1	2
	$[K(H_2L)]^{3-}$	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	0	0	1	1
Mg	Mg^{2+}	74	66	61	50	53	42	35	24		74	66	61	50	53	42	49	40
	$MgCl^{+}$	14	18	12	14	11	12	7	7		14	18	12	14	11	12	10	11
	$[MgH_2Lys]^{3+}$	3	3	7	5	10	7	7	4		3	3	7	5	10	7	9	7
	$[MgHPro]^{2+}$	2	3	4	7	5	8	4	5		2	3	4	7	5	8	5	8
	$[MgH_2Glu]^{2+}$	2	3	5	8	6	10	3	4		2	3	5	8	6	9	4	6
	$[MgHGlu]^{+}$	0	0	0	0	0	0	4	5		0	0	0	0	0	0	5	8
	$[MgHLeu]^{2+}$	2	2	5	6	7	9	5	6		2	2	5	6	7	9	7	9
	$[MgH_2PO_4]^{+}$	2	1	3	2	0	0	0	0		2	1	4	3	5	3	4	3
	$[MgHArg]^{3+}$	1	2	3	4	4	4	0	3		1	2	3	4	4	4	4	4
	$[MgHThr]^{2+}$	0	1	0	2	3	3	0	2		0	1	0	2	0	3	3	3

	$[MgH_2His]^{3+}$	0	1	0	0	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0	0
	$[MgH_2Val]^{2+}$	0	0	0	2	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[MgHVal]^{+}$	0	0	0	0	0	3	0	0		0	0	0	2	0	3	0	0
	$[Mg(H_6L)]^{4-}$	0	0	0	0	0	2	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[Mg_5(H_2L)]\cdot 22H_2O(s)$	0	0	0	0	0	0	35	40		0	0	0	0	0	0	0	0
Ca	Ca^{2+}	64	53	36	32	4	3	1	1		64	53	57	47	52	37	49	35
	$CaCl_2$	23	33	15	22	2	3	0	0		23	33	23	32	22	27	21	27
	$CaCl^{+}$	8	9	5	6	1	1	0	0		8	9	7	8	7	7	6	6
	$[CaHPro]^{2+}$	1	2	2	3	0	1	0	0		1	2	3	5	4	5	4	5
	$[CaH_2Lys]^{3+}$	1	1	2	1	0	0	0	0		1	1	3	2	3	2	3	2
	$[CaH_2PO_4]^{+}$	1	1	1	1	0	0	0	0		1	1	2	2	3	2	3	2
	$[CaHLeu]^{2+}$	0	1	1	1	0	0	0	0		0	1	1	2	2	2	2	3
	$CaSO_4$	1	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0
	$[CaHThr]^{2+}$	0	0	0	1	0	0	0	0		0	0	0	1	0	1	0	1
	$[CaHGlu]^{+}$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
	$[CaH_2Glu]^{2+}$	0	0	0	1	0	0	0	0		0	0	0	1	0	1	0	0
	$[CaHArg]^{3+}$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	1	0	0	0	0
	[CaHCitrato]	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	2	0
	$[CaHGlu]^{+}$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	2	0

	$Ca_5Cl(PO_4)_3(s)$	0	0	40	33	93	92	99	99		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	4	0	8	15	8	16
Mn	$[MnH_4(PO_4)_2]$	75	75	86	86	75	75	70	69		75	75	90	90	93	92	93	93
	$[MnH_2PO_4]^+$	16	16	11	10	16	15	17	16		16	16	8	8	6	6	6	6
	Mn^{2+}	7	7	2	2	6	6	8	7		7	7	1	1	1	1	1	1
	$MnCl^+$	1	1	0	1	1	1	2	2		1	1	0	1	0	0	0	0
	$[MnHPro]^{2+}$	0	0	0	1	1	2	1	2		0	0	0	0	0	1	0	0
	$[MnHVal]^{2+}$	0	0	0	0	1	1	1	1		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[MnHThr]^{2+}$	0	0	0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[MnH_2Citrato]^+$	0	0	0	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	[MnHCitrato]	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[MnCitrato]^-$	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	0	0	0	0
Cu	$[CuHArg]^{3+}$	100	100	100	100	100	100	99	99		100	100	100	100	100	100	99	99
	$[Cu_2His]^{3+}$	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	0	0	1	1
Zn	Zn^{2+}	68	58	52	39	40	28	20	17		68	58	52	39	41	29	23	19
	$[ZnHPro]^{2+}$	14	23	28	41	32	45	18	29		14	23	28	41	30	42	18	29
	$ZnCl^+$	12	13	10	9	8	7	4	4		12	13	9	9	8	7	4	5
	$[ZnH_2PO_4]^+$	2	2	3	2	0	0	0	0		2	2	4	3	4	3	3	2

	$[ZnHThr]^{2+}$	2	2	4	4	5	5	3	3		2	2	4	4	5	5	3	3
	$ZnCl_2$	1	2	1	1	0	1	0	0		1	2	1	1	0	0	0	0
	$[ZnHGlu]^{+}$	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[ZnH_2Citrato]^{+}$	0	0	1	1	3	2	0	1		0	0	1	1	3	2	0	0
	$[ZnGlucuronato]^{+}$	0	0	1	1	2	2	0	1		0	0	1	1	0	2	2	2
	$[ZnHAspartato]^{+}$	0	0	0	1	4	5	5	9		0	0	0	1	4	6	6	10
	[ZnHCitrato]	0	0	0	0	6	4	15	10		0	0	0	0	6	4	12	9
	$[ZnCitrato]^{-}$	0	0	0	0	0	1	31	21		0	0	0	0	0	1	25	19
	$[Zn(OH)Citrato]^{2-}$	0	0	0	0	0	0	4	3		0	0	0	0	0	0	4	3
Fe	$[FeH_2Thr]^{3+}$	92	93	66	68	17	19	2	2		92	93	65	68	17	19	2	2
	$[FeHThr]^{2+}$	6	6	29	27	63	65	37	44		6	6	28	27	59	62	35	42
	Fe^{2+}	1	1	2	1	2	2	1	1		1	1	2	1	2	2	1	1
	$[FeH_2PO_4]^{+}$	1	1	2	2	2	1	1	1		1	1	3	2	6	4	3	3
	$[FeGlucosamina]^{2+}$	0	0	1	1	15	11	49	44		0	0	1	1	15	11	49	44
	$[Fe(OH)Glucosamina]^{+}$	0	0	0	0	0	0	7	6		0	0	0	0	0	0	7	6
	[FeHCitrato]	0	0	0	0	0	1	2	1		0	0	0	0	1	1	1	1
	$[FeCitrato]^{-}$	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0	1	1

Tabla 15.4. Porcentaje de las especies de algunos de los componentes del sistema en duodeno (200 g de leche entera + 50 ó 100 g de cereal de maíz).

		Modelo termodinámico (% sobre el componente)								Modelo cinético (% sobre el componente)							
	pH	7,0		7,3		7,6		8,0		7,0		7,3		7,6		8,0	
	Masa cereal de maíz (g)	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100
InsP_6	$[Mg_5(H_2L)]\cdot 22H_2O(s)$	100	100	100	100	100	100	100	100	42	60	0	53	0	16	0	0
	$[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$	0	0	0	0	0	0	0	0	58	40	100	47	100	84	100	100
InsP_5	$[H_5L]^{5-}$	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	$[H_4L]^{6-}$	56	58	40	42	25	26	14	12	44	49	40	38	30	27	16	13
	$[H_3L]^{7-}$	18	24	26	35	32	44	45	50	15	20	26	32	39	46	53	57
	$[H_2L]^{8-}$	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	1	2	3
	$[Mg(H_2L)]^{6-}$	1	1	2	2	5	4	9	8	0	1	1	1	2	2	0	2
	$[Mg(H_3L)]^{5-}$	16	10	23	15	27	18	19	14	17	13	15	12	9	9	3	4
	$[Mg(H_4L)]^{4-}$	5	3	3	2	2	1	0	0	5	3	2	2	0	1	0	0
	$[Mg_4(H_2L)]$	1	0	2	0	4	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	$[Ca(H_2L)]^{6-}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	3	2	5	3
	$[Ca(H_3L)]^{5-}$	0	0	0	0	0	0	0	0	13	9	12	9	12	7	9	4
	$[Ca(H_4L)]^{4-}$	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	1	0	0	0	0
	$[NH_4(H_3L)]^{6-}$	1	1	2	2	2	2	3	2	0	1	2	2	3	2	3	2

	$[Na_2(H_2L)]^{6-}$	0	1	1	1	2	3	7	10		0	0	0	1	2	4	8	11
	$[K_2(H_2L)]^{6-}$	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	0	1
InsP_4	$[H_5L]^{3-}$	9	7	3	2	1	1	0	0		9	7	3	2	1	1	0	0
	$[H_4L]^{4-}$	42	39	29	25	16	14	6	5		42	39	29	25	16	14	6	5
	$[H_3L]^{5-}$	48	52	65	68	74	75	72	68		48	52	65	68	74	75	72	68
	$[H_2L]^{6-}$	1	2	4	5	8	11	21	24		1	2	4	5	8	11	21	25
	$[HL]^{7-}$	0	0	0	0	0	0	1	2		0	0	0	0	0	0	1	1
InsP_3	$[H_3L]^{3-}$	0	1	0	0	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0	0
	$[H_2L]^{4-}$	32	30	21	20	13	11	6	5		30	29	22	20	15	12	7	5
	$[HL]^{5-}$	13	15	18	19	21	23	24	24		12	14	18	19	24	24	27	26
	L^{6-}	0	0	0	0	0	0	0	2		0	0	0	0	0	0	0	2
	$[NaL]^{5-}$	0	1	0	2	3	4	8	9		0	1	0	2	3	4	9	10
	$[KL]^{5-}$	0	0	0	0	0	1	0	2		0	0	0	0	0	0	2	2
	$[Na(HL)]^{4-}$	20	23	26	30	31	35	36	37		19	22	28	30	36	37	40	40
	$[K(HL)]^{4-}$	5	5	7	7	8	8	9	8		5	5	7	7	9	8	10	9
	$[Na(H_2L)]^{3-}$	16	16	10	10	6	6	3	3		15	15	11	10	7	6	3	3
	$[K(H_2L)]^{3-}$	5	4	3	3	0	2	0	0		4	4	3	3	2	2	0	0
	$[Mg(HL)]^{3-}$	10	6	13	8	15	9	9	6		12	9	9	7	5	5	2	2
	$[MgL]^{4-}$	0	0	1	1	3	2	5	4		0	0	0	1	0	1	0	1

	$[Ca(HL)]^{3-}$	0	0	0	0	0	0	0	0		2	1	2	1	0	1	0	0
Mg	Mg^{2+}	17	11	17	11	17	11	8	7		24	17	11	10	4	5	1	2
	$[MgCitrato]^{-}$	35	18	35	18	35	18	20	13		42	25	22	16	10	9	3	3
	$MgCl^{+}$	3	3	3	3	3	3	2	2		5	4	2	3	1	1	0	0
	$[MgH_2Lys]^{3+}$	3	2	3	2	3	2	1	1		4	2	2	1	1	1	0	0
	$[MgHPro]^{2+}$	1	2	1	2	0	2	0	1		2	3	1	2	0	1	0	0
	$[MgHGlu]^{+}$	4	4	4	4	3	4	2	3		5	7	2	4	1	2	0	1
	$[MgHLeu]^{2+}$	2	2	2	2	2	2	0	1		3	3	1	2	1	1	0	0
	$[MgH_2PO_4]^{+}$	0	0	0	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[MgHArg]^{3+}$	0	1	0	1	0	1	0	0		0	2	0	1	0	0	0	0
	$[MgHThr]^{2+}$	0	1	0	1	0	0	0	0		0	2	0	0	0	0	0	0
	$[MgHVal]^{2+}$	0	0	0	0	0	1	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[Mg_5(H_2L)]\cdot 22H_2O(s)$	35	56	35	57	36	57	34	57		15	35	0	30	0	9	0	0
	$Mg_3(PO_4)_2(s)$	0	0	0	0	0	0	17	11		0	0	0	0	0	0	0	0
	$MgCO_3(s)$	0	0	0	0	0	0	16	3		0	0	0	0	0	0	0	0
	$CaMg(CO_3)_2(s)$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	59	32	83	71	95	93
Ca	Ca^{2+}	0	0	0	0	0	0	0	0		1	1	1	1	0	0	0	0
	$CaCl_2$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0	0
	$[CaCitrato]^{-}$	0	0	0	0	0	0	0	0		2	1	1	1	1	1	0	0

	$[CaCitrato(PO_4)]^{4-}$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	1	1	1	1	1	1
	$Ca_5Cl(PO_4)_3(s)$	100	100	100	100	100	100	100	100		0	0	0	0	0	0	0	0
	$[Ca_5(H_2L)]\cdot 16H_2O(s)$	0	0	0	0	0	0	0	0		3	5	5	5	5	8	5	10
	$Ca_3(PO_4)_2(alfa,s)$	0	0	0	0	0	0	0	0		93	92	83	86	80	77	78	72
	$CaMg(CO_3)_2(s)$	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	9	6	13	13	15	17
Mn	$[MnCitrato]^-$	0	1	0	1	0	1	0	1		0	1	0	1	0	1	0	1
	$MnHPO_4(s)$	100	99	100	99	100	99	100	99		100	99	100	99	100	99	100	99
Cu	[CuHHisTyr]	35	29	34	29	34	29	34	28		35	29	34	29	34	29	34	28
	[CuHisThr]	16	15	16	15	16	15	15	14		16	15	16	15	16	15	15	14
	[CuHisLeu]	14	14	14	14	14	14	15	14		14	14	14	14	14	14	15	14
	$[CuArgHis]^+$	9	9	9	9	9	9	9	8		9	9	9	9	9	9	9	8
	[CuHisSer]	8	11	8	10	8	10	8	10		8	11	8	10	8	10	8	10
	$[Cu(His)_2]$	7	6	8	6	8	6	8	6		7	6	8	6	8	6	8	6
	[CuHisPhe]	6	5	6	5	6	5	6	5		6	5	6	5	6	5	6	5
	[CuHisVal]	5	5	5	5	6	5	6	5		5	5	5	5	5	5	6	5
	$[CuH(His)_2Ser]$	0	4	0	4	0	4	0	0		0	4	0	4	0	4	0	0
	[CuGlyHis]	0	3	0	3	0	3	0	3		0	3	0	3	0	3	0	3
	$[CuGly(Thr)_2]^-$	0	0	0	0	0	0	0	6		0	0	0	0	0	0	0	6

Zn	$[ZnCysCitrato]^{3-}$	86	90	87	85	79	69	57	38		85	89	87	84	81	70	58	38
	$[Zn(OH)Citrato]^{2-}$	11	5	6	3	3	1	1	0		11	5	6	3	3	1	1	0
	$[ZnHisCys]^{-}$	1	1	2	2	4	4	5	4		1	1	2	2	3	4	5	4
	$[Zn(Cys)_2]^{2-}$	1	2	4	8	11	23	33	53		1	3	4	8	10	22	32	53
	$[Zn(His)_3]^{-}$	0	0	0	0	1	1	2	1		0	0	1	1	1	1	2	1
	$[ZnH(Cys)_2]^{-}$	0	1	0	1	1	1	1	1		0	1	0	1	1	1	1	1
	$[ZnGly(Cys)_2]^{3-}$	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	0	1
	$[ZnLeuCys]^{-}$	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	0	1
Fe	$[FeGlucosamina]^{2+}$	0	0	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0
	$[Fe(OH)Glucosamina]^{+}$	2	1	1	1	1	0	0	0		99	99	100	100	100	100	100	100
	$Fe_4Ca(OH)_8(PO_4)_2(H_2O)_7(s)$	98	99	99	99	99	100	100	100		0	0	0	0	0	0	0	0

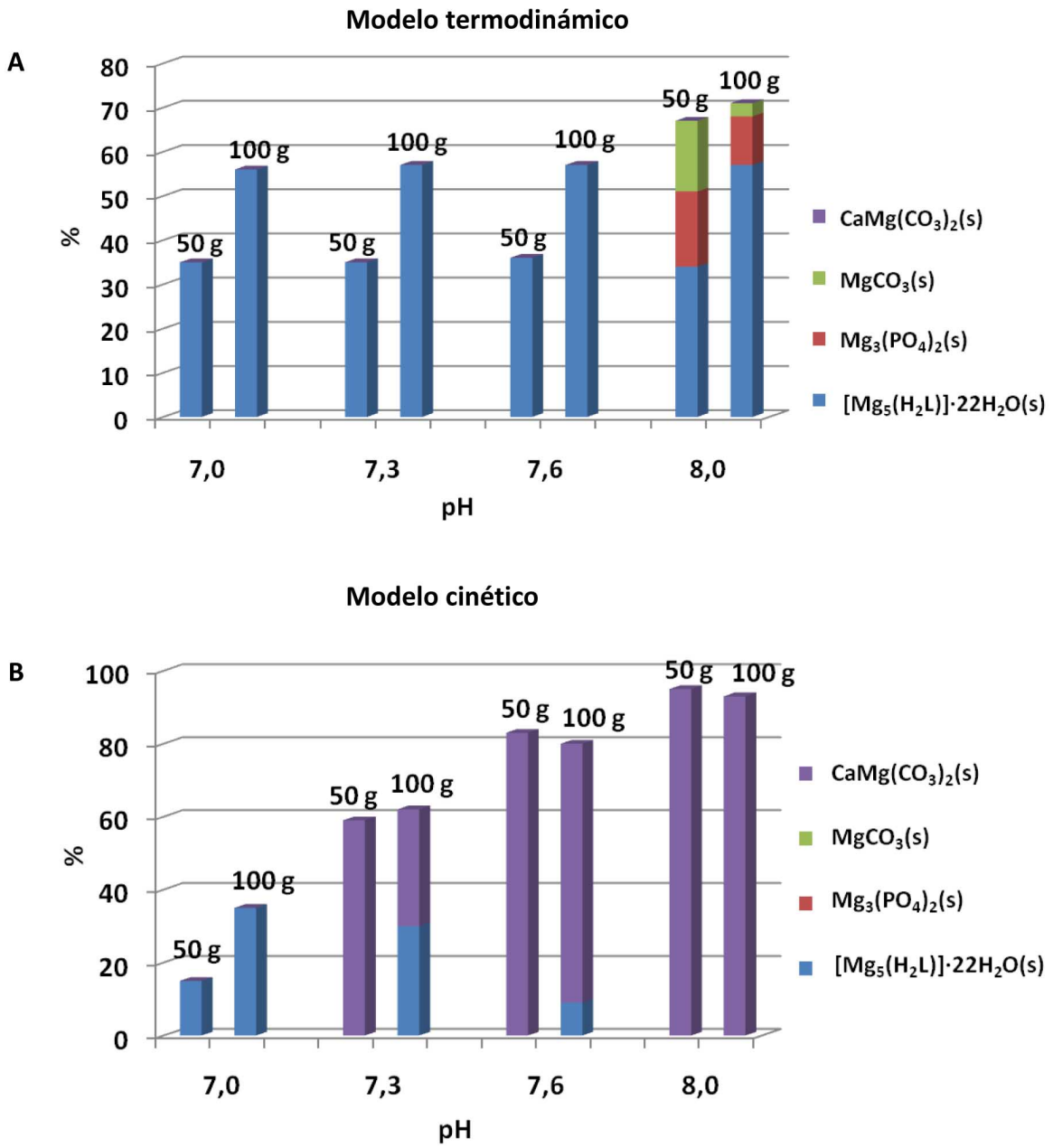


Figura 15.20. Variación del porcentaje de magnesio precipitado con el pH en el duodeno (200 g de leche entera + 50 g ó 100 g de cereal de maíz).

Según el modelo termodinámico, la proporción de magnesio precipitado se ve influida moderadamente por la cantidad de cereal de la ingesta. Este efecto es más pronunciado para valores de pH entre 7,0 y 7,6, donde al estado sólido el perfil de especies es dominado por el fitato. Al duplicarse la masa de cereal también lo hace la de fitato, aumentando alrededor de un 20 % el porcentaje de metal en la fase sólida. Cuando el pH se hace cercano a 8, aparecen en el sistema el carbonato y fosfato de magnesio, "amortiguando" este efecto. Estas

fases se forman en el sistema en una extensión tal que aumentan la precipitación del magnesio hasta un nivel de aproximadamente 70 %, quedando un 30 % soluble que se estabiliza por la asociación a ligandos pequeños, como el citrato.

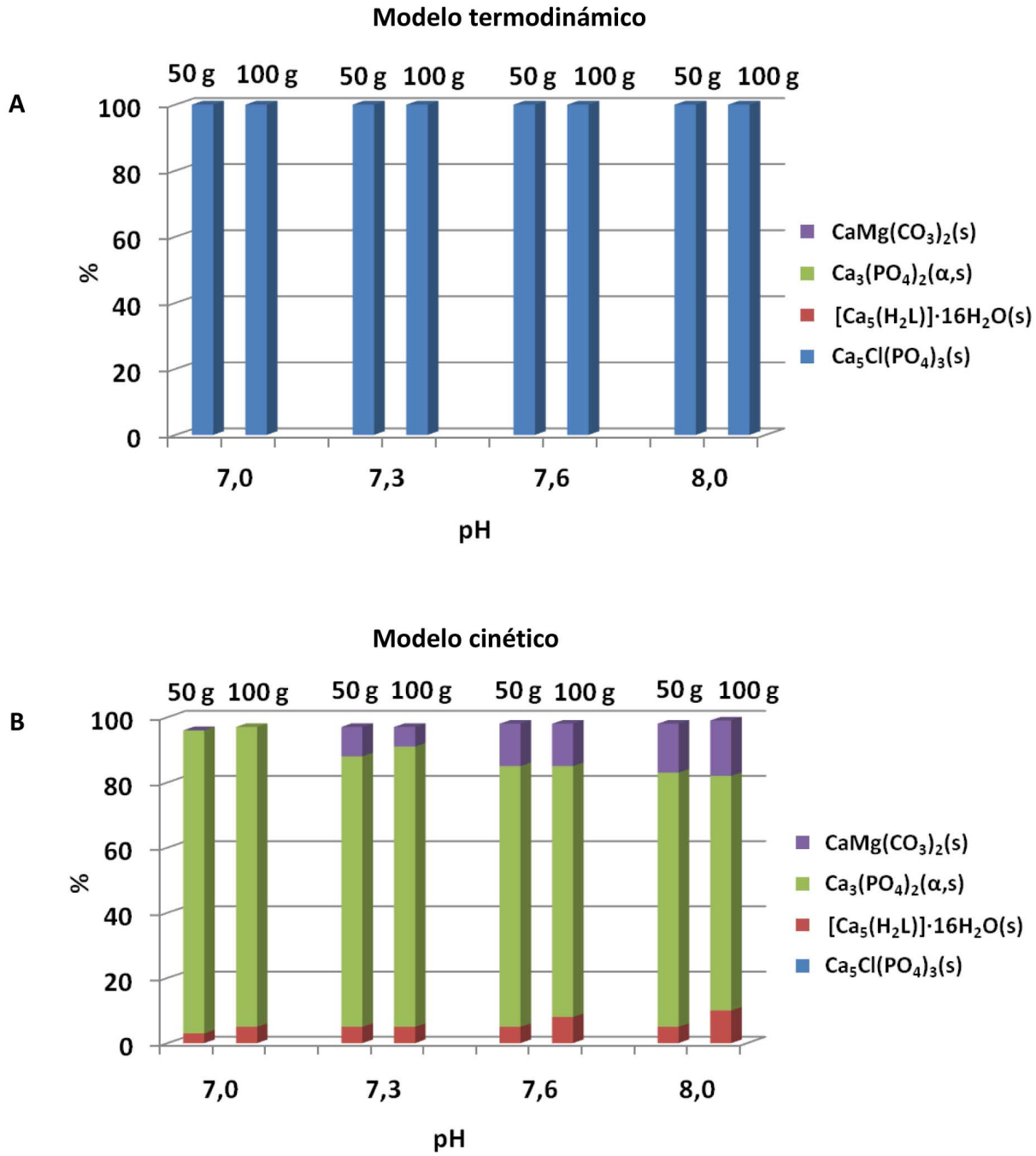


Figura 15.21. Variación del porcentaje de calcio precipitado con el pH en el duodeno (200 g de leche entera + 50 g ó 100 g de cereal de maíz).

A medida que se interponen restricciones cinéticas a la precipitación del calcio como cloroapatita, la formación de dolomita comienza a dominar el perfil de especies sólidas del magnesio (figura 15.20). Al duplicar la cantidad de cereal consumida, el fitato de magnesio tendría existencia real hasta pH = 7,6, aunque en una baja proporción. Esto tiene como consecuencia inmediata el mismo tipo de "amortiguamiento" descrito anteriormente, haciendo que por encima de pH = 7,3 la proporción de magnesio en las fases sólidas sea constante con la ingesta de cereal.

En conclusión, al duplicar la masa de cereal ingerida, se predice un aumento de 20 % en la masa de magnesio no biodisponible. Por el contrario, a medida que el medio se alcaliniza, se espera que la precipitación de fosfatos y/o carbonatos de magnesio atenúe este efecto, independizando la proporción de metal precipitado (entre 70 y 90 %) de la carga de cereal en la porción.

El mismo análisis sobre el calcio revela resultados un poco diferentes. Aunque la especiación química cambia radicalmente dependiendo del modelo utilizado, ambos predicen casi un 100 % de precipitación del ion metálico a nivel duodenal (figura 15.21). En este caso, dado que la cantidad de calcio presente es muy grande respecto a la de fitato, el sólido correspondiente se ubica como una especie minoritaria del sistema, si es que las restricciones cinéticas para la formación de la cloroapatita permiten su aparición. El nivel de calcio no biodisponible, en esta ingesta, no parece depender de la masa de cereal, sino posiblemente de dos parámetros: las características cinéticas de los procesos de precipitación involucrados y la presencia de ligandos "solubilizadores", como el citrato.

4.10. Especiación química del sistema: dependencia con el tipo de cereal

Para finalizar con el análisis químico del sistema leche + cereal, resulta interesante evaluar las consecuencias de la inclusión de un tipo de cereal con muy alto contenido en inositol fosfatos. Se seleccionó en esta instancia el cereal de salvado de trigo "All-Bran" de la marca Kellogg's. Siguiendo los lineamientos aplicados, se consideró una ingesta tipo aproximada de un vaso de leche entera (200 g) y 50 g de cereal. Las concentraciones totales en estómago y duodeno son las que se detallan en la tabla E4 del Anexo E.

El cambio en la composición del cereal repercute en la extensión de los procesos de precipitación, tanto en el estómago como en el duodeno, alterando la distribución de las especies solubles. En la tabla 15.5 se detallan los porcentajes de ion metálico precipitado en el duodeno para las ingestas consideradas hasta aquí. Los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} permanecen en solución en todos los casos, gracias a su asociación con aminoácidos, citrato y otros ligandos quelantes de bajo peso molecular. Por su parte, los iones hierro y calcio continúan siendo precipitados en gran extensión según el modelo termodinámico, mientras que el modelo cinético sigue indicando al primero de ellos completamente en solución, estabilizado en su estado +2 por la glucosamina.

Tabla 15.5. Porcentaje de ion metálico precipitado en el duodeno para una ingesta tipo de 50 g de cereal de maíz o salvado junto a 200 g de leche entera.

Duodeno	Cereal de maíz		Cereal de salvado de trigo	
pH	7,6		7,6	
Masa de cereal (g)	50		50	
Modelo	Termodinámico	Cinético	Termodinámico	Cinético
Mg	36	83	95	94
Ca	100	98	98	98
Zn	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0
Fe	99	0	92	0
Mn	100	100	0	90

Los cambios más importantes se registran a nivel de los iones manganeso y magnesio. En cuanto al primero, éste experimenta un aumento del porcentaje de ion soluble, debido, principalmente, a que el cereal de salvado de trigo posee un gran contenido de hierro. El ion Fe^{3+} captura gran parte del anión fosfato duodenal, inhibiendo la formación del fosfato de manganeso sólido. Para el ion Mg^{2+}, ocurre lo contrario. La fracción de este metal que se encuentra involucrada en la formación de especies sólidas aumenta de forma sustancial. Este fenómeno está dirigido fundamentalmente por el InsP_6, el cual

aumenta su concentración más de 12 veces al pasar de un cereal al otro, precipitando como fitato de magnesio más de la mitad del catión divalente.

4.11. Calidad nutricional de la ingesta: biodisponibilidad de iones esenciales

Dado el pequeño número de sistemas analizados, no es posible establecer conclusiones de carácter general en cuanto a la calidad de la ingesta leche + cereal. No obstante, el conocimiento de la especiación química del sistema permite la evaluación de algunos aspectos interesantes relacionados con la biodisponibilidad de los iones más importantes, y su variación con las características particulares de la dieta y el procesado de los alimentos. Del análisis precedente se deriva que la biodisponibilidad de cada ion depende, en forma compleja, de todos los componentes de los alimentos considerados y sus interacciones a nivel gastrointestinal, de acuerdo con reportes anteriores que enfatizan la dificultad de la realización de predicciones sobre el nivel de metal disponible sólo a través de la composición de fitato de los alimentos[131].

De acuerdo con los datos termodinámicos recabados, la ingesta conjunta de leche y cereal de maíz o salvado no provocaría la precipitación de fases sólidas conteniendo cobre o cinc, por lo que ambos iones presentarían una alta biodisponibilidad. Este resultado está de acuerdo con una gran parte de la evidencia experimental en el tema, permitiendo validar en cierto grado la metodología de análisis propuesta. Existen reportes que afirman que el fitato no afecta la biodisponibilidad del Cu^{2+} en humanos[59]. Asimismo, varios autores relacionan la biodisponibilidad del ion Zn^{2+} con moléculas como cisteína e histidina[132,133] y ácidos orgánicos, como el citrato[134], ligandos que en este capítulo han sido identificados como los agentes solubilizadores más efectivos de este catión.

En cuanto al resto de los iones incluidos en el estudio, un análisis de su biodisponibilidad requiere de la consideración de la extensión de los procesos de precipitación operativos a nivel duodenal. El ion Ca^{2+} se espera en este tipo de sistemas precipitado en gran extensión. Como aspecto general derivado del estudio realizado, el fitato participa en el secuestro del metal al estado sólido, en tanto las restricciones cinéticas que afectan a la formación de la

hidroxiapatita lo permitan. De todas formas, dada su baja concentración, sólo logra retener un porcentaje mínimo del catión total aportado por los alimentos de la ingesta. Esta variación de la biodisponibilidad del calcio mediada por el fitato ha sido reportada en otros sistemas nutricionales[52,53]. Un punto muy interesante que surge entre los resultados de este capítulo es que el ion calcio parece tener un rol importante en la captación del InsP_6 a nivel intestinal. Si el fitato fuera liberado, podría formar compuestos sólidos que afectarían la biodisponibilidad de otros iones, como el cinc, que según se ha visto en esta tesis forma complejos muy insolubles con este ligando. Este fenómeno brinda una posible explicación al hecho, no comprendido cabalmente hasta el momento, de que el ion calcio induce un aumento en la fracción libre de cinc duodenal en algunos tipos de ingesta[40].

En el caso del hierro, su especiación química en el tracto gastrointestinal es claramente diferente según el compartimento considerado. En el estómago, el hierro se encontraría totalmente en solución, estabilizado en el estado de oxidación +2 por varios ligandos, como la treonina y la glucosamina. En el duodeno, por el contrario, las condiciones de pH y potencial redox permiten la estabilización del estado de oxidación +3, a partir de la formación de un fosfato insoluble de fórmula $Fe_4Ca(OH)_8(PO_4)_2(H_2O)_7$. La velocidad con la que este sólido se forma determinará el grado de solubilidad y la biodisponibilidad del hierro a nivel intestinal. Estos resultados son consistentes con algunos datos experimentales, lo que da cuenta de la bondad del modelo termodinámico aplicado. Existen reportes que demuestran una clara disminución del *pool* de hierro disponible al pasar del estómago al duodeno, donde ocurre una oxidación y precipitación parcial de hierro en forma de fosfatos de hierro(III) [135]. Asimismo, dado que la fase que precipita lentamente en el estómago y/o duodeno, $Fe_4Ca(OH)_8(PO_4)_2(H_2O)_7$, incluye tanto hierro como calcio, es factible que especies mixtas de este tipo sean la causa de que el ion Ca^{2+} disminuya marcadamente la absorción del ion hierro en algunos sistemas nutricionales[29].

El ion magnesio es, de todos los cationes considerados, el que ve más afectada su fracción insoluble por el pH y el contenido de fitato, carbonato y fosfato presentes en el duodeno. Su perfil de especies químicas está bastante relacionado con el comportamiento del ion calcio, no sólo porque ambos comparten la fase sólida $CaMg(CO_3)_2$, sino además porque compiten por el

fitato presente. Este último punto es clave, ya que implica que la velocidad de formación de la hidroxiapatita influye de forma no menor en el porcentaje de magnesio total precipitado y en la predominancia relativa de las fases sólidas correspondientes. El fitato parece modular de manera significativa el nivel de metal no biodisponible, en concordancia con observaciones experimentales anteriores[57].

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, los resultados reportados sobre la biodisponibilidad del ion Mn^{2+} son contradictorios[61,62]. Los resultados manejados en este capítulo podrían dar una explicación posible a este fenómeno. Este catión posee una especiación química altamente dependiente de los niveles de hierro, calcio y fosfato presentes en la ingesta. En efecto, cuando las condiciones son tales que se favorecen los procesos de precipitación de los fosfatos de calcio y/o de hierro, la disminución en la concentración del anión PO_4^{3-} provoca un aumento en la fracción soluble del Mn^{2+}, cuya principal fase sólida sería, según lo discutido, el $MnHPO_4$. En este contexto, cualquier variación en el contenido de iones metálicos y/o fosfatos en la porción ingerida, podría desencadenar una serie de procesos que llevarían a un aumento o disminución de la fracción no biodisponible del manganeso en el duodeno.

Para los iones cuya especiación química involucra fases sólidas en alguna de las posibles condiciones que caracterizan el ambiente duodenal (Ca^{2+}, Mg^{2+}, $Fe^{2+/3+}$, Mn^{2+}), una evaluación rigurosa de la biodisponibilidad requiere de la cuantificación de la cantidad de metal soluble en el sistema. La tabla 15.6 muestra la masa de ion metálico soluble en el duodeno para las ingestas evaluadas, a pH = 7,6.

Considerando el rango establecido por ambos modelos, termodinámico y cinético, la cantidad de ion metálico presente en la fase acuosa duodenal no es despreciable, incluso para el ion calcio, cuya especiación calculada indica un nivel de precipitación de casi el 100 % (tabla 15.5 y figura 15.21). Este fenómeno se debe a dos factores. Por una parte, aunque la extensión de los procesos de precipitación son, como ya fue discutido, bastante importantes en la mayoría de los casos, el contenido de ion metálico de las ingestas analizadas es sustancial. Esto conlleva que, aunque existe una disminución sensible en la cantidad de metal no biodisponible (precipitado), una pequeña fracción del

total ingerido resulta soluble, y representa una masa nada despreciable en términos absolutos. En segundo lugar, surgen en este marco los ligandos "solubilizadores", que retienen en cierto grado a los metales en la solución. Moléculas como el citrato, la glucosamina y algunos aminoácidos, secuestran en la fase acuosa a la mayoría de estos iones metálicos, permitiendo su absorción a nivel de la mucosa intestinal. Suponiendo que estos agentes se liberan al medio luego del transporte del catión hacia el interior del organismo, estarán entonces libres para secuestrar aún más ion metálico. La masa total de metal biodisponible será entonces algunas veces mayor que los valores presentados en la tabla 15.6.

Tabla 15.6. Masa, en mg, de ion metálico soluble en el duodeno, a pH = 7,6, para una ingesta tipo de cereal de maíz o salvado junto a 200 g de leche entera. Se muestra, asimismo, la ingesta diaria recomendada de cada metal por la FDA.

Duodeno	Cereal de maíz[a]		Cereal de salvado de trigo[a]		Ingesta diaria recomendada (mg)[104]
pH	7,6		7,6		
Masa de cereal (g)	50	100	50	100	
Ca	0 - 6,6	0 - 6,9	3,8 - 7,2	0 - 12,2	1000
Mg	7,0 - 24,9	9,3 - 20,4	11,4	17,1	400
Fe	0,013 - 1,3	0 - 2,4	0,52 - 6,6	0,66 - 13,1	18
Mn	0	6×10^{-4}	$(6,5 - 65) \times 10^{-4}$	$(10 - 65) \times 10^{-4}$	2

[a] Los valores extremos de los rangos corresponden a las predicciones de ambos modelos, termodinámico y cinético.

Si se comparan los valores de masa soluble de ion metálico en el duodeno con aquellos recomendados para la ingesta diaria de cada catión (tabla 15.6), y se toma en cuenta el aumento del nivel biodisponible de metal por recambio de los ligandos "solubilizadores" a nivel de la mucosa, es posible aventurar que la dupla leche y cereal aporta un contenido de magnesio e hierro solubles que cubre una buena parte de los requerimientos nutricionales diarios. Los iones calcio y manganeso se encontrarían en una situación más desfavorable, y este tipo de alimentos contribuiría con cantidades biodisponibles de ambos cuya fracción respecto de la ingesta recomendada diaria sería menor. Esta

comparación es, de todas formas, sólo aproximada, ya que los valores recomendados para la ingesta diaria engloban al metal absorbido y al excretado.

Para finalizar, es posible establecer algunos lineamientos específicos tendientes a la mejora de la calidad nutricional de esta ingesta. Las diferencias en el nivel biodisponible de ion metálico entre ambos tipos de cereales no es significativo, por lo que no existe evidencia para recomendar la ingesta preferente de alguno de ellos. En todo caso y a diferencia de lo que se podría pensar *a priori*, el cereal de salvado, aunque posee un contenido mucho más alto de Ins*P* que el cereal de maíz, proporcionaría calcio, hierro y manganeso disponibles para su absorción en niveles aún mayores. Esto es debido a que el producto de salvado posee un alto nivel de iones metálicos, siendo usualmente fortificado en algunos nutrientes esenciales. Respecto de la ración de cereal, los valores de la tabla 15.6 muestran que existe una tendencia hacia un leve aumento en la biodisponibilidad con la masa de cereal ingerida. Este punto parece ser crítico para el manganeso en el cereal de maíz, donde un aumento en el contenido nutricional del catión motiva la generación de un pequeño *pool* de metal soluble a nivel duodenal. Dado que los ligandos que disminuyen sensiblemente la biodisponibilidad de los iones metálicos son el fitato, fosfato y carbonato, y que de ellos los dos primeros provienen esencialmente del alimento, todos aquellos métodos de procesamiento que disminuyan el contenido de ambos, sin alterar otras características beneficiosas de la ingesta, serán adecuados para mejorar la calidad nutricional de la dieta. Dado que el InsP_6 posee cuantiosos efectos favorables sobre la salud y que el mismo contribuye en menor proporción a la precipitación de algunos de los iones mayoritarios (Ca^{2+} y Mg^{2+}), es probable que una buena estrategia sea la de disminuir la carga de fosfato inorgánico de la ingesta. Dado que este anión se agrega a los productos lácteos como agente neutralizante, antiaglutinante, emulsionante, colorante, estabilizador y espesante[108], es factible que la búsqueda de alternativas para disminuir su contenido en la leche sea una de las vías posibles hacia la mejora en la biodisponibilidad de elementos esenciales como calcio, magnesio, hierro y manganeso. Otras opciones involucrarían el aumento del contenido de ligandos "solubilizadores" en la dieta, a través, por ejemplo, de la inclusión de alimentos que aporten anión citrato, como jugos de cítricos o similares. Dado que cada alimento posee su matriz, y que la misma es usualmente compleja, no es

sencillo evaluar cómo el acople de un vaso de jugo a la ingesta leche + cereal afectará la biodisponibilidad de los iones metálicos. El estudio de este tipo de variantes constituye parte del trabajo futuro que se pretende realizar en este campo, el que se extiende más allá de los límites de la presente Tesis Doctoral.

5. Conclusiones

Se presentaron en este capítulo los primeros resultados del análisis de la especiación química del sistema leche + cereal en el medio gastrointestinal, y su relación con el nivel de iones metálicos disponibles para su absorción. Se logró con éxito la configuración de una gran base de datos, de fácil acceso y actualización, que contiene información nutricional de los alimentos más comunes y la composición de los fluidos involucrados en el proceso de digestión. Esta base de datos fue compatibilizada con una serie de algoritmos que permitieron, bajo ciertas aproximaciones, el cálculo de la concentración de los componentes de la ingesta a nivel estomacal y duodenal. Con estos valores se logró, mediante el uso de un *software* apropiado, la determinación de todas las posibles interacciones entre los diversos factores nutricionales, el cálculo del grado de avance de los equilibrios correspondientes y la estimación de la predominancia de cada especie en el sistema.

El estudio detallado del perfil de especies para los distintos iones a nivel duodenal indica la existencia de dos tipos de comportamiento químico. El cobre y el cinc poseen una química caracterizada por compuestos solubles, marcando una biodisponibilidad máxima. Por el contrario, el calcio, magnesio, hierro y manganeso presentan además complejos al estado sólido, que limitan el nivel de metal disponible para la absorción. La extensión de estos procesos de precipitación se relaciona de manera compleja con parámetros del medio (pH, potencial redox), así como con la concentración de los diversos iones multivalentes del medio. En términos generales, los ligandos que retienen a los cationes en solución son principalmente el citrato, la glucosamina y algunos aminoácidos, mientras que los agentes que secuestran los mismos mayoritariamente al estado sólido son el fosfato, fitato y carbonato. Según los datos termodinámicos manejados, el sistema leche + cereal podría aportar una buena fracción del hierro y magnesio necesarios diariamente, además de

contribuir, en menor proporción, a los niveles esenciales de manganeso y calcio.

Se discutieron, en base a lo analizado, algunos lineamientos generales tendientes a la mejora de la calidad nutricional de la ingesta, relacionados con el tipo de cereal, el nivel de consumo del mismo, el procesado de la leche y la inclusión de otros alimentos conteniendo ligandos "solubilizadores", pautas que sientan las bases del trabajo planificado a futuro en esta área.

6. Referencias bibliográficas

1. Irvine, R. F.; Schell, M. J. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001,** *2*, 327-338.
2. Shears, S. B. *Cellular Signalling* **2001,** *13*, 151-158.
3. Raboy, V. *Phytochemistry* **2003,** *64*, 1033-1043.
4. Oatway, L.; Vasanthan, T.; Helm, J. H. *Food Reviews International* **2001,** *17*, 419-431.
5. Shears, S. B. *Biochemical Journal* **2004,** *377*, 265-280.
6. Cosgrove, D. J. The P6-myo-inositol content of grains seed and foodstuffs. En *Inositol Phosphates. Their chemistry, biochemistry and physiology*, Cosgrove, D. J., Irving, G. C., Eds.; Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, 1980; pp 166-172.
7. Jiang, L.; Phillips, T. E.; Hamm, C. A.; Drozdowicz, Y. M.; Rea, P. A.; Maeshima, M.; Rogers, S. W.; Rogers, J. C. *Journal of Cell Biology* **2001,** *155*, 991-1002.
8. Otegui, M. S.; Capp, R.; Staehelin, L. A. *Plant Cell* **2002,** *14*, 1311-1327.
9. Ockenden, I.; Dorsch, J. A.; Reid, M. M.; Lin, L.; Grant, L. K.; Raboy, V.; Lott, J. N. A. *Plant Science* **2004,** *167*, 1131-1142.
10. Lin, L.; Ockenden, I.; Lott, J. N. A. *Canadian Journal of Botany* **2005,** *83*, 131-141.
11. Sathe, S. K.; Reddy, N. R. *Food Phytates;* CRC Press: 2002.
12. Bohn, L.; Josefsen, L.; Meyer, A. S.; Rasmussen, S. K. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007,** *55*, 7547-7552.
13. Pratley, C. A.; Stanley, D. W. *Journal of Food Biochemistry* **1982,** *6*, 243-253.
14. Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Pierson, M. D. *Journal of Food Science* **1988,** *53*, 107-110.
15. Lott, J. N. A.; Goodchild, D. J.; Craig, S. *Australian Journal of Plant Physiology* **1984,** *11*, 459-469.
16. World Health Organization *Reducing Risks, Promoting Healthy Life*; Geneva, Switzerland, 02.
17. Lott, J. N. A.; Ockenden, I.; Raboy, V.; Batten, G. D. En *Food Phytates*, Sathe, S. K., Reddy, N. R., Eds.; CRC Press: 2002.
18. Batten, G. D.; Lott, J. N. A. *Cereal Chemistry* **1986,** *63*, 14-18.
19. Johnson, L. F.; Tate, M. E. *Canadian Journal of Chemistry* **1969,** *47*, 73.
20. Loewus, F. A. En *Inositol Metabolism in Plants*, Wiley-Liss: 1990; pp 1-11.
21. Lott, J. N. A.; Greenwood, J. S.; Batten, G. D. En *Seeds Development and Germination*, Kigel, J., Galili, G., Eds.; Marcel Dekker Inc.: 1995; pp 215-235.
22. Weaver, C. M.; Kannan, S. En *Food Phytates*, Sathe, S. K., Reddy, N. R., Eds.; CRC Press: 2002.
23. Harland, B. F. *Nutrition Research Reviews* **1989,** *2*, 133-147.
24. Harland, B. F.; Morris, E. R. *Nutrition Research* **1995,** *15*, 733-754.
25. Zhou, J. R.; Erdman, J. *Critical reviews in food science and nutrition* **1995,** *35*, 495-508.
26. Pallauf, J.; Pietsch, M.; Rimbach, G. *Nutrition Research* **1998,** *18*, 1029-1037.
27. Plaami, S. *LWT - Food Science and Technology* **1997,** *30*, 633-647.
28. Raboy, V. *Plant Science* **2009,** *177*, 281-296.
29. Bohn, L.; Meyer, A. S.; Rasmussen, S. K. *Journal of Zhejiang University: Science B* **2008,** *9*, 165-191.
30. Thompson, L. U. *Food Research International* **1993,** *26*, 131-149.
31. Nwokolo, E. N.; Brag, D. G. *Canadian Journal of Animal Science* **1977,** *57*, 475-477.
32. Zhou, J. R.; Fordyce, E. J.; Raboy, V.; Dickinson, D. B.; Wong, M. S.; Burns, R. A.; Erdman, J. *Journal of Nutrition* **1992,** *122*, 2466-2473.

33. Programa Nacional de Nutrición *Manual para la promoción de prácticas saludables de alimentación en la población uruguaya;* Dirección General de la Salud, Ministerio de Salud Pública: Montevideo, Uruguay, 2005.
34. Turnlund, J. R.; King, J. C.; Keyes, W. R. *American Journal of Clinical Nutrition* **1984,** *40*, 1071-1077.
35. Oberleas, D.; Harland, B. F. *Journal of the American Dietetic Association* **1981,** *79*, 433-436.
36. Mills, C. F. *Annual review of nutrition* **1985,** *5*, 173-193.
37. Sandstrom, B.; Sandberg, A. S. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease* **1992,** *6*, 99-103.
38. Lonnerdal, B.; Sandberg, A. S.; Sandstrom, B.; Kunz, C. *Journal of Nutrition* **1989,** *119*, 211-214.
39. Morris, E. R.; Ellis, R. *Biological Trace Element Research* **1989,** *19*, 107-117.
40. Lonnerdal, B.; Cederblad, A.; Davidsson, L.; Sandstrom, B. *American Journal of Clinical Nutrition* **1984,** *40*, 1064-1070.
41. Lonnerdal, B. *Journal of Nutrition* **2000,** *130*, 1378S-1383S.
42. Mbofung, C.; Atinmo, T.; Omololu, A. *Nutrition Research* **1984,** *4*, 567-576.
43. Gibson, R. S. *American Journal of Clinical Nutrition* **1994,** *59*, 1223S-1232S.
44. Carpenter, C. E.; Mahoney, A. W. *Critical reviews in food science and nutrition* **1992,** *31*, 333-367.
45. Krishnamurthy, P.; Xie, T.; Schuetz, J. D. *Pharmacology and Therapeutics* **2007,** *114*, 345-358.
46. Raffin, S. B.; Woo, C. H.; Roost, K. T.; Price, D. C.; Schmidt, R. *Journal of Clinical Investigation* **1974,** *54*, 1344-1352.
47. Mckie, A. T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G. O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M. A.; Farzaneh, F.; Simpson, R. J. *Science* **2001,** *291*, 1755-1759.
48. Andrews, N. C. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **1999,** *31*, 991-994.
49. Storcksdieck, S.; Bonsmann, G.; Hurrell, R. F. *Journal of Food Science* **2007,** *72*, S019-S029.
50. Hertrampf, E.; Olivares, M. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **2004,** *74*, 435-443.
51. Salovaara, S.; Sandberg, A. S.; Andlid, T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003,** *51*, 7820-7824.
52. Saha, P. R.; Weaver, C. M.; Mason, A. C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994,** *42*, 2531-2535.
53. Sandberg, A. S.; Larsen, T.; Sandstrom, B. *Journal of Nutrition* **1993,** *123*, 559-566.
54. Hallberg, L.; Brune, M.; Erlandsson, M.; Sandberg, A. S.; Rossander-Hulten, L. *American Journal of Clinical Nutrition* **1991,** *53*, 112-119.
55. Champagne, E. T.; Phillippy, B. Q. *Journal of Food Science* **1989,** *54*, 587-592.
56. Fredlund, K.; Isaksson, M.; Rossander-Hulthen, L.; Almgren, A.; Sandberg, A. S. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2006,** *20*, 49-57.
57. Brink, E. J.; Dekker, P. R.; Van Beresteijn, E. C. H.; Beynen, A. C. *Journal of Nutrition* **1991,** *121*, 1374-1381.
58. Lee, D. Y.; Schroeder III, J.; Gordon, D. T. *Journal of Nutrition* **1988,** *118*, 712-717.
59. Turnlund, J. R.; King, J. C.; Gong, B. *American Journal of Clinical Nutrition* **1985,** *42*, 18-23.
60. Davies, N. T.; Nightingale, R. *British Journal of Nutrition* **1975,** *34*, 243-258.
61. Davidsson, L.; Almgren, A.; Juillerat, M. A.; Hurrell, R. F. *American Journal of Clinical Nutrition* **1995,** *62*, 984-987.
62. Davidsson, L.; Cederblad, A.; Lonnerdal, B.; Sandstrom, B. *American Journal of Clinical Nutrition* **1991,** *54*, 1065-1070.
63. Thompson, L. U. Phytic acid: a factor influencing starch digestibility and blood glucose response. En *Phytic Acid. Chemistry and applications*, Graf, E., Ed.; Pilatus Press: Minneapolis, 1986; pp 173-194.
64. Nyman, M. E.; Bjorck, I. M. *Journal of Food Science* **1989,** *54*, 1332-1335.
65. Vucenik, I.; Shamsuddin, A. M. *Nutrition and Cancer* **2006,** *55*, 109-125.
66. Graf, E.; Eaton, J. W. *Free Radical Biology and Medicine* **1990,** *8*, 61-69.
67. Muraoka, S.; Miura, T. *Life Sciences* **2004,** *74*, 1691-1700.
68. Sharma, R. D. Phytate and the epidemiology of heart disease, renal calculi and colon cancer. En *Phytic Acid. Chemistry and applications*, Graf, E., Ed.; Pilatus Press: Minneapolis, 1986; pp 161-172.
69. Jariwalla, R. J.; Sabin, R.; Lawson, S.; Herman, Z. S. *Journal of Applied Nutrition* **1990,** *42*, 18-28.
70. Rao, P. S.; Liu, X. K.; Das, D. K.; Weinstein, G. S.; Tyras, D. H. *Annual thoracic surgery* **1991,** *52*, 908-912.

71. Curhan, G. C.; Willett, W. C.; Knight, E. L.; Stampfer, M. J. *Archives of Internal Medicine* **2004,** *164*, 885-891.
72. Shamsuddin, A. M. *Journal of Nutrition* **1995,** *125*, 725S-732S.
73. Sudheer, K. M.; Sridhar, R. B.; Kiran, B. S.; Bhilegaonkar, P. M.; Shirwaikar, A.; Unnikrishnan, M. K. *Indian Journal of Experimental Biology* **2004,** *42*, 179-185.
74. Xu, Q.; Kanthasamy, G.; Reddy, M. B. *FASEB Journal* **2006,** *J20*, A192.
75. Henneman, P.; Benedict, P. H.; Forbes, A. P.; Dudley, H. R. *New England Journal of Medicine* **1958,** *17*, 802-807.
76. Grases, F.; Garcia-Gonzalez, R.; Torres, J. J.; Llobera, A. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* **1988,** *32*, 261-265.
77. Walker, A. R.; Fox, F. W.; Irving, J. T. *Biochemical Journal* **1948,** *42*, 452-462.
78. Cullumbine, H.; Basnayake, V.; Lemottee, J. *British Journal of Nutrition* **1950,** *4*, 101-111.
79. Kelsay, J. L. *American Journal of Gastroenterology* **1987,** *82*, 983-986.
80. Sandstrom, B.; Bugel, S.; McGraw, B. A.; Price, J.; Reid, M. D. *Journal of Nutrition* **2000,** *130*, 594-599.
81. Manary, M. J.; Hotz, C.; Krebs, N. F.; Gibson, R. S.; Westcott, J. E.; Arnold, T.; Broadhead, R. L.; Hambidge, K. M. *Journal of Nutrition* **2000,** *130*, 2959-2964.
82. Siqueira, E. M. A.; Arruda, S. F.; De Sousa, L. M.; De Souza, E. M. T. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* **2001,** *51*, 250-257.
83. Grases, F.; Simonet, B. M.; Perello, J.; Costa-Bauza, A.; Prieto, R. M. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2004,** *17*, 229-234.
84. Ma, G.; Jin, Y.; Piao, J.; Kok, F.; Guusje, B.; Jacobsen, E. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005,** *53*, 10285-10290.
85. Skudelski, T. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **2005,** *89*, 397-402.
86. Yuangklang, C.; Wensing, T.; Lemmens, A. G.; Jittakhot, S.; Beynen, A. C. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **2005,** *89*, 373-378.
87. Kristensen, M. B.; Hels, O.; Morberg, C. M.; Marving, J.; Bugel, S.; Tetens, I. *British Journal of Nutrition* **2006,** *95*, 963-967.
88. Raboy, V. *Trends in Plant Science* **2001,** *6*, 458-462.
89. Cho, J.; Choi, K.; Darden, T.; Reynolds, P. R.; Petitte, J. N.; Shears, S. B. *Journal of Biotechnology* **2006,** *126*, 248-259.
90. Hurrell, R. F. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **2004,** *74*, 445-452.
91. Hanakahi, L. A.; West, S. C. *EMBO Journal* **2002,** *21*, 2038-2044.
92. Morris, E. R.; Ellis, R. *Journal of Nutrition* **1980,** *110*, 2000-2010.
93. Dean, J. R.; Ma, R. *Chemosphere* **2007,** *68*, 1399-1407.
94. May, P. M.; Murray, K. *Talanta* **1991,** *38*, 1409-1417.
95. May, P. M.; Murray, K. *Talanta* **1991,** *38*, 1419-1426.
96. May, P. M.; Murray, K. *Talanta* **1993,** *40*, 819-825.
97. *Tablas de composición de alimentos. El pequeño "Souci-Fachmann-Kraut";* segunda ed.; Acribia S.A.: Zaragoza, España, 1999.
98. Holland, B.; Unwin, I. D.; Buss, D. H. *Cereals and Cereal Products. Third Supplement to McCance and Widdowson's "The Composition of Foods";* 4th ed.; The Royal Society of Chemistry: Nottingham, UK, 1988.
99. Página web de Kellogg's. *http://www2.kelloggs.com/* **2010**.
100. Página web de Quaker. *http://www.quakeroats.com/home.aspx* **2010**.
101. Página web de General Mills. *http://www.generalmills.com/* **2010**.
102. Página web de Health Valley. *http://www.healthvalley.com/* **2010**.
103. Página web de Post Cereals. *http://www.postcereals.com/* **2010**.
104. Percent Daily Values. *U. S. Food and Drug Administration* **2010**.
105. Harland, B. F.; Smikle-Williams, S.; Oberleas, D. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004,** *17*, 227-233.
106. Harland, B. F.; Narula, G. *Nutrition Research* **1999,** *19*, 947-961.
107. Lookhart, G. L. Cereal Proteins: composition of their major fractions and methods for identification. En *Handbook of Cereal Science and Technology*, Lorenz, K. J., Kulp, K., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, 1991; pp 441-468.
108. Ramírez, J. S. *Tecnología Láctea Latinoamericana* **2009,** *57*, 47-53.
109. Diem, K.; Lentner, C. *Tablas Científicas Documenta Geigy;* séptima ed.; Ciba-Geigy: Barcelona, España, 1975.

110. Jones, P. W.; Taylor, D. M.; Webb, L. M.; Williams, D. R. *Applied Radiation and Isotopes* **2002,** *57*, 159-165.
111. Webb, L. M.; Taylor, D. M.; Williams, D. R. *Radiation Protection Dosimetry* **1998,** *79*, 219-222.
112. Jones, P. W.; Taylor, D. M.; Williams, D. R. *Chemical Speciation and Bioavailability* **2005,** *17*, 49-53.
113. Despopoulos, A.; Silbernagl, S. *Color Atlas of Physiology;* quinta edición ed.; Thieme: New York, USA, 2003.
114. Geall, M. G.; Summerskill, W. H. *Gut* **1969,** *10*, 418-421.
115. Steele, R. J. C.; Ledingham, S.; Iftikhar, S. Y.; Hardcastle, J. D. *Gut* **1991,** *32*, A585.
116. Stirrup, V.; Ledingham, S. J.; Thomas, M.; Pye, G.; Evans, D. F. *Gut* **1990,** *31*, A1171.
117. *The IUPAC Stability Constants Database, SC-Database,* version 5.83; Academic Software: Sourby Old Farm, Timble, Otley, Yorks, LS21 2PW, UK, 2005
118. Barat, R.; Montoya, T.; Borrás, L.; Ferrer, J.; Seco, A. *Water Research* **2008,** *42*, 3415-3424.
119. Boskey, A. L.; Posner, A. S. *Journal of Physical Chemistry* **1973,** *77*, 2313-2317.
120. Baronne, J. P.; Nancollas, G. H. *Journal of Colloid and Interface Science* **1977,** *62*, 421-431.
121. Van Kemenade, M. J. J. M.; de Bruyn, P. L. *Journal of Colloid and Interface Science* **1987,** *118*, 564-585.
122. Ostwald, W. Z. *Phys. Chem. , Stoechiom. Verwandtschaftsl* **1900,** *34*, 495.
123. Montastruc, L.; Azzaro-Pantel, C.; Biscans, B.; Cabassud, M.; Domenech, S. *Chemical Engineering Journal* **2003,** *94*, 41-50.
124. Stumm, W.; Morgan, J. J. *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters;* John Wiley and Sons: New York, 1981.
125. Lindsay, W. L. *Chemical equilibria in soils;* John Wiley and Sons: New York, 1979.
126. Lindsay, W. L.; Moreno, E. C. *Soil Science Society of America Proceedings* **1960,** *24*, 177.
127. Moore, P. A. Jr.; Reddy, K.; Graetz, D. A. *Jounal of Environmental Quality* **1991,** *20*, 869.
128. Roncal-Herrero, T.; Rodríguez-Blanco, J. D.; Benning, L. G.; Oelkers, E. H. *Crystal Growth and Design* **2009,** *9*, 5197-5205.
129. Masquelier, C.; Reale, P.; Wurm, C.; Morcrette, M.; Dupont, L.; Larcher, D. *Journal of the Electrochemical Society* **2002,** *149*, A1037-A1044.
130. Bhatia, S. C.; Ravi, N. *Biomacromolecules* **2003,** *4*, 723-727.
131. Lopez, H. W.; Leenhardt, F.; Coudray, C.; Remesy, C. *International Journal of Food Science and Technology* **2002,** *37*, 727-739.
132. Hortin, A. E.; Bechtel, P. J.; Baker, D. H. *Journal of Food Science* **1991,** *56*, 1505-1507.
133. Nielsen, F. H.; Sunde, M. L.; Hoekstra, W. G. *Journal of Nutrition* **1966,** *89*, 35-42.
134. Lonnerdal, B.; Stanislowski, A. G.; Hurley, L. S. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1980,** *12*, 71-78.
135. Peters, T. J.; Raja, K. B.; Simpson, R. J. *Food Chemistry* **1992,** *43*, 315-320.

Sección V

Conclusiones y perspectivas

Capítulo 16

Conclusiones finales y trabajo a futuro

Este trabajo de tesis ha sido motivado por la necesidad de disponer de datos fisicoquímicos y estructurales característicos de la interacción de los inositol fosfatos con iones relevantes en sistemas biológicos. La carencia o escasez de este tipo de información ha retrasado, sino impedido, la adecuada realización e interpretación de una gran parte de los experimentos *in vitro* en los que se han basado las investigaciones en este campo. En la concreción de este objetivo, además de aportar resultados en el ámbito estrictamente académico, este trabajo ha sido diseñado y presentado para generar nuevas herramientas que apoyen a los estudios que las áreas aplicadas dentro de la biología, bioquímica, biotecnología y nutrición están hoy en día llevando a cabo.

Los miembros de la familia de los Ins*P* estudiados, InsP_6, Ins(1,3,4,5,6)P_5 e Ins(1,2,3)P_3, dada la alta carga de sus especies en solución, resultaron interaccionar significativamente con los iones mono y multivalentes analizados. La intensidad de dicha interacción está modulada esencialmente por la carga del catión y de las especies del ligando, de acuerdo con un modelo de enlace esencialmente electrostático, mientras que las características electrónicas del metal juegan un papel secundario. De esta manera, para un ion dado, en términos generales la interacción se hace más fuerte en el orden Ins(1,2,3)P_3 < Ins(1,3,4,5,6)P_5 < InsP_6, mientras que para cada ligando lo hace según M^+ < M^{2+} < M^{3+}. Algunas excepciones a estas tendencias han resultado muy interesantes en la evaluación de otros factores que influyen en la interacción ligando-metal. El Ins(1,2,3)P_3 resultó interaccionar más fuertemente con los iones alcalinos que el fitato, debido a que el primero posee su carga negativa localizada hacia un lado de la molécula. La distribución del potencial electrostático molecular influye, por tanto, en las características del enlace Ins*P*-M^+. Como consecuencia, los tres miembros resultaron muy buenos agentes secuestrantes de iones di y trivalentes, incluso comparados con el EDTA, formando complejos estables mono y/o polinucleares. Este comportamiento químico se repitió en

todos los sistemas estudiados y la tendencia general indica que un aumento del pH y/o de la relación metal:ligando favorece a los complejos polinucleares, mientras que lo contrario induce la predominancia de complejos del tipo 1:1 M^{n+}:Ins*P*.

La química que presenta este tipo de moléculas incluye, además, procesos de precipitación que operan a altas relaciones metal:ligando. El presente trabajo abordó este tipo de equilibrios para algunos sistemas conteniendo InsP_6 e Ins(1,3,4,5,6)P_5, a través de la caracterización química y determinación de la solubilidad de las fases sólidas respectivas. La inclusión de estos complejos sólidos en el modelo de especies químicas general, permitió una descripción completa del comportamiento de ambos Ins*P* en presencia de algunos de los iones multivalentes biológicamente más relevantes. Adicionalmente, se consiguió con éxito la caracterización de sólidos mixtos, similares a las fitinas de origen vegetal, conteniendo potasio y magnesio, calcio o cinc.

Se presentó, asimismo, el estudio estructural de algunas de las especies en solución y al estado sólido. Se discutieron en detalle los factores que influyen en la secuencia de protonación de los ligandos. Estos factores, como el grado de protonación, la distribución de los protones sobre los grupos ionizables, los enlaces de hidrógeno, la hidratación de las especies, la distancia fosfato-fosfato, entre otros, modulan la estabilidad conformacional de cada forma protonada. De la misma manera, se expandió el análisis de algunas de las especies complejas, incluyendo en la evaluación factores relacionados con el esquema de protonación y la neutralización de la carga negativa por la unión del catión. Mientras que en solución se detecta en la mayoría de los casos un cambio conformacional dependiente del pH y de la presencia de iones metálicos, al estado sólido el panorama resultó diferente. En fase sólida, el fitato se encuentra en una conformación intermedia entre 1a5e y 5a1e, o en una mezcla de ellas. Al margen de toda esta evidencia, tanto a nivel de las especies solubles como en los complejos sólidos, los resultados teóricos y experimentales indican un esquema de coordinación en donde varios fosfatos cooperan, de forma bidentada, en la unión de el o los cationes a través de los átomos de oxígeno.

En la búsqueda de conclusiones de valor práctico, se presentó la aplicación de la información termodinámica recabada a la racionalización del

comportamiento químico de sistemas de relevancia biológica o nutricional. Los datos indicaron que el fitato interacciona principalmente con el magnesio a nivel intracelular, no detectándose asociación alguna con iones monovalentes. Por su parte, el Ins(1,3,4,5,6)P_5 se espera que se encuentre libre o unido parcialmente al magnesio en condiciones del interior de la célula. Dada su menor afinidad por el ion Mg^{2+}, este ligando es capaz de unirse cuantitativamente al ion Fe^{3+} para niveles equimolares de Ins*P* y metal, independizando dos conceptos fuertemente interrelacionados en la literatura: la alta afinidad por el ion hierro(III) y el arreglo "123" de los grupos ionizables. Este ion trivalente influye significativamente, asimismo, en el perfil de especies químicas que el Ins(1,2,3)P_3 exhibe en medios biológicos: en condiciones intracelulares, en ausencia de hierro el ligando se predice libre o asociado a K^+ y Mg^{2+}, mientras que en presencia de cantidades equimolares de hierro, este InsP_3 se encuentra 100 % en forma de complejos de Fe(III). De hecho, este miembro es capaz de, según los resultados del análisis voltamperométrico realizado, estabilizar el estado de oxidación +3 del hierro, inhibiendo la generación de radicales libres citotóxicos catalizada por este metal. Estos resultados han aportado evidencia concreta a un tema bastante discutido a nivel de algunos expertos en el tema, posicionando al Ins(1,2,3)P_3 como potencial sideróforo "seguro" del *pool* de hierro lábil intracelular. El estudio estructural al que se hizo referencia más arriba permitió caracterizar los parámetros conformacionales, geométricos y de distribución de carga de las especies biológicamente relevantes de alguno de estos Ins*P*. Más aún, a partir de estas especies fue posible el estudio de las interacciones de alguno de estos miembros y sus formas complejas con proteínas de interés, como la siderocalina y la fitasa del *Aspergillus niger*. Los resultados permitieron evaluar los diversos factores que influyen en la interacción sustrato-proteína, y cómo éstos se relacionan con las diversas características estructurales de los ligandos, sus complejos y la arquitectura y distribución de carga del sitio activo. En este sentido, este trabajo pretende contribuir con herramientas específicas al planteo de estrategias racionales de síntesis de agonistas y antagonistas con valor terapéutico.

En cuanto a la aplicación de los datos termodinámicos de este trabajo a la especiación química en medio gastrointestinal, se centró la discusión en el sistema leche + cereal, por ser una ingesta con gran contenido en iones

minerales e inositol fosfatos. De todos los Ins*P* considerados, el fitato fue el único que resultó asociado a la baja en la bioaccesibilidad mineral por formación de sólidos poco solubles de calcio y magnesio. Sin embargo, esta biomolécula no es la única que contribuye a la precipitación de los iones metálicos. Existen otros ligandos como el fosfato (en gran concentración en la leche) y el carbonato (componente principal del fluido duodenal), cuyo campo de acción como agentes precipitantes abarca, además de los cationes mencionados, iones como Fe^{3+} y Mn^{2+}. Surge como transcendente en este contexto la presencia de ligandos "solubilizadores" como el citrato, glucosamina y aminoácidos, como histidina y cisteína, los que aumentan la biodisponibilidad de cationes como Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} y Mn^{2+}. Se plantearon entonces, en base a los resultados obtenidos, estrategias tendientes a la mejora en la calidad nutricional de la ingesta considerada, relacionadas con el tipo y nivel de cereal ingerido, el procesamiento de la leche y la posible inclusión de alimentos ricos en ligandos "solubilizadores".

Este estudio permitió consolidar la experiencia en el abordaje teórico-experimental de sistemas complejos Ins*P*-M^{n+}, en variados medios biológicos y nutricionales. Se pretende a futuro, en esta misma línea temática, continuar con los estudios fisicoquímicos y estructurales de sistemas conteniendo fitato y algunos iones metálicos o cationes complejos, como poliaminas de origen natural. De la misma forma, resulta interesante expandir este mismo tipo de análisis a otros *myo*-inositol fosfatos, e incluso a otros estereoisómeros del inositol también relevantes en sistemas biológicos, como las formas -*neo* y D-*chiro*. Ampliando aún más el campo de estudio, un área bastante fértil de trabajo se encuentra en la determinación de la especiación química de otros derivados del inositol en presencia de iones mono y multivalentes, para los cuales no se conocen datos sobre su conducta de protonación y complejación. En particular, la importancia biológica de los pirofosfatos de inositol como agentes fosforilantes de proteínas crece día a día, lo que los convierte en un blanco de estudio muy promisorio. Por último, se pretende continuar con los estudios de la aplicación de la especiación química de los Ins*P* a la gestión nutricional de dietas de base vegetal. En un futuro se espera aportar a la racionalización de las bases químicas de aquellos factores que pueden aumentar la calidad nutricional de las dietas conteniendo "alimentos verdes".

Anexos

Anexo A

Aplicación del Método de Expansión de Clúster

Tomando como punto de partida los espectros de RMN de ^{31}P adquiridos a 37 ˚C y 0,15 M en NMe_4Cl y utilizando el "Método de expansión de clúster" recientemente publicado [1] se resuelven, de forma aproximada, los diversos equilibrios de microprotonación así como los parámetros termodinámicos que describen al sistema.

1. Método de expansión de clúster

El estado de protonación de una molécula poliprótica está caracterizado por el número total de protones unidos **n** (n = 0,…, N, donde N es el número total de sitios ionizables). Existen entonces N+1 macroestados posibles. Esta descripción macroscópica no discrimina entre los estados de protonación de los sitios ionizables individuales. Estos microestados son descritos en este marco introduciendo una variable $\boldsymbol{s_i}$ que puede tomar sólo dos valores para cada sitio $\boldsymbol{i}$ (i = 1,2,…,N), de forma que vale 0 si el sitio está deprotonado y 1 si está protonado. Los estados de protonación de todos los sitios ionizables en la molécula se nombran como microestados y se denotan de la siguiente manera $\mathbf{\{s_1,s_2,…,s_N\}}$, abreviado como $\{\boldsymbol{s_i}\}$. Hay en total 2^N microestados diferentes.

Para cada microestado, se puede asignar una energía libre de formación $\boldsymbol{F}(\{\boldsymbol{s_i}\})$, la cual es definida con respecto al macroestado totalmente deprotonado y por unidad de actividad de protón. Dado este valor, se puede evaluar la probabilidad del microestado en cuestión:

$$P(\{s_i\}) = \frac{{a_H}^n \, e^{\frac{-F(\{s_i\})}{RT}}}{\sum_{\{s_i\}} {a_H}^n \, e^{\frac{-F(\{s_i\})}{RT}}} \qquad (1)$$

donde $\boldsymbol{P}(\{\boldsymbol{s_i}\})$ es la probabilidad del microestado $\boldsymbol{s_i}$, $\boldsymbol{a_H}$ es la actividad del protón, y $\boldsymbol{n}$ es el número de protones unidos en cada caso:

$$n = \sum_{i=1}^{N} s_i \qquad (2)$$

La única restricción impuesta por el método hasta el momento es que cada sitio ionizable puede unir solo un protón. Se puede simplificar sustancialmente el tratamiento matemático subsiguiente si se expande la energía libre $\boldsymbol{F}(\{\boldsymbol{s_i}\})$ en una serie dependiente de las variables de estado discretas $\boldsymbol{s_i}$:

$$\frac{F(\{s_i\})}{(ln10)RT} = -\sum_i p\widehat{K}_i\, s_i + \frac{1}{2!}\sum_{i,j} \epsilon_{i,j}\, s_i s_j + \frac{1}{3!}\sum_{i,j,k} \lambda_{i,j,k}\, s_i s_j s_k + \cdots \qquad (3)$$

donde $\boldsymbol{p\widehat{K}_i}$ es el logaritmo negativo de la constante de deprotonación del sitio $\boldsymbol{i}$ cuando los demás sitios están deprotonados y los términos $\boldsymbol{\epsilon_{i,j}}$ y $\boldsymbol{\lambda_{i,j,k}}$ son parámetros de interacción dobles y triples respectivamente. La suma (3) se realiza sobre diferentes grupos o "clusters" de sitios. Esta expansión puede mejorarse de forma sistemática por la adición de términos de mayor orden. Sin embargo, los parámetros más importantes son los $\boldsymbol{p\widehat{K}_i}$ y los $\boldsymbol{\epsilon_{i,j}}$. Se fija $\boldsymbol{\epsilon_{i,i}} = 0$.

El desplazamiento químico de un núcleo se origina por el apantallamiento del campo magnético exterior por parte de la densidad electrónica que lo rodea. La protonación de un grupo adyacente cambia esta densidad electrónica y lleva a una modificación en el corrimiento químico. A modo de ejemplo, la protonación de un grupo fosfato causa un decrecimiento del corrimiento químico del núcleo ^{31}P entre 5 y 1 ppm [2]. En este trabajo se considerarán espectros de RMN que fueron adquiridos durante un tiempo ampliamente mayor que el correspondiente a la relajación del núcleo T_1. En estas condiciones, el desplazamiento químico observado de un núcleo $\boldsymbol{l}$ en una molécula poliprótica responde linealmente a la protonación de los sitios vecinos y se puede representar de la siguiente manera:

$$\delta_l = \delta_l{}^{(0)} + \sum_{m=1}^{N} \Delta_{lm}\theta_m \qquad (4)$$

donde $\boldsymbol{\delta_l}^{(0)}$ es el corrimiento químico del núcleo $\boldsymbol{l}$ cuando todos los grupos están deprotonados (línea de base), $\Delta_{\boldsymbol{lm}}$ es el cambio en el corrimiento químico del sitio $\boldsymbol{l}$ cuando el sitio $\boldsymbol{m}$ cambia su estado de deprotonado a protonado y $\boldsymbol{\theta_m}$ es el grado promedio de protonación para el sitio $\boldsymbol{m}$. $\boldsymbol{\theta_m}$ puede ser evaluada a partir del la suma de las probabilidades de los microestados que contienen el sitio $\boldsymbol{m}$ protonado:

$$\theta_m = \sum_{\{s_i\}} s_m \, P(\{s_i\}) \qquad (5)$$

Para el ajuste numérico de estos sistemas es preciso establecer la siguiente relación:

$$P(\{s_i\}) = \pi_n(\{s_i\}) \, P_n(a_H) \qquad (6)$$

donde $\boldsymbol{P_n(a_H)}$ es la probabilidad dependiente del pH del macroestado $\boldsymbol{n}$ y $\boldsymbol{\pi_n(\{s_i\})}$ es la fracción del macroestado $\boldsymbol{n}$ correspondiente al microestado $\{\boldsymbol{s_i}\}$, la cual es independiente del pH. La probabilidad del macroestado en cuestión viene dada por:

$$P_n(a_H) = \frac{[H_n L]}{\sum_{n=0}^{N} [H_n L]} = \frac{\beta_n {a_H}^n}{\sum_{n=0}^{N} \beta_n {a_H}^n} \qquad (7)$$

donde se introduce $\boldsymbol{\beta_n}$, la constante global de protonación para el macroestado $\boldsymbol{n}$:

$$\beta_n = \sum_{\{s_i\}} e^{\frac{-F(\{s_i\})}{RT}} \delta_{n,\sum_j s_j} \qquad (8)$$

Entonces, haciendo uso de las ecuaciones (5) y (6) se puede expresar $\boldsymbol{\theta_m}$ como:

$$\theta_m = \sum_{n=0}^{N} \left[\left(\sum_{\{s_i\}} s_m \, \pi_n(\{s_i\}) \delta_{n,\sum_j s_j} \right) P_n(a_H) \right] \qquad (9)$$

Finalmente, combinando las ecuaciones (4) y (9):

$$\delta_l = \delta_l{}^{(0)} + \sum_{n=1}^{N}\left[\sum_{m=1}^{N}\Delta_{lm}\left(\sum_{\{s_i\}} s_m\,\pi_n(\{s_i\})\delta_{n,\sum_j s_j}\right)\right]\frac{\beta_n {a_H}^n}{\sum_{n=0}^{N}\beta_n {a_H}^n} \qquad (10)$$

Las curvas de titulación espectroscópicas se pueden ajustar a este modelo, obteniendo los diversos parámetros que describen la respuesta de cada sitio $\boldsymbol{l}$ en el RMN: $\Delta_{\boldsymbol{lm}}$ y $\boldsymbol{\delta_l}^{(\mathbf{0})}$. Si se ajustan además los valores de $\boldsymbol{\pi_n}(\{\boldsymbol{s_i}\})$ para cada microestado, entonces es posible, utilizando los valores de $\boldsymbol{\beta_n}$ conocidos y las ecuaciones (1), (3), (6) y (7), determinar los parámetros que especifican el equilibrio de microespecies: $\boldsymbol{p\widehat{K}_i}$ y $\boldsymbol{\epsilon_{i,j}}$. Dados estos valores, todas las constantes de microdeprotonación pueden ser calculadas de la siguiente manera:

$$p\widehat{K}_{i\{s_i\}} = p\widehat{K}_i - \sum_j \epsilon_{ij}s_j - \frac{1}{2}\sum_{j.k}\lambda_{ijk}s_j s_k - \cdots \qquad (11)$$

donde $\boldsymbol{p\widehat{K}_{i\{s_i\}}}$ corresponde al logaritmo negativo de la constante de microdeprotonación del sitio $\boldsymbol{i}$, cuando los demás sitios no cambian su estado de protonación.

La mayor ventaja de esta aproximación al problema es que se usan parámetros cruzados para la interacción de los diversos sitios, lo cual mejora el ajuste a los datos experimentales. Además, pueden imponerse fácilmente al modelo matemático restricciones estructurales y de simetría molecular, simplificando en gran medida el ajuste de los datos experimentales.

2. Aplicación del método al sistema Ins(1,2,3)P_3-H^+

Dado que el Ins(1,2,3)P_3 posee tres sitios ionizables, los macroestados y microestados a considerar son los que se muestran en la tabla A1. Asimismo, dado que los fosfatos 1 y 3 son equivalentes, en la tercera y quinta columnas se exponen las restricciones al modelo por simetría. Finalmente, se agregan en la cuarta columna las restricciones debidas al hecho de que la suma de los $\boldsymbol{\pi_n}(\{\boldsymbol{s_i}\})$ para todos los microestados de un macroestado es 1.

Tabla A1. Macro y microestados del sistema InsP_3-H^+. Se muestran además las restricciones al modelo teórico.

Macroestados	Microestados	Restricciones sobre $\boldsymbol{\pi_n(\{s_i\})}$	Restricciones adicionales	Restricciones sobre Δ_{lm}
n = 0	{0,0,0}	---	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,0\}) = 1}$	$\Delta_{12}= \Delta_{32}$ $\Delta_{21}= \Delta_{23}$ $\Delta_{13}= \Delta_{31}$ $\Delta_{11}= \Delta_{33}$
n = 1	{1,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0\}) = \pi(\{0,0,1\})}$	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,0\}) = 1 - 2\pi(\{1,0,0\})}$	
	{0,1,0}			
	{0,0,1}			
n = 2	{1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,0\}) = \pi(\{0,1,1\})}$	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1\}) = 1 - 2\pi(\{1,1,0\})}$	
	{1,0,1}			
	{0,1,1}			
n = 3	{1,1,1}	---	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1\}) = 1}$	

Haciendo uso de estas consideraciones el modelo a ajustar para cada fosfato será:

$$\delta_1 = \delta_1{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}}\right)\{[(\Delta_{11}+\Delta_{13})\pi(\{1,0,0\}) + \Delta_{12}(1-2\pi(\{1,0,0\}))](\beta_1 10^{-pH}) + [(\Delta_{11}+\Delta_{13})(1-\pi(\{1,1,0\})) + \Delta_{12}\,2\pi(\{1,1,0\})](\beta_2 10^{-2pH}) + [\Delta_{11}+\Delta_{12}+\Delta_{13}](\beta_3 10^{-3pH})\}$$

$$\delta_2 = \delta_2{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}}\right)\{[2\Delta_{21}\pi(\{1,0,0\}) + \Delta_{22}(1-2\pi(\{1,0,0\}))](\beta_1 10^{-pH}) + [2\Delta_{21}(1-\pi(\{1,1,0\})) + \Delta_{22}\,2\pi(\{1,1,0\})](\beta_2 10^{-2pH}) + [2\Delta_{21}+\Delta_{22}](\beta_3 10^{-3pH})\}$$

Para facilitar el ajuste, se renombran los términos de la sumatoria según:

$$\delta_1 = \delta_1{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}}\right)\{A(\beta_1 10^{-pH}) + B(\beta_2 10^{-2pH}) + C(\beta_3 10^{-3pH})\}$$

$$\delta_2 = \delta_2{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}}\right)\{D(\beta_1 10^{-pH}) + E(\beta_2 10^{-2pH}) + F(\beta_3 10^{-3pH})\}$$

Se realiza una regresión no lineal de ambos sistemas por separado con el programa Mathematica 5.0[3], utilizando como datos experimentales los desplazamientos químicos de ambas señales en los espectros de RMN ^{31}P (por encima de pH 3,7, para considerar sólo las especies H_3L^{3-}, H_2L^{4-}, HL^{5-} y L^{6-}). Se utilizan además los valores de $\boldsymbol{\beta_n}$ ajustados previamente a partir de los mismos datos espectroscópicos. Los resultados dan un único mínimo en ambos casos y se resumen en la tabla A2.

Tabla A2. Ajuste de los parámetros que describen el desplazamiento químico de cada fósforo del InsP_3 en función del pH (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Núcleo	Parámetro	Valor ajustado	σ_{ajuste}
P1/3	$\boldsymbol{\delta_1{}^{(0)}}$	8,45(2)	0,039
	$\boldsymbol{A}$	-1,68(4)	
	$\boldsymbol{B}$	-4,60(3)	
	$\boldsymbol{C}$	-5,31(3)	
P2	$\boldsymbol{\delta_2{}^{(0)}}$	5,86(3)	0,062
	$\boldsymbol{D}$	-2,00(6)	
	$\boldsymbol{E}$	-1,69(4)	
	$\boldsymbol{F}$	-3,08(5)	

El ajuste de las curvas es satisfactorio, como se aprecia en la figura A1. A partir de estos resultados el problema se reduce a encontrar una solución aproximada al siguiente sistema de ecuaciones:

$$A = (\Delta_{11}+\Delta_{13})\pi(\{1,0,0\}) + \Delta_{12}\big(1-2\pi(\{1,0,0\})\big)$$
$$B = (\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(1-\pi(\{1,1,0\})\big) + \Delta_{12}\,2\pi(\{1,1,0\})$$
$$C = \Delta_{11}+\Delta_{12}+\Delta_{13}$$
$$D = 2\Delta_{21}\pi(\{1,0,0\}) + \Delta_{22}\big(1-2\pi(\{1,0,0\})\big)$$
$$E = 2\Delta_{21}\big(1-\pi(\{1,1,0\})\big) + \Delta_{22}\,2\pi(\{1,1,0\})$$
$$F = 2\Delta_{21}+\Delta_{22}$$

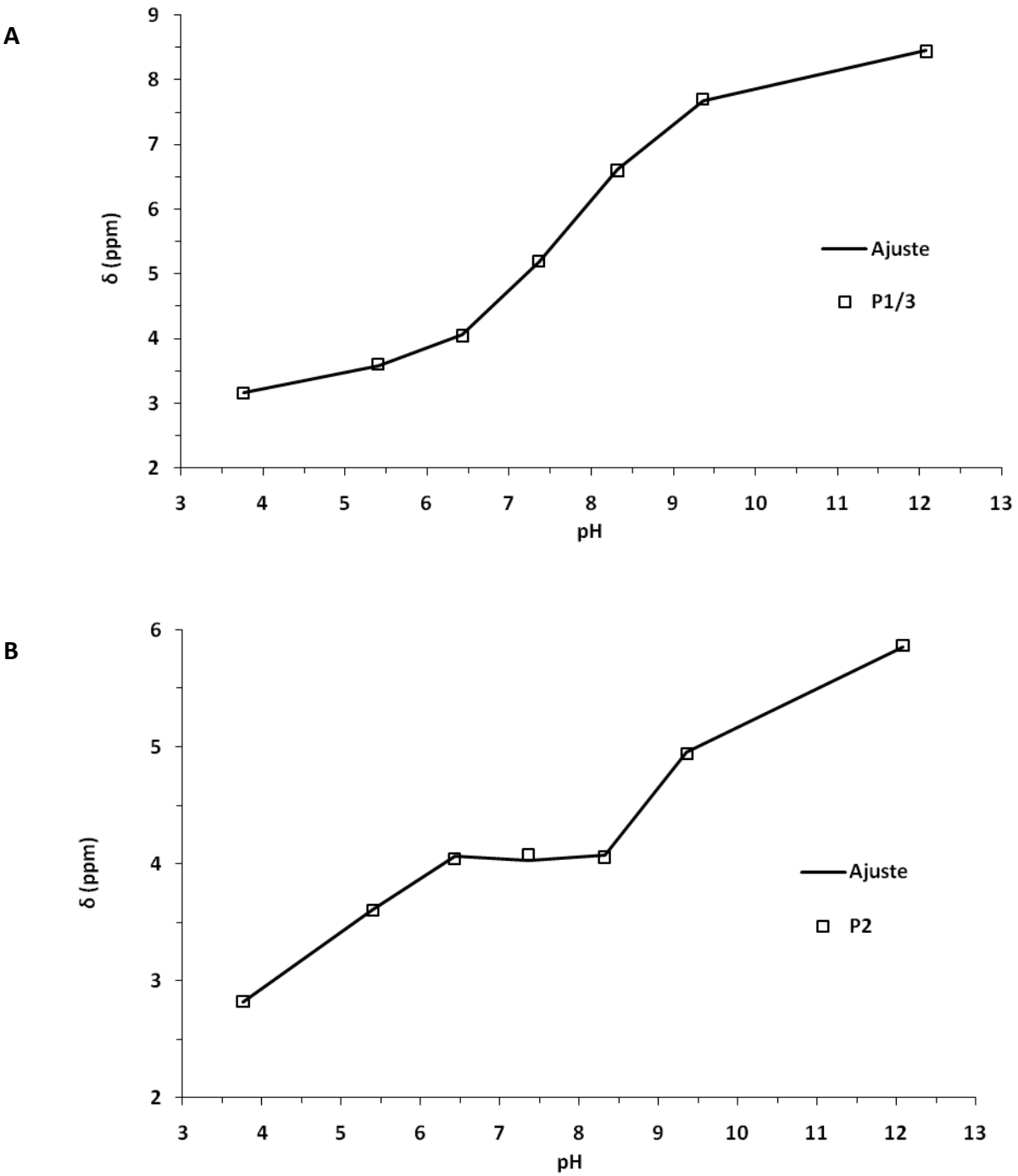


Figura A1. Ajuste del modelo a los datos experimentales de desplazamiento químico del InsP_3 en función del pH (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Grupo fosfato en C1/3 (A) y en C2 (B).

Utilizando la función "SOLVER" del programa Excel [4], se parte de los valores $\Delta_{11}= \Delta_{22}= -\mathbf{4}$, $\Delta_{12}= \Delta_{21}= \mathbf{0,4}$ y $\Delta_{13}= \mathbf{0,}$ reportados para el Ins(1,2,6)P_3 [1], y se ajusta el sistema con la restricción de que las probabilidades se encuentren entre 0 y 1. Se obtienen los resultados detallados en la tabla A3.

Tabla A3. Resultados del ajuste de los parámetros que describen la respuesta de cada fosfato del InsP_3 en los espectros de RMN de ^{31}P a medida que se protona el ligando (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Parámetros		σ_{ajuste}
Δ_{11}	-5,68	0,66
Δ_{12}	0,078	
Δ_{13}	0,0019	
Δ_{22}	-3,54	
Δ_{21}	0,112	
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0}\})$	0,246	
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,232	
Δ_{23}	0,112	
Δ_{31}	0,0019	
Δ_{32}	0,078	
Δ_{33}	-5,68	
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,246	
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,508	
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,232	
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,536	

En primer lugar, los valores de Δ_{12} y Δ_{21} son similares entre sí, estando cerca del valor reportado para el Ins(1,2,6)P_3 [1]. Asimismo, el valor de Δ_{13} es menor aún, y bastante pequeño como era de esperar de acuerdo a la distancia relativa de los grupos ionizables. Los valores de Δ_{11} y Δ_{22} están en el entorno de lo esperado para un inositol trisfosfato [1]. No obstante, a diferencia de lo planteado para el Ins(1,2,6)P_3 [1], los mismos no son iguales. En efecto, la densidad electrónica y por tanto el desplazamiento químico de fosfatos no equivalentes puede cambiar de manera diferente al protonarse el propio grupo. Si se intenta ajustar el sistema con la restricción $\Delta_{11} = \Delta_{22}$, resulta un valor exagerado de Δ_{13}, mayor aún que Δ_{12}.

Haciendo uso de los valores de probabilidades de los diferentes microestados $\boldsymbol{\pi}(\{\boldsymbol{s_i}\})$ se puede construir el gráfico que se muestra en la figura A2.

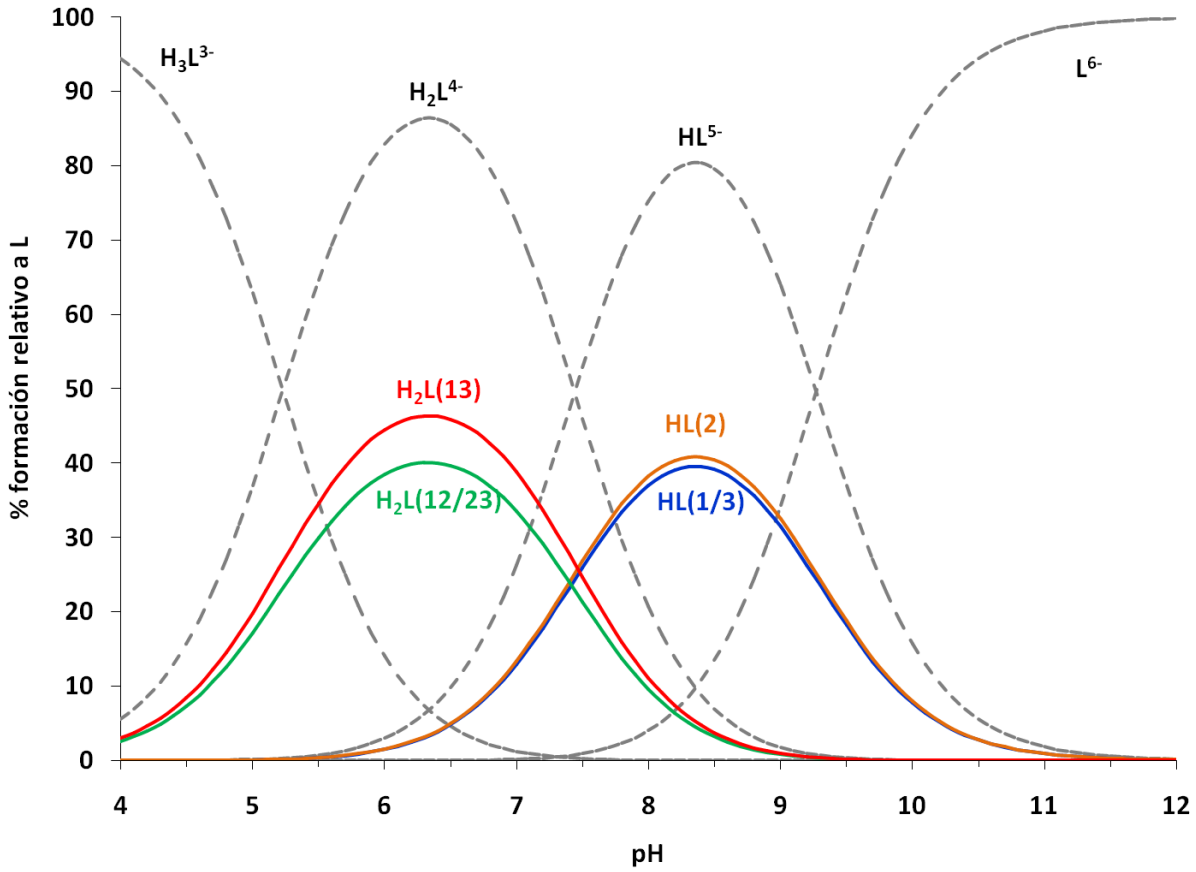


Figura A2. Diagrama de distribución de macro y microespecies del sistema InsP_3-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Se omiten las cargas de las microespecies por claridad.

A partir de aquí se pueden ajustar los parámetros que especifican el equilibrio de microespecies: $\boldsymbol{p\widehat{K}_i}$ y $\boldsymbol{\epsilon_{i,j}}$. El ajuste se realizó sobre cinco curvas con 93 puntos cada una, resultando en un sigma acumulado de 0,167. Los valores finales se exponen en la tabla A4.

Tabla A4. Resultados del ajuste de los parámetros que describen el equilibrio de microespecies para el sistema InsP_3-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Parámetros				
$\boldsymbol{p\widehat{K}_1}$	8,78		$\boldsymbol{p\widehat{K}_3}$	8,78
$\boldsymbol{p\widehat{K}_2}$	9,05		$\boldsymbol{\epsilon_{31}}$	1,10
$\boldsymbol{\epsilon_{12}}$	1,77		$\boldsymbol{\epsilon_{23}}$	1,77
$\boldsymbol{\epsilon_{21}}$	1,77		$\boldsymbol{\epsilon_{32}}$	1,77
$\boldsymbol{\epsilon_{13}}$	1,10			

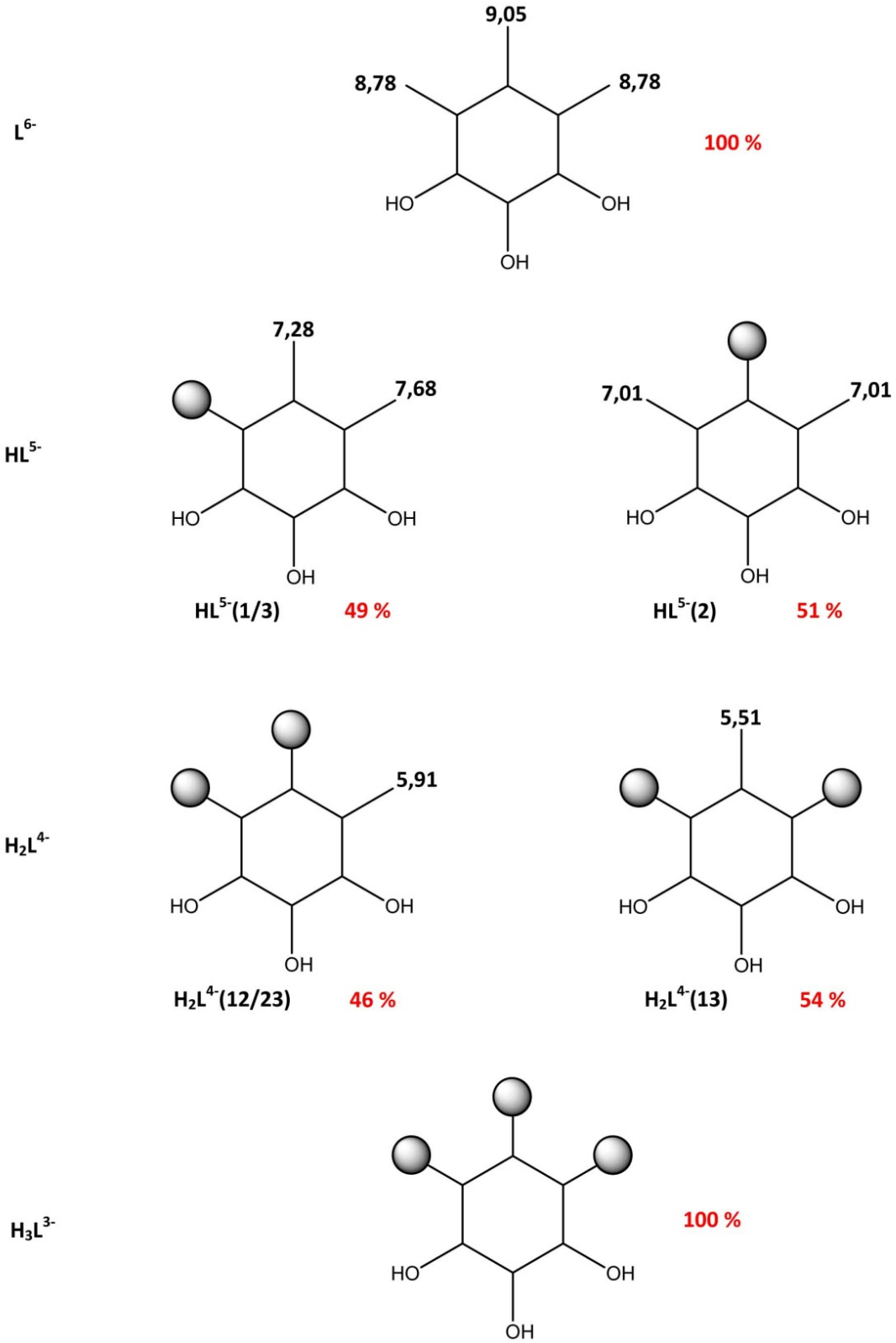


Figura A3. Predominancia y logaritmos de las constantes de deprotonación individuales para los microestados del sistema InsP_3-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Los sitios protonados se marcan con círculos grises.

Los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ determinados son cercanos a $\boldsymbol{\beta_1}$ (9,27, ajustado por RMN), aunque $\boldsymbol{p\widehat{K}}_2$ es levemente mayor, por lo que es de esperar que el grupo fosfato en 2 se protone en mayor medida que el resto. En este caso, a diferencia de los parámetros que describen el comportamiento en el RMN de ligando (Δ_{ij}), los valores de ϵ_{ij} son prácticamente insensibles al entorno químico de cada fosfato, por lo que $\epsilon_{ij} = \epsilon_{ji}$ con $i \neq j$. Por otra parte, $\epsilon_{13} < \epsilon_{12}$, por lo que la variación de los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ disminuye a medida que aumenta la distancia al fosfato que se protona. Si representamos los fosfatos protonados con círculos grises, la figura A3 muestra la distribución y los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ de los diversos microestados.

3. Aplicación del método al sistema Ins(1,3,4,5,6)P_5-H^+

El Ins(1,3,4,5,6)P_5 posee cinco sitios ionizables (N = 5); los macroestados y microestados a considerar son los que se muestran en la tabla A5. Además, dado que los fosfatos 1 y 3, y 4 y 6 son equivalentes, en la tercera y quinta columnas se exponen las restricciones al modelo por simetría. Finalmente, se agregan en la cuarta columna las restricciones adicionales debidas a que la suma de los $\boldsymbol{\pi_n(\{s_i\})}$ para todos los microestados de un macroestado debe valer 1.

Tabla A5. Macro y microestados del sistema InsP_5-H^+. Se muestran además las restricciones al modelo teórico.

Macro-estados	Micro-estados	Restricciones sobre $\pi_n(\{s_i\})$	Restricciones adicionales	Restricciones sobre Δ_{lm}
n = 0	{0,0,0,0,0}	---	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,0,0\}) = 1}$	$\boldsymbol{\Delta_{31} = \Delta_{13}}$ $\boldsymbol{\Delta_{33} = \Delta_{11}}$ $\boldsymbol{\Delta_{34} = \Delta_{16}}$ $\boldsymbol{\Delta_{35} = \Delta_{15}}$ $\boldsymbol{\Delta_{36} = \Delta_{14}}$ $\boldsymbol{\Delta_{61} = \Delta_{43}}$ $\boldsymbol{\Delta_{63} = \Delta_{41}}$ $\boldsymbol{\Delta_{64} = \Delta_{46}}$ $\boldsymbol{\Delta_{65} = \Delta_{45}}$ $\boldsymbol{\Delta_{66} = \Delta_{44}}$
n = 1	{1,0,0,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,0,0\}) = \pi(\{0,1,0,0,0\})}$	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,1,0\}) = 1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,1,0,0\})}$	
	{0,1,0,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,1,0,0\}) = \pi(\{0,0,0,0,1\})}$		
	{0,0,1,0,0}			
	{0,0,0,1,0}			
	{0,0,0,0,1}			
n = 2	{1,1,0,0,0}			

	{1,0,1,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1,0,0\}) = \pi(\{0,1,0,0,1\})}$		$\boldsymbol{\Delta_{53} = \Delta_{51}}$ $\boldsymbol{\Delta_{56} = \Delta_{54}}$
	{1,0,0,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,1,0\}) = \pi(\{0,1,0,1,0\})}$		
	{1,0,0,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,0,1\}) = \pi(\{0,1,1,0,0\})}$		
	{0,1,1,0,0}			
	{0,1,0,1,0}			
	{0,1,0,0,1}			
	{0,0,1,1,0}			
	{0,0,1,0,1}			
	{0,0,0,1,1}	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,1,1\}) = \pi(\{0,0,1,1,0\})}$		
	{1,1,1,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,0,0\}) = \pi(\{1,1,0,0,1\})}$		
	{1,1,0,1,0}			
	{1,1,0,0,1}			
	{1,0,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1,1,0\}) = \pi(\{0,1,0,1,1\})}$		
n = 3	{1,0,1,0,1}			
	{0,1,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,1,1,0\}) = \pi(\{1,0,0,1,1\})}$		
	{0,1,1,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,1,0,1\}) = \pi(\{1,0,1,0,1\})}$		
	{0,0,1,1,1}			
	{0,1,0,1,1}			
	{1,0,0,1,1}			
	{1,1,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,1,0\}) = \pi(\{1,1,0,1,1\})}$		
	{1,1,0,1,1}			
n = 4	{1,1,1,0,1}		$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,0,1\}) = 1 - 2\pi(\{1,0,1,1,1\}) - 2\pi(\{1,1,1,1,0\})}$	
	{1,0,1,1,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1,1,1\}) = \pi(\{0,1,1,1,1\})}$		
	{0,1,1,1,1}			
n = 5	{1,1,1,1,1}	---	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,1,1\}) = 1}$	

Haciendo uso de estas consideraciones el modelo a ajustar para cada fosfato será:

$$\delta_1 = \delta_1{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}}\right)\{[(\Delta_{11} + \Delta_{13})\pi(\{1,0,0,0,0\}) + (\Delta_{14}+\Delta_{16})\pi(\{0,0,1,0,0\}) + \Delta_{15}\big(1-2\pi(\{1,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,1,0,0\})\big)](\beta_1 10^{-pH}) + [(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(\pi(\{1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,0\})\big) + (\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(\pi(\{1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1\}) + \pi(\{0,0,1,0,1\})\big)+(\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1\})\big)](\beta_2 10^{-2pH}) + [(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(2\pi(\{1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,1,1,0\})\big) + (\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(\pi(\{1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{15})\big(\pi(\{1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big)](\beta_3 10^{-3pH}) + [(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(1-\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)+(\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)](\beta_4 10^{-4pH}) + [\Delta_{11}+\Delta_{13}+\Delta_{14}+\Delta_{15}+\Delta_{16}](\beta_5 10^{-5pH})\}$$

$$\delta_4 = \delta_4{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}}\right)\{[(\Delta_{41} + \Delta_{43})\pi(\{1,0,0,0,0\}) + (\Delta_{44}+\Delta_{46})\pi(\{0,0,1,0,0\}) + \Delta_{45}\big(1-2\pi(\{1,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,1,0,0\})\big)](\beta_1 10^{-pH}) + [(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(\pi(\{1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,0\})\big) + (\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(\pi(\{1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1\}) + \pi(\{0,0,1,0,1\})\big)+(\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1\})\big)](\beta_2 10^{-2pH}) + [(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(2\pi(\{1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,1,1,0\})\big) + (\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(\pi(\{1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{45})\big(\pi(\{1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big)](\beta_3 10^{-3pH}) + [(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(1-\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)+(\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)](\beta_4 10^{-4pH}) + [\Delta_{41}+\Delta_{43}+\Delta_{44}+\Delta_{45}+\Delta_{46}](\beta_5 10^{-5pH})\}$$

$$
\begin{aligned}
&\delta_5 \\
&= {\delta_5}^{(0)} \\
&+ \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}}\right)\{\left[(2\Delta_{51})\pi(\{1,0,0,0,0\})\right. \\
&+ (2\Delta_{54})\pi(\{0,0,1,0,0\}) + \Delta_{55}\big(1-2\pi(\{1,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,1,0,0\})\big)\Big](\beta_1 10^{-pH}) \\
&+ \big[(2\Delta_{51})\big(\pi(\{1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,1,0,0\})\big) \\
&+ (2\Delta_{54})\big(\pi(\{1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1\})+\pi(\{0,0,1,0,1\})\big) \\
&+ (\Delta_{55})\big(2\pi(\{1,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1\})\big)\big](\beta_2 10^{-2pH}) \\
&+ \big[(2\Delta_{51})\big(2\pi(\{1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,0,1\}) \\
&+ \pi(\{1,0,1,1,0\})\big) \\
&+ (2\Delta_{54})\big(\pi(\{1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,1,1,0\}) \\
&+ \pi(\{0,0,1,1,1\})\big) \\
&+ (\Delta_{55})\big(\pi(\{1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1\})\big)\big](\beta_3 10^{-3pH}) \\
&+ \big[(2\Delta_{51})\big(1-\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)+(2\Delta_{54})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,0\})\big) \\
&+ (\Delta_{55})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)\big](\beta_4 10^{-4pH}) \\
&+ [2\Delta_{51}+2\Delta_{54}+\Delta_{55}](\beta_5 10^{-5pH})\}
\end{aligned}
$$

Para facilitar el ajuste, se renombran los términos de la sumatoria según:

$$
\begin{aligned}
&\delta_1 \\
&= {\delta_1}^{(0)} \\
&+ \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}}\right)\{A(\beta_1 10^{-pH}) \\
&+ B(\beta_2 10^{-2pH}) + C(\beta_3 10^{-3pH}) + D(\beta_4 10^{-4pH}) + E(\beta_5 10^{-5pH})\}
\end{aligned}
$$

$$
\begin{aligned}
&\delta_4 \\
&= {\delta_4}^{(0)} \\
&+ \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}}\right)\{F(\beta_1 10^{-pH}) \\
&+ G(\beta_2 10^{-2pH}) + H(\beta_3 10^{-3pH}) + I(\beta_4 10^{-4pH}) + J(\beta_5 10^{-5pH})\}
\end{aligned}
$$

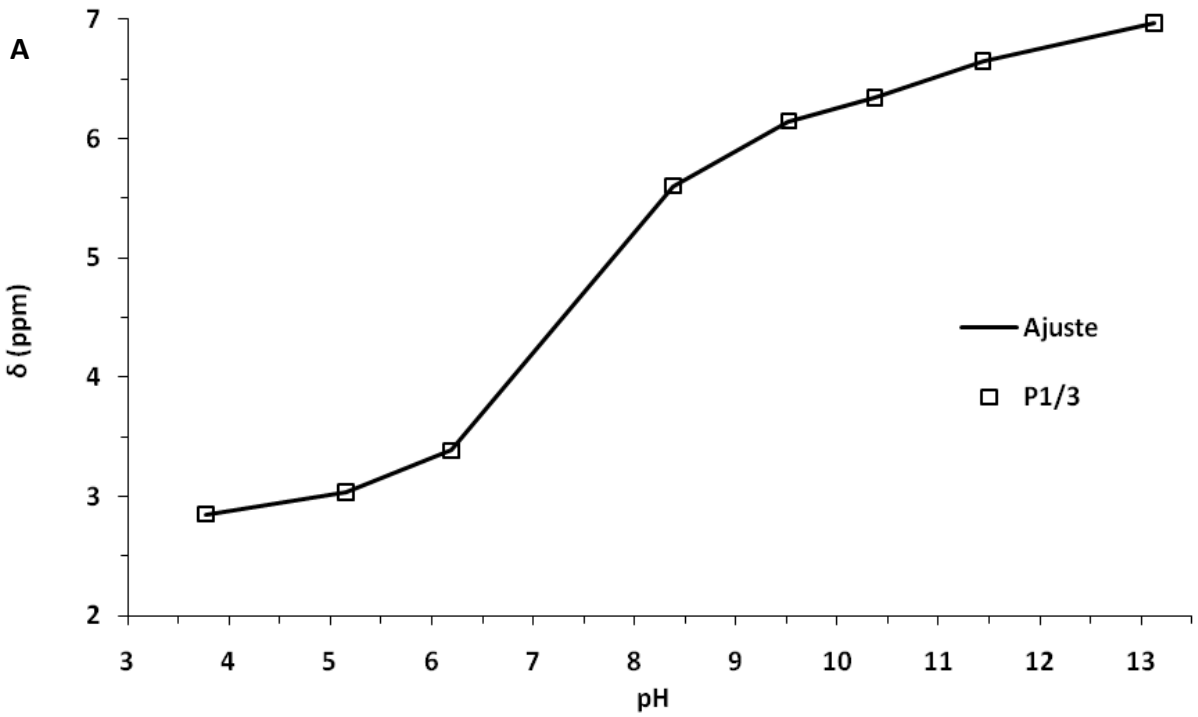
$$
\begin{aligned}
&\delta_5 \\
&= {\delta_5}^{(0)} \\
&+ \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}}\right)\{K(\beta_1 10^{-pH}) \\
&+ L(\beta_2 10^{-2pH}) + M(\beta_3 10^{-3pH}) + N(\beta_4 10^{-4pH}) + O(\beta_5 10^{-5pH})\}
\end{aligned}
$$

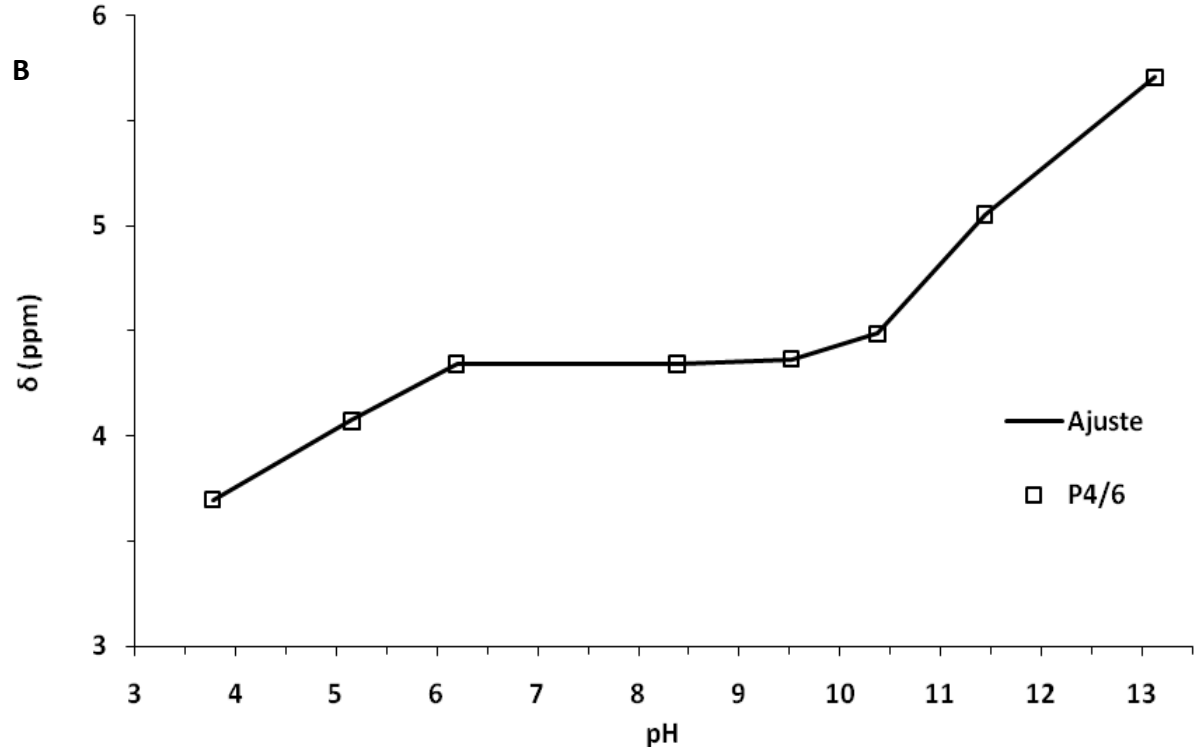
Se realiza una regresión no lineal de estos tres sistemas por separado con el programa Mathematica 5.0 [3], utilizando como datos experimentales los desplazamientos químicos de los tres fósforos en los espectros de RMN ^{31}P por encima de pH 3,7, para considerar sólo las especies H_5L^{5-}, H_4L^{6-}, H_3L^{7-}, H_2L^{8-}, HL^{9-} y L^{10-} y las $\boldsymbol{\beta_n}$ ajustadas previamente por en base a los mismos datos espectroscópicos. Los resultados se resumen en la tabla A6.

Tabla A6. Ajuste de los parámetros que describen el desplazamiento químico de cada fósforo del InsP_5 en función del pH (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Núcleo	Parámetro	Valor ajustado	σ_{ajuste}
P1/3	$\boldsymbol{\delta_1^{(0)}}$	7,001(2)	0,003
	$\boldsymbol{A}$	-0,195(5)	
	$\boldsymbol{B}$	-0,703(3)	
	$\boldsymbol{C}$	-1,463(4)	
	$\boldsymbol{D}$	-3,851(3)	
	$\boldsymbol{E}$	-4,168(3)	
P4/6	$\boldsymbol{\delta_4^{(0)}}$	5,777(8)	0,009
	$\boldsymbol{F}$	-0,42(2)	
	$\boldsymbol{G}$	-1,43(1)	
	$\boldsymbol{H}$	-1,44(1)	
	$\boldsymbol{I}$	-1,39(1)	
	$\boldsymbol{J}$	-2,12(1)	
P5	$\boldsymbol{\delta_5^{(0)}}$	6,24(2)	0,017
	$\boldsymbol{K}$	-0,09(3)	
	$\boldsymbol{L}$	-0,63(2)	
	$\boldsymbol{M}$	-1,39(2)	
	$\boldsymbol{N}$	-1,54(2)	
	$\boldsymbol{O}$	-2,24(2)	

El ajuste del modelo a los datos experimentales es, al igual que ocurrió con el InsP_3, bastante bueno. Se muestran en la figura A4 las curvas correspondientes.


A
δ (ppm)
pH
Ajuste
P1/3


B
δ (ppm)
pH
Ajuste
P4/6

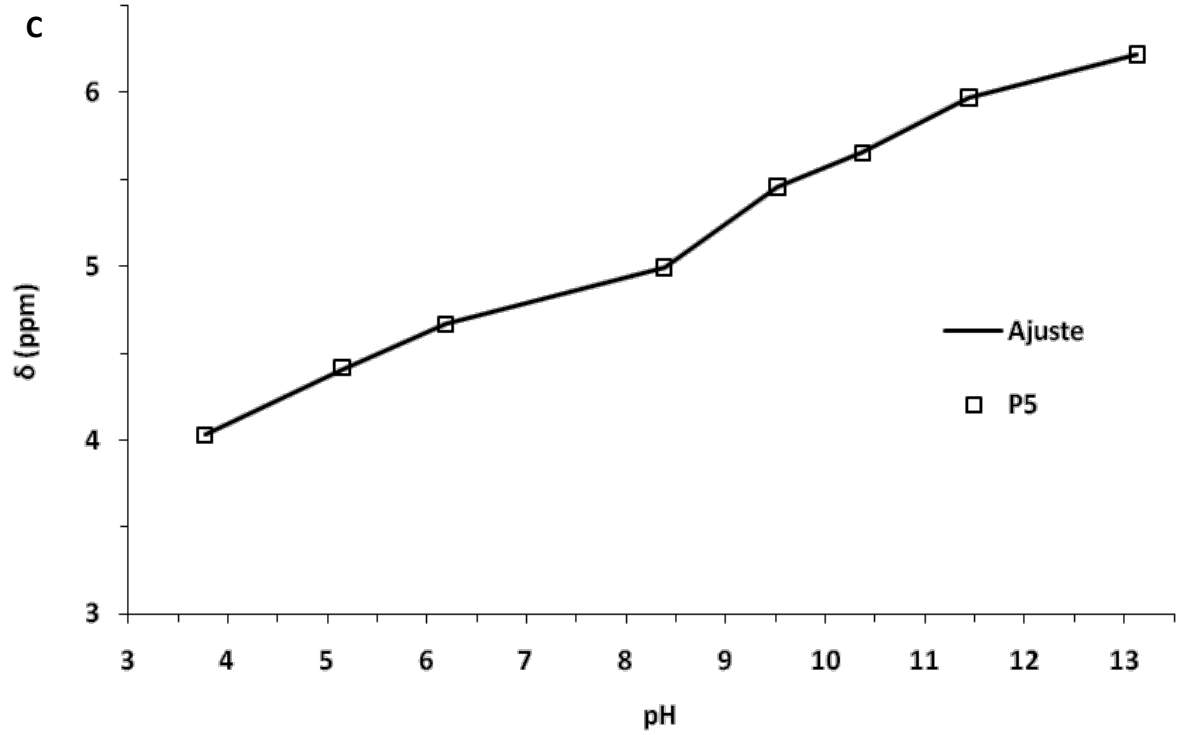


Figura A4. Ajuste del modelo a los datos de desplazamiento químico del InsP_5 en función del pH (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Grupo fosfato en C1/3 (A), en C4/6 (B) y en C5 (C).

A partir de aquí, la resolución de este sistema implica la solución aproximada al siguiente sistema de ecuaciones:

$$A = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\pi(\{1,0,0,0,0\}) + (\Delta_{14} + \Delta_{16})\pi(\{0,0,1,0,0\}) + \Delta_{15}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,1,0,0\})\big)$$

$$B = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(\pi(\{1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,0\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(\pi(\{1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1\}) + \pi(\{0,0,0,1,1\}) + \pi(\{0,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1\})\big)$$

$$C = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(2\pi(\{1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,1,1,0\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(\pi(\{1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{15})\big(\pi(\{1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big)$$

$$D = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(1 - \pi(\{1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)$$

$$E = \Delta_{11} + \Delta_{13} + \Delta_{14} + \Delta_{15} + \Delta_{16}$$

$$F = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\pi(\{1,0,0,0,0\}) + (\Delta_{44} + \Delta_{46})\pi(\{0,0,1,0,0\}) + \Delta_{45}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,1,0,0\})\big)$$

$$G = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(\pi(\{1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,0\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(\pi(\{1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1\}) + \pi(\{0,0,0,1,1\}) + \pi(\{0,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1\})\big)$$

$$H = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(2\pi(\{1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,1,1,0\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(\pi(\{1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{45})\big(\pi(\{1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big)$$

$$I = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(1 - \pi(\{1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)$$

$$J = \Delta_{41} + \Delta_{43} + \Delta_{44} + \Delta_{45} + \Delta_{46}$$

$$K = (2\Delta_{51})\pi(\{1,0,0,0,0\}) + (2\Delta_{54})\pi(\{0,0,1,0,0\}) + \Delta_{55}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,1,0,0\})\big)$$

$$L = (2\Delta_{51})\big(\pi(\{1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,0\})\big) + (2\Delta_{54})\big(\pi(\{1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1\}) + \pi(\{0,0,0,1,1\}) + \pi(\{0,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{55})\big(2\pi(\{1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1\})\big)$$

$$M = (2\Delta_{51})\big(2\pi(\{1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,1,1,0\})\big) + (2\Delta_{54})\big(\pi(\{1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{55})\big(\pi(\{1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1\})\big)$$

$$N = (2\Delta_{51})\big(1 - \pi(\{1,0,1,1,1\})\big) + (2\Delta_{54})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{55})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1\})\big)$$

$$O = 2\Delta_{51} + 2\Delta_{54} + \Delta_{55}$$

Partiendo de $\Delta_{ii} = -4$, $\Delta_{ij} = \Delta_{ji} = 0,4$ (con ij fosfatos consecutivos) y $\Delta_{ik} = 0$ (con ik fosfatos no consecutivos), valores reportados para el Ins(1,2,6)P_3 [1], y ajustando con la restricción de que las probabilidades sean mayores que 0 y menores que 1 se obtienen los resultados que se exponen en la tabla A7.

Tabla A7. Resultados del ajuste de los parámetros que describen la respuesta de cada fosfato del InsP_5 en los espectros de RMN de ^{31}P a medida que se protona el ligando (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C, σ_{ajuste} = 0,361).

Parámetros			
Δ_{11}	-4,81	Δ_{33}	-4,81
Δ_{13}	0,195	Δ_{31}	0,195
Δ_{14}	0,425	Δ_{36}	0,425
Δ_{15}	-0,638	Δ_{35}	-0,638
Δ_{16}	0,675	Δ_{34}	0,675
Δ_{41}	0,155	Δ_{63}	0,155
Δ_{43}	0,375	Δ_{61}	0,375
Δ_{44}	-2,63	Δ_{66}	-2,63
Δ_{45}	-1,18	Δ_{65}	-1,18
Δ_{46}	1,20	Δ_{64}	1,20
Δ_{51}	0,0120	Δ_{53}	0,0120
Δ_{54}	0,551	Δ_{56}	0,551
Δ_{55}	-3,38	$\pi(\{0,1,0,0,0\})$	0,113
$\pi(\{1,0,0,0,0\})$	0,113	$\pi(\{0,0,0,0,1\})$	0,324
$\pi(\{0,0,1,0,0\})$	0,324	$\pi(\{0,0,0,1,0\})$	0,126
$\pi(\{1,1,0,0,0\})$	0,0101	$\pi(\{0,1,1,0,0\})$	0,0767
$\pi(\{1,0,0,0,1\})$	0,0767	$\pi(\{0,1,0,1,0\})$	0,104
$\pi(\{1,0,0,1,0\})$	0,104	$\pi(\{0,0,1,1,0\})$	0,0940
$\pi(\{1,0,1,0,0\})$	0,0270	$\pi(\{0,1,0,0,1\})$	0,0270
$\pi(\{0,0,0,1,1\})$	0,0940	$\pi(\{0,0,1,0,1\})$	0,387
$\pi(\{1,1,1,0,0\})$	0,0314	$\pi(\{1,0,0,1,1\})$	0,0120
$\pi(\{1,1,0,1,0\})$	0,0118	$\pi(\{1,1,0,0,1\})$	0,0314
$\pi(\{0,1,1,1,0\})$	0,0120	$\pi(\{1,0,1,0,1\})$	0,144
$\pi(\{0,1,1,0,1\})$	0,144	$\pi(\{0,1,0,1,1\})$	0,192
$\pi(\{1,0,1,1,0\})$	0,192	$\pi(\{0,0,1,1,1\})$	0,230
$\pi(\{1,0,1,1,1\})$	0,0865	$\pi(\{0,1,1,1,1\})$	0,0865
$\pi(\{1,1,1,1,0\})$	0,264	$\pi(\{1,1,0,1,1\})$	0,264
$\pi(\{1,1,1,1,1\})$	1	$\pi(\{1,1,1,0,1\})$	0,298

Este ajuste muestra algunos aspectos interesantes relacionados con la estructura química del ligando. Los valores de Δ_{ii} son diferentes para los

fosfatos no equivalentes, aunque están en el rango esperado para el decrecimiento del corrimiento químico del núcleo ^{31}P debido a la protonación del grupo fosfato [2]. De forma interesante, para fosfatos no equivalentes $\Delta_{ij} \neq \Delta_{ji}$ con $\boldsymbol{i \neq j}$, por lo que el efecto de la protonación de los grupos vecinos depende además del entorno propio de cada fosfato. Si se intenta colocar la restricción $\Delta_{ij} = \Delta_{ji}$ con $\boldsymbol{i \neq j}$ al resolver el sistema, los cálculos asociados no llegan a convergencia. Observando más al detalle los valores se encuentra que, tomando en cuenta la magnitud y no el signo, $\Delta_{14} < \Delta_{15} \approx \Delta_{16}$, $\Delta_{41} < \Delta_{46} \approx \Delta_{45}$ y $\Delta_{51} < \Delta_{54}$ en acuerdo con la proximidad relativa de los grupos ionizables. Aparentemente la interacción entre los grupos fosfatos en 4, 5 y 6 es importante (altos valores de Δ_{45}, Δ_{54} y Δ_{46}), mientras que dado que un grupo OH "bloquea" la posición 2, disminuyendo la deslocalización de la densidad electrónica en esa zona, Δ_{13} es menor de lo que cabría esperar. Finalmente, la interacción de los fosfatos 1/3 con 4/6 es levemente menor que la que se observa entre los fosfatos 4, 5 y 6, ya que $\Delta_{41} < \Delta_{43} \ll \Delta_{45} \approx \Delta_{46}$ y $\Delta_{16} \approx \Delta_{15}$. Haciendo uso de los valores de probabilidades de los diferentes microestados $\boldsymbol{\pi(\{s_i\})}$ se puede construir el gráfico que se muestra en la figura A5.

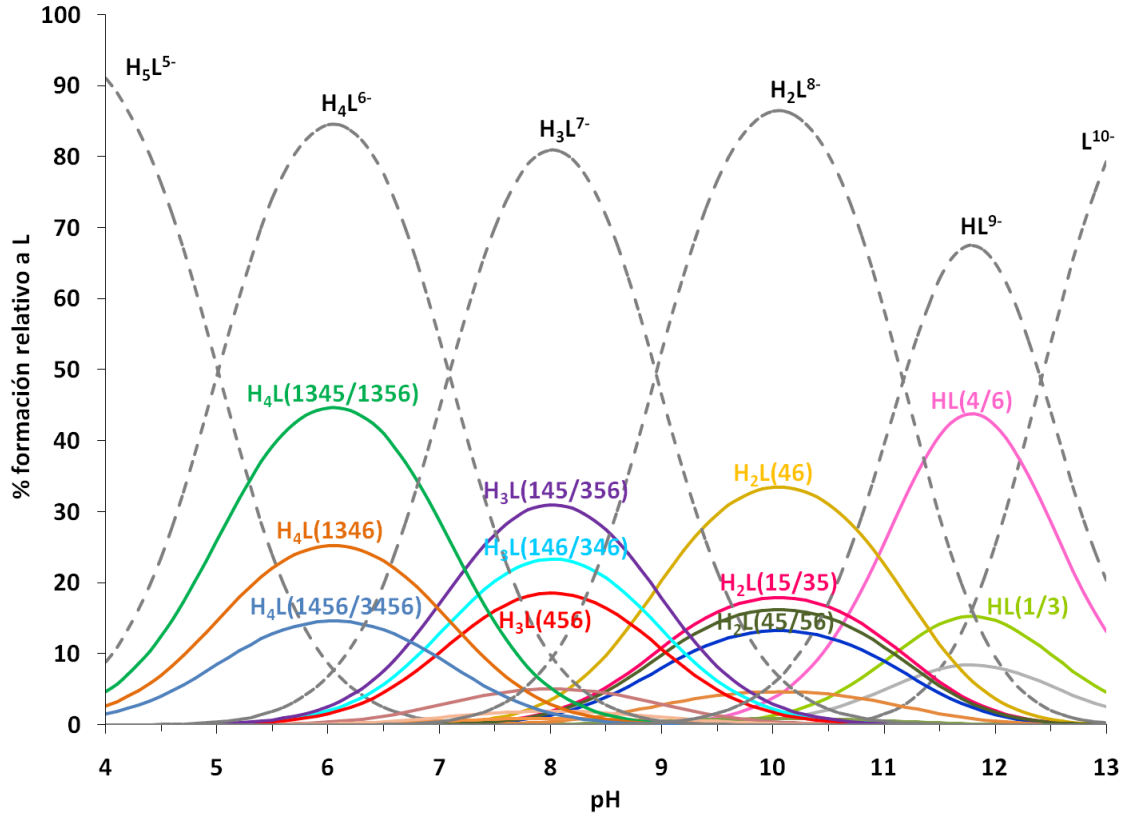


Figura A5. Diagrama de distribución de macro y microespecies del sistema InsP_5-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Se omiten las cargas de las microespecies por claridad.

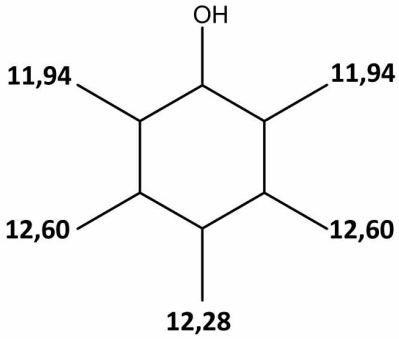
Finalmente, se pueden ajustar los parámetros que especifican el equilibrio de microespecies: $\boldsymbol{p\widehat{K}_i}$ y $\boldsymbol{\epsilon_{i,j}}$. El ajuste se realizó sobre 19 curvas con 93 puntos cada una, dando un sigma acumulado de 0,897. Los resultados se detallan en la tabla A8. La figura A6 muestra la distribución y los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ de los diversos microestados.

Tabla A8. Resultados del ajuste de los parámetros que describen el equilibrio de microespecies para el sistema InsP_5-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Parámetros			
$\boldsymbol{p\widehat{K}_1}$	11,94	$\boldsymbol{p\widehat{K}_3}$	11,94
$\boldsymbol{p\widehat{K}_4}$	12,60	$\boldsymbol{p\widehat{K}_6}$	12,60
$\boldsymbol{p\widehat{K}_5}$	12,28	$\boldsymbol{\epsilon_{31}}$	1,12
$\boldsymbol{\epsilon_{13}}$	1,12	$\boldsymbol{\epsilon_{34}}$	2,00
$\boldsymbol{\epsilon_{14}}$	1,47	$\boldsymbol{\epsilon_{35}}$	1,52
$\boldsymbol{\epsilon_{15}}$	1,52	$\boldsymbol{\epsilon_{36}}$	1,47
$\boldsymbol{\epsilon_{16}}$	2,00	$\boldsymbol{\epsilon_{43}}$	2,00
$\boldsymbol{\epsilon_{41}}$	1,47	$\boldsymbol{\epsilon_{53}}$	1,52
$\boldsymbol{\epsilon_{45}}$	1,83	$\boldsymbol{\epsilon_{56}}$	1,83
$\boldsymbol{\epsilon_{46}}$	1,55	$\boldsymbol{\epsilon_{63}}$	1,47
$\boldsymbol{\epsilon_{51}}$	1,52	$\boldsymbol{\epsilon_{64}}$	1,55
$\boldsymbol{\epsilon_{54}}$	1,83	$\boldsymbol{\epsilon_{65}}$	1,83
$\boldsymbol{\epsilon_{61}}$	2,00		

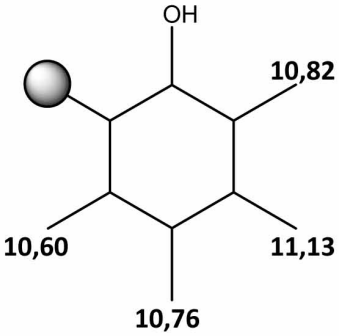
Los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ determinados son cercanos a $\boldsymbol{\beta_1}$ (12,41, ajustado por RMN), aunque $\boldsymbol{p\widehat{K}_4}$ y $\boldsymbol{p\widehat{K}_6}$ son mayores, por lo que es de esperar que, en mayor medida, el primer grupo fosfato que se protone se encuentre en posición 4 ó 6. Así como ocurrió para el InsP_3, a diferencia de los parámetros que describen el comportamiento en el RMN de ligando ($\boldsymbol{\Delta_{ij}}$), los valores de $\boldsymbol{\epsilon_{ij}}$ son prácticamente insensibles al entorno químico de cada fosfato, por lo que $\boldsymbol{\epsilon_{ij} = \epsilon_{ji}}$ con $\boldsymbol{i \neq j}$. Asimismo, $\boldsymbol{\epsilon_{14} < \epsilon_{15} < \epsilon_{16}}$, $\boldsymbol{\epsilon_{41} < \epsilon_{46} < \epsilon_{45} < \epsilon_{43}}$, $\boldsymbol{\epsilon_{51} < \epsilon_{54}}$, por lo que la variación de los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ disminuye a medida que aumenta la distancia al fosfato que se protona. De hecho, si se observan detenidamente los valores, el $\boldsymbol{\epsilon_{ij}}$para fosfatos adyacentes ronda los 1,8-2,0 y para fosfatos separados por una o dos posiciones es cercano a 1,5. Finalmente, el OH en posición 2 nuevamente genera una baja importante en el valor esperado de $\boldsymbol{\epsilon_{13}}$, el cual es significativamente menor que $\boldsymbol{\epsilon_{15}}$.

L^{10-}

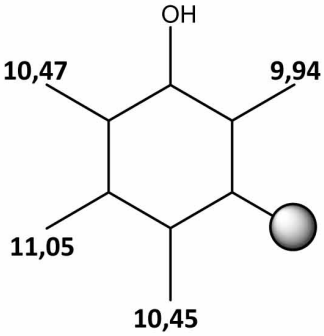


100 %

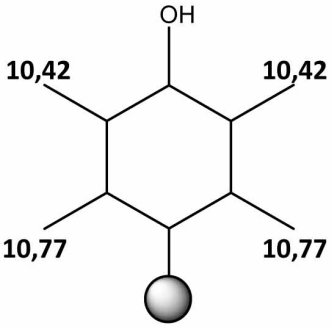
HL^{9-}



HL^{9-}(1/3) 22,6 %

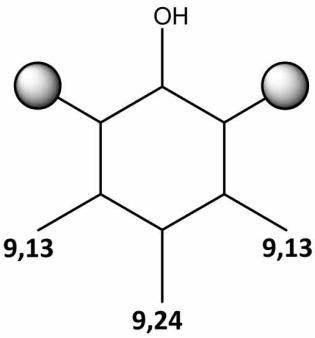


HL^{9-}(4/6) 64,8 %

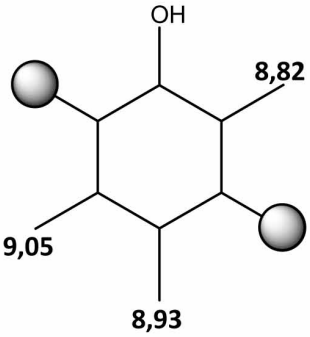


HL^{9-}(5) 12,6 %

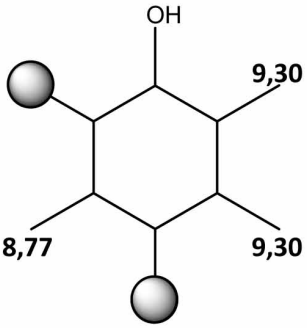
H_2L^{8-}



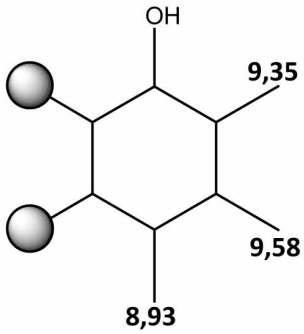
H_2L^{8-}(13) 1,0 %



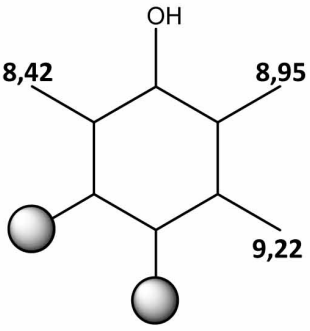
H_2L^{8-}(14/36) 5,4 %



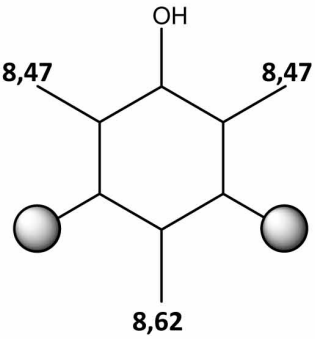
H_2L^{8-}(15/35) 20,7 %



H_2L^{8-}(16/34) 15,3 %



H_2L^{8-}(45/56) 18,8 %



H_2L^{8-}(46) 38,7 %

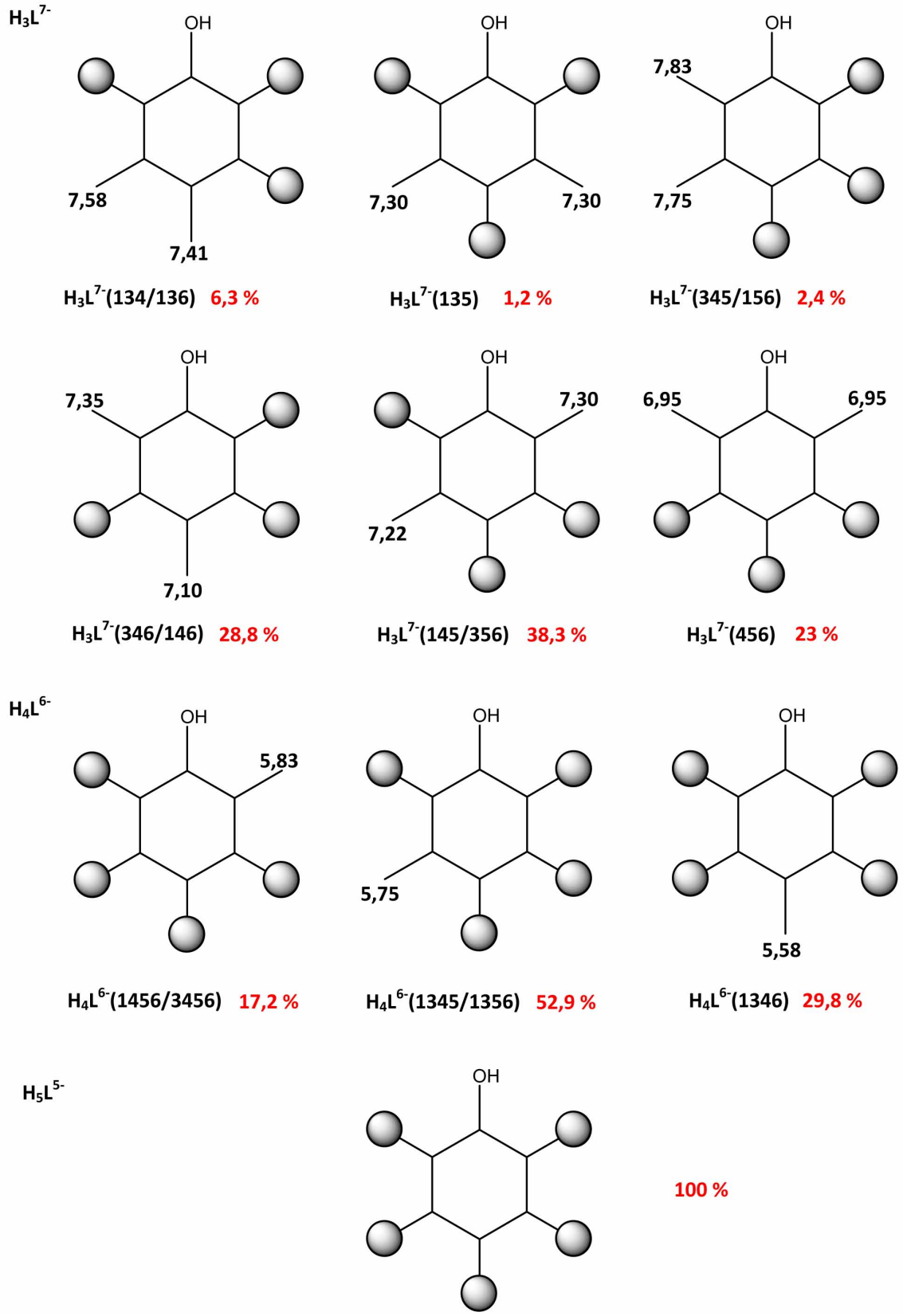


Figura A6. Predominancia y logaritmos de las constantes de deprotonación individuales para los microestados del sistema InsP_5-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Los sitios protonados se marcan con círculos grises.

4. Aplicación del método al sistema InsP_6-H^+

El InsP_6, con seis sitios ionizables, da lugar a 7 macroestados y 64 microestados, los que se detallan en la tabla A9. Dada la simetría de la molécula, los fosfatos sobre C1 y C3, y C4 y C6 son equivalentes, por lo que en la tercera y quinta columnas se exponen las restricciones al modelo por simetría. Finalmente, se agregan en la cuarta columna restricciones adicionales debidas a que para cada macroestado $\boldsymbol{n}$ se cumple que $\sum_{\{s_i\}} \boldsymbol{\pi_n}(\{\boldsymbol{s_i}\})\delta_{n,\sum_j s_j} = \mathbf{1}$.

Tabla A9. Macro y microestados del sistema InsP_6-H^+. Se muestran además las restricciones al modelo teórico.

Macro-estados	Micro-estados	Restricciones sobre $\pi_n(\{s_i\})$	Restricciones adicionales	Restricciones sobre Δ_{lm}
n = 0	{0,0,0,0,0,0}	---	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,0,0,0\}) = 1}$	
n = 1	{1,0,0,0,0,0} {0,0,1,0,0,0} {0,1,0,0,0,0} {0,0,0,1,0,0} {0,0,0,0,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) = \pi(\{0,0,1,0,0,0\})}$ $\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) = \pi(\{0,0,0,0,0,1\})}$		$\boldsymbol{\Delta_{31} = \Delta_{13}}$
	{0,0,0,0,1,0}		$\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,0,1,0\}) = 1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) - \pi(\{0,1,0,0,0,0\})}$	$\boldsymbol{\Delta_{32} = \Delta_{12}}$ $\boldsymbol{\Delta_{33} = \Delta_{11}}$ $\boldsymbol{\Delta_{34} = \Delta_{16}}$ $\boldsymbol{\Delta_{35} = \Delta_{15}}$ $\boldsymbol{\Delta_{36} = \Delta_{14}}$ $\boldsymbol{\Delta_{61} = \Delta_{43}}$ $\boldsymbol{\Delta_{62} = \Delta_{42}}$ $\boldsymbol{\Delta_{63} = \Delta_{41}}$ $\boldsymbol{\Delta_{64} = \Delta_{46}}$ $\boldsymbol{\Delta_{65} = \Delta_{45}}$ $\boldsymbol{\Delta_{66} = \Delta_{44}}$ $\boldsymbol{\Delta_{53} = \Delta_{51}}$ $\boldsymbol{\Delta_{56} = \Delta_{54}}$ $\boldsymbol{\Delta_{23} = \Delta_{21}}$ $\boldsymbol{\Delta_{26} = \Delta_{24}}$
n = 2	{1,1,0,0,0,0} {0,1,1,0,0,0} {1,0,0,1,0,0} {0,0,1,0,0,1} {1,0,0,0,1,0} {0,0,1,0,1,0} {1,0,0,0,0,1} {0,0,1,1,0,0} {1,0,1,0,0,0} {0,1,0,1,0,0} {0,1,0,0,0,1} {0,1,0,0,1,0} {0,0,0,1,1,0} {0,0,0,0,1,1} {0,0,0,1,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) = \pi(\{0,1,1,0,0,0\})}$ $\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,1,0,0\}) = \pi(\{0,0,1,0,0,1\})}$ $\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,0,1,0\}) = \pi(\{0,0,1,0,1,0\})}$ $\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,0,0,1\}) = \pi(\{0,0,1,1,0,0\})}$ $\boldsymbol{\pi(\{0,1,0,1,0,0\}) = \pi(\{0,1,0,0,0,1\})}$ $\boldsymbol{\pi(\{0,0,0,1,1,0\}) = \pi(\{0,0,0,0,1,1\})}$		
n = 3	{1,1,1,0,0,0} {1,1,0,1,0,0} {0,1,1,0,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,0,1,0,0\}) = \pi(\{0,1,1,0,0,1\})}$		

	{1,1,0,0,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,0,0,1,0\})}$	
	{0,1,1,0,1,0}	$\boldsymbol{= \pi(\{0,1,1,0,1,0\})}$	
	{1,0,1,1,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1,1,0,0\})}$	
	{1,0,1,0,0,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,0,1,0,0,1\})}$	
	{1,0,1,0,1,0}		
	{1,0,0,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,1,1,0\})}$	
	{0,0,1,0,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{0,0,1,0,1,1\})}$	
	{0,1,1,1,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,1,1,0,0\})}$	
	{1,1,0,0,0,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,1,0,0,0,1\})}$	
	{0,0,1,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,1,1,1,0\})}$	
	{1,0,0,0,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,0,0,0,1,1\})}$	
	{0,0,1,1,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{0,0,1,1,0,1\})}$	
	{1,0,0,1,0,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,0,0,1,0,1\})}$	
	{0,1,0,1,0,1}		
	{0,1,0,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,0,1,1,0\})}$	
	{0,1,0,0,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{0,1,0,0,1,1\})}$	
	{0,0,0,1,1,1}		
	{1,1,1,1,0,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,1,0,0\})}$	
	{1,1,1,0,0,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,1,1,0,0,1\})}$	
	{1,1,0,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,0,1,1,0\})}$	
	{0,1,1,0,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{0,1,1,0,1,1\})}$	
	{1,0,1,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1,1,1,0\})}$	
	{1,0,1,0,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,0,1,0,1,1\})}$	
	{1,0,1,1,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,0,0,1,1,1\})}$	
n = 4	{1,0,0,1,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{0,0,1,1,1,1\})}$	
	{0,0,1,1,1,1}		
	{1,1,1,0,1,0}		
	{0,1,1,1,1,0}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,1,1,1,0\})}$	
	{1,1,0,0,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,1,0,0,1,1\})}$	
	{0,1,0,1,1,1}		
	{0,1,1,1,0,1}		
	{1,1,0,1,0,1}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,1,1,0,1\})}$	
		$\boldsymbol{= \pi(\{1,1,0,1,0,1\})}$	
	{0,1,1,1,1,1}	$\boldsymbol{\pi(\{0,1,1,1,1,1\})}$	
	{1,1,0,1,1,1}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,1,0,1,1,1\})}$	
	{1,1,1,1,0,1}		
n = 5	{1,1,1,0,1,1}	$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,0,1,1\})}$	
	{1,1,1,1,1,0}	$\boldsymbol{= \pi(\{1,1,1,1,1,0\})}$	
			$\boldsymbol{\pi(\{1,0,1,1,1,1\})}$
	{1,0,1,1,1,1}		$\boldsymbol{= 1 - 2\pi(\{1,1,0,1,1,1\})}$
			$\boldsymbol{- 2\pi(\{1,1,1,1,1,0\})}$
			$\boldsymbol{- \pi(\{1,1,1,1,0,1\})}$
n = 6	{1,1,1,1,1,1}		$\boldsymbol{\pi(\{1,1,1,1,1,1\}) = 1}$

Atendiendo a la información anterior, las ecuaciones del modelo a ajustar son:

$$\begin{aligned}
\delta_1 = \delta_1{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)\{[(\Delta_{11} \\
+\Delta_{13})\pi(\{1,0,0,0,0,0\})+(\Delta_{12})\pi(\{0,1,0,0,0,0\})+(\Delta_{14}+\Delta_{16})\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) \\
+\Delta_{15}\big(1-2\pi(\{1,0,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,0,1,0,0\})-\pi(\{0,1,0,0,0,0\})\big)](\beta_1 10^{-pH}) \\
+\big[(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\}) \\
+\pi(\{1,0,1,0,0,0\})\big)+(\Delta_{12})\big(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) \\
+(\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1,0\}) \\
+\pi(\{0,0,0,1,0,1\})\big) \\
+(\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big)](\beta_2 10^{-2pH}) \\
+\big[(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0,0\}) \\
+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\}) \\
+\pi(\{0,0,1,1,0,1\})\big) \\
+(\Delta_{12})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,0,0\}) \\
+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})\big) \\
+(\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) \\
+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\}) \\
+\pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) \\
+(\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,1,0\}) \\
+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big)](\beta_3 10^{-3pH}) \\
+\big[(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) \\
+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,1\})\big) \\
+(\Delta_{12})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) \\
+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \\
+(\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,1\}) \\
+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \\
+(\Delta_{15})\big(\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) \\
+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big)](\beta_4 10^{-4pH}) \\
+\big[(\Delta_{11}+\Delta_{13})\big(1-\pi(\{1,1,0,1,1,1\})\big) \\
+(\Delta_{12})\big(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,1\})+\pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) \\
+(\Delta_{16}+\Delta_{14})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,1,0\})\big)+(\Delta_{15})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big)\big](\beta_5 10^{-5pH}) \\
+[\Delta_{11}+\Delta_{12}+\Delta_{13}+\Delta_{14}+\Delta_{15}+\Delta_{16}](\beta_6 10^{-6pH})\}
\end{aligned}$$

$$\delta_2 = \delta_2{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)$$
$$\cdot\{[(2\Delta_{21})\pi(\{1,0,0,0,0,0\})+(\Delta_{22})\pi(\{0,1,0,0,0,0\})+(2\Delta_{24})\pi(\{0,0,0,1,0,0\})$$
$$+\Delta_{25}(1-2\pi(\{1,0,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,0,1,0,0\})-\pi(\{0,1,0,0,0,0\}))](\beta_1 10^{-pH})$$
$$+[(2\Delta_{21})(\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})$$
$$+\pi(\{1,0,1,0,0,0\}))+(\Delta_{22})(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\}))$$
$$+(2\Delta_{24})(\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,0,0,1,0,1\}))$$
$$+(\Delta_{25})(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\}))](\beta_2 10^{-2pH})$$
$$+[(2\Delta_{21})(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0,0\})$$
$$+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,0,1,1,0,1\}))$$
$$+(\Delta_{22})(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,0,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,1\}))$$
$$+(2\Delta_{24})(\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,0,0,1,1,1\}))$$
$$+(\Delta_{25})(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,1,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,0,0,1,1,1\}))](\beta_3 10^{-3pH})$$
$$+[(2\Delta_{21})(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,1\}))$$
$$+(\Delta_{22})(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\}))$$
$$+(2\Delta_{24})(\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})$$
$$+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\}))$$
$$+(\Delta_{25})(\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\}))](\beta_4 10^{-4pH})$$
$$+[(2\Delta_{21})(1-\pi(\{1,1,0,1,1,1\}))$$
$$+(\Delta_{22})(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,1\})+\pi(\{1,1,1,1,0,1\}))$$
$$+(2\Delta_{24})(1-\pi(\{1,1,1,1,1,0\}))+(\Delta_{25})(1-\pi(\{1,1,1,1,0,1\}))](\beta_5 10^{-5pH})$$
$$+[2\Delta_{21}+\Delta_{22}+2\Delta_{24}+\Delta_{25}](\beta_6 10^{-6pH})\}$$

$$\delta_4 = {\delta_4}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)\{[(\Delta_{41}$$
$$+\Delta_{43})\pi(\{1,0,0,0,0,0\})+(\Delta_{42})\pi(\{0,1,0,0,0,0\})+(\Delta_{44}+\Delta_{46})\pi(\{0,0,0,1,0,0\})$$
$$+\Delta_{45}\big(1-2\pi(\{1,0,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,0,1,0,0\})-\pi(\{0,1,0,0,0,0\})\big)](\beta_1 10^{-pH})$$
$$+\big[(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})$$
$$+\pi(\{1,0,1,0,0,0\})\big)+(\Delta_{42})\big(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big)$$
$$+(\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,0,0,1,0,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big)](\beta_2 10^{-2pH})$$
$$+\big[(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0,0\})$$
$$+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,0,1,1,0,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{42})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,0,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,1,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big)](\beta_3 10^{-3pH})$$
$$+\big[(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})$$
$$+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{42})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})$$
$$+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{45})\big(\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})$$
$$+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big)](\beta_4 10^{-4pH})$$
$$+\big[(\Delta_{41}+\Delta_{43})\big(1-\pi(\{1,1,0,1,1,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{42})\big(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,1\})+\pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big)$$
$$+(\Delta_{46}+\Delta_{44})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,1,0\})\big)+(\Delta_{45})\big(1-\pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big)](\beta_5 10^{-5pH})$$
$$+[\Delta_{41}+\Delta_{42}+\Delta_{43}+\Delta_{44}+\Delta_{45}+\Delta_{46}](\beta_6 10^{-6pH})\}$$

$$\delta_5 = \delta_5{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)$$
$$\cdot\{\left[(2\Delta_{51})\pi(\{1,0,0,0,0,0\})+(\Delta_{52})\pi(\{0,1,0,0,0,0\})+(2\Delta_{54})\pi(\{0,0,0,1,0,0\})\right.$$
$$\left.+\Delta_{55}\left(1-2\pi(\{1,0,0,0,0,0\})-2\pi(\{0,0,0,1,0,0\})-\pi(\{0,1,0,0,0,0\})\right)\right](\beta_1 10^{-pH})$$
$$+\left[(2\Delta_{51})\left(\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})\right.\right.$$
$$\left.+\pi(\{1,0,1,0,0,0\})\right)+(\Delta_{52})\left(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\})\right)$$
$$+(2\Delta_{54})\left(\pi(\{1,0,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,0,0,0,0,1\})+\pi(\{0,0,0,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+\pi(\{0,0,0,1,0,1\})\right)$$
$$\left.+(\Delta_{55})\left(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\})+2\pi(\{0,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,0,1,0\})\right)\right](\beta_2 10^{-2pH})$$
$$+\left[(2\Delta_{51})\left(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,0,0\})\right.\right.$$
$$\left.+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+\pi(\{0,0,1,1,0,1\})\right)$$
$$+(\Delta_{52})\left(\pi(\{1,1,1,0,0,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,0,0\})\right.$$
$$\left.+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})\right)$$
$$+(2\Delta_{54})\left(\pi(\{0,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,0,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+\pi(\{0,1,0,1,0,1\})+\pi(\{0,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+\pi(\{0,0,0,1,1,1\})\right)$$
$$+(\Delta_{55})\left(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\})+\pi(\{1,0,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,0,1,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+2\pi(\{0,1,0,1,1,0\})+\pi(\{0,0,0,1,1,1\})\right)\left](\beta_3 10^{-3pH}\right)$$
$$+\left[(2\Delta_{51})\left(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})\right.\right.$$
$$\left.+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})+\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,1,1,0,1\})\right)$$
$$+(\Delta_{52})\left(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\right)$$
$$+(2\Delta_{54})\left(\pi(\{1,1,1,1,0,0\})+\pi(\{1,1,0,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+\pi(\{1,0,1,1,0,1\})\right.$$
$$\left.+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{0,1,1,1,0,1\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\right)$$
$$+(\Delta_{55})\left(\pi(\{1,1,1,0,1,0\})+2\pi(\{1,0,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,0,0,1,1,1\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,0\})\right.$$
$$\left.+2\pi(\{0,1,1,1,1,0\})+\pi(\{0,1,0,1,1,1\})\right)\left](\beta_4 10^{-4pH}\right)$$
$$+\left[(2\Delta_{51})\left(1-\pi(\{1,1,0,1,1,1\})\right)\right.$$
$$+(\Delta_{52})\left(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\})+2\pi(\{1,1,0,1,1,1\})+\pi(\{1,1,1,1,0,1\})\right)$$
$$\left.+(2\Delta_{54})\left(1-\pi(\{1,1,1,1,1,0\})\right)+(\Delta_{55})\left(1-\pi(\{1,1,1,1,0,1\})\right)\right](\beta_5 10^{-5pH})$$
$$+[2\Delta_{51}+\Delta_{52}+2\Delta_{54}+\Delta_{55}](\beta_6 10^{-6pH})\}$$

Para facilitar el ajuste, se renombran los términos de la sumatoria según:

$$\delta_1 = \delta_1{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)\{A(\beta_1 10^{-pH}) + B(\beta_2 10^{-2pH}) + C(\beta_3 10^{-3pH}) + D(\beta_4 10^{-4pH}) + E(\beta_5 10^{-5pH}) + F(\beta_6 10^{-6pH})\}$$

$$\delta_2 = \delta_2{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)\{G(\beta_1 10^{-pH}) + H(\beta_2 10^{-2pH}) + I(\beta_3 10^{-3pH}) + J(\beta_4 10^{-4pH}) + K(\beta_5 10^{-5pH}) + L(\beta_6 10^{-6pH})\}$$

$$\delta_4 = \delta_4{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)\{M(\beta_1 10^{-pH}) + N(\beta_2 10^{-2pH}) + O(\beta_3 10^{-3pH}) + P(\beta_4 10^{-4pH}) + Q(\beta_5 10^{-5pH}) + R(\beta_6 10^{-6pH})\}$$

$$\delta_5 = \delta_5{}^{(0)} + \left(\frac{1}{1+\beta_1 10^{-pH}+\beta_2 10^{-2pH}+\beta_3 10^{-3pH}+\beta_4 10^{-4pH}+\beta_5 10^{-5pH}+\beta_6 10^{-6pH}}\right)\{S(\beta_1 10^{-pH}) + T(\beta_2 10^{-2pH}) + U(\beta_3 10^{-3pH}) + V(\beta_4 10^{-4pH}) + W(\beta_5 10^{-5pH}) + X(\beta_6 10^{-6pH})\}$$

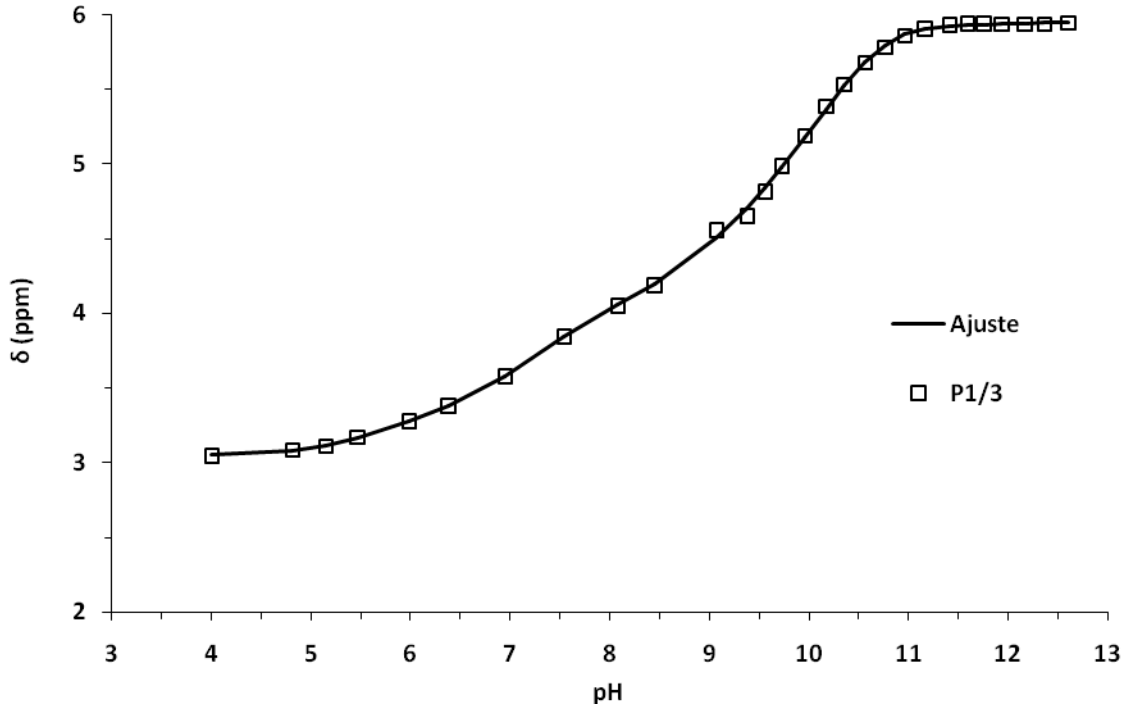
Se realiza un ajuste no lineal con el programa Mathematica 5.0 [3], utilizando como datos experimentales los desplazamientos químicos de las señales por encima de pH 4, donde predominan las especies entre H_6L^{6-} y L^{12-}. Como en los sistemas anteriores, se hace uso de los valores de $\boldsymbol{\beta_n}$ ajustados previamente a partir de los mismos datos espectroscópicos. Los resultados dan un único mínimo y se resumen en la tabla A10.

Tabla A10. Ajuste de los parámetros que describen el desplazamiento químico de cada fósforo del InsP_6 en función del pH (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

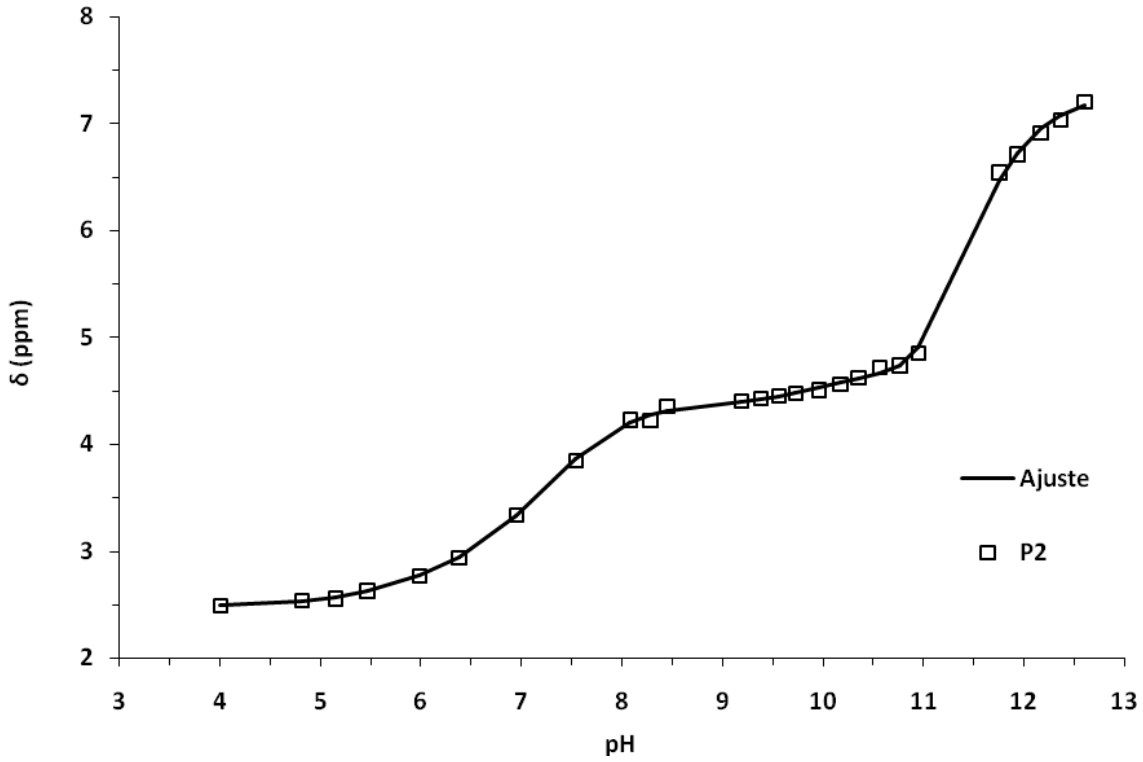
Núcleo	Parámetro	Valor ajustado	σ_{ajuste}
P1/3	$\delta_1^{(0)}$	5,95(1)	0,090
	A	-0,09(7)	
	B	0,08(3)	
	C	-1,21(3)	
	D	-1,88(2)	
	E	-2,59(2)	
	F	-2,91(2)	
P2	$\delta_2^{(0)}$	7,31(3)	0,16
	G	-3,7(2)	
	H	-2,41(6)	
	I	-2,95(5)	
	J	-2,91(4)	
	K	-4,47(4)	
	L	-4,82(4)	
P4/6	$\delta_4^{(0)}$	5,53(1)	0,091
	M	-1,20(7)	
	N	-0,98(3)	
	O	-1,57(3)	
	P	-1,63(2)	
	Q	-1,48(2)	
	R	-2,00(2)	
P5	$\delta_5^{(0)}$	5,79(1)	0,070
	S	-0,77(5)	
	T	-0,50(2)	
	U	-0,55(2)	
	V	-0,50(1)	
	W	-1,03(2)	
	X	-1,77(1)	

Se muestran en la figura A7 las curvas correspondientes al ajuste del modelo a los datos experimentales.

A



B



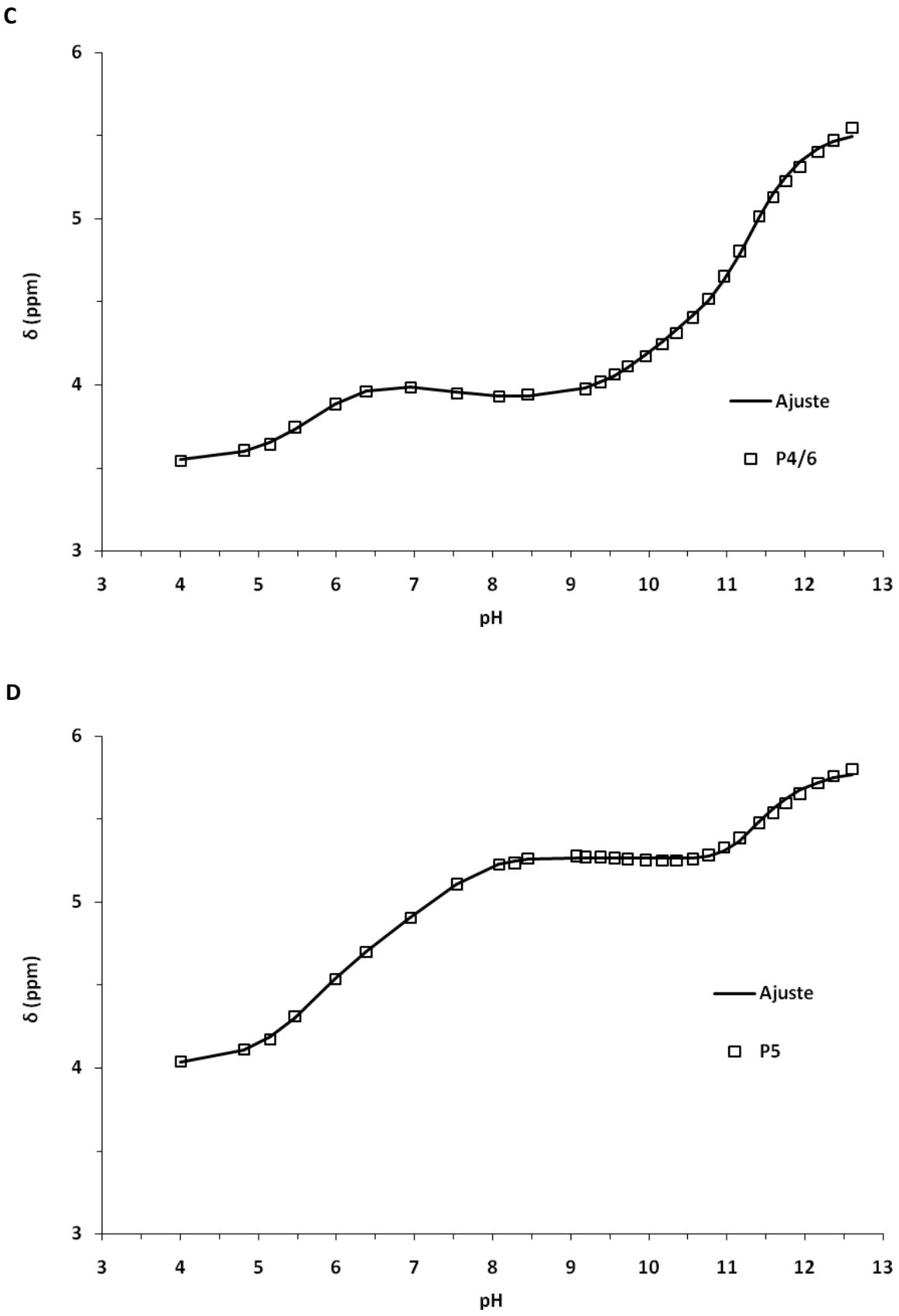


Figura A7. Ajuste del modelo a los datos experimentales de desplazamiento químico del Ins*P6* en función del pH (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Grupo fosfato en C1/3 (A), en C2 (B), en C4/6 (C) y en C5 (D).

La resolución de este sistema se consigue entonces con la determinación de la solución aproximada al siguiente sistema de ecuaciones:

$$A = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) + (\Delta_{12})\pi(\{0,1,0,0,0,0\}) + (\Delta_{14} + \Delta_{16})\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) + \Delta_{15}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) - \pi(\{0,1,0,0,0,0\})\big)$$

$$B = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) + \pi(\{1,0,1,0,0,0\})\big) + (\Delta_{12})\big(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(\pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big)$$

$$C = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,0,1\})\big) + (\Delta_{12})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{15})\big(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big)$$

$$D = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,1\})\big) + (\Delta_{12})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{15})\big(\pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big)$$

$$E = (\Delta_{11} + \Delta_{13})\big(1 - \pi(\{1,1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{12})\big(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,1\}) + \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) + (\Delta_{16} + \Delta_{14})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{15})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big)$$

$$F = \Delta_{11} + \Delta_{12} + \Delta_{13} + \Delta_{14} + \Delta_{15} + \Delta_{16}$$

$$G = (2\Delta_{21})\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) + (\Delta_{22})\pi(\{0,1,0,0,0,0\}) + (2\Delta_{24})\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) + \Delta_{25}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) - \pi(\{0,1,0,0,0,0\})\big)$$

$$\begin{aligned} H = (2\Delta_{21})\big(&\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,0,0,0\})\big) \\ &+ (\Delta_{22})\big(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) \\ &+ (2\Delta_{24})\big(\pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) \\ &+ \pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,0,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{25})\big(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} I = (2\Delta_{21})\big(&\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0,0\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) \\ &+ \pi(\{0,0,1,1,0,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{22})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\})\big) \\ &+ (2\Delta_{24})\big(\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) \\ &+ \pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,1,1,0,1\}) \\ &+ \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{25})\big(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} J = (2\Delta_{21})\big(&2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{22})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (2\Delta_{24})\big(\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,1,0\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{25})\big(\pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) \\ &+ 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} K = (2\Delta_{21})\big(&1 - \pi(\{1,1,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{22})\big(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,1\}) + \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) \\ &+ (2\Delta_{24})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{25})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) \end{aligned}$$

$$L = 2\Delta_{21} + \Delta_{22} + 2\Delta_{24} + \Delta_{25}$$

$$M = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) + (\Delta_{42})\pi(\{0,1,0,0,0,0\}) + (\Delta_{44} + \Delta_{46})\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) + \Delta_{45}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) - \pi(\{0,1,0,0,0,0\})\big)$$

$$N = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) + \pi(\{1,0,1,0,0,0\})\big) + (\Delta_{42})\big(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(\pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big)$$

$$O = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,0,1\})\big) + (\Delta_{42})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{45})\big(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big)$$

$$P = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,1\})\big) + (\Delta_{42})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{45})\big(\pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big)$$

$$Q = (\Delta_{41} + \Delta_{43})\big(1 - \pi(\{1,1,0,1,1,1\})\big) + (\Delta_{42})\big(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,1\}) + \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) + (\Delta_{46} + \Delta_{44})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{45})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big)$$

$$R = \Delta_{41} + \Delta_{42} + \Delta_{43} + \Delta_{44} + \Delta_{45} + \Delta_{46}$$

$$S = (2\Delta_{51})\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) + (\Delta_{52})\pi(\{0,1,0,0,0,0\}) + (2\Delta_{54})\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) + \Delta_{55}\big(1 - 2\pi(\{1,0,0,0,0,0\}) - 2\pi(\{0,0,0,1,0,0\}) - \pi(\{0,1,0,0,0,0\})\big)$$

$$\begin{aligned} T = (2\Delta_{51})\big(&\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,0,0,0\})\big) \\ &+ (\Delta_{52})\big(2\pi(\{1,1,0,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) \\ &+ (2\Delta_{54})\big(\pi(\{1,0,0,1,0,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,0,0,0,1\}) \\ &+ \pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,0,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{55})\big(2\pi(\{1,0,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,0,1,0\})\big) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} U = (2\Delta_{51})\big(&\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,0,0\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) \\ &+ \pi(\{0,0,1,1,0,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{52})\big(\pi(\{1,1,1,0,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{1,1,0,1,0,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\})\big) \\ &+ (2\Delta_{54})\big(\pi(\{0,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,0,0\}) \\ &+ \pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,0,1\}) + \pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,0,1,1,0,1\}) \\ &+ \pi(\{1,0,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{55})\big(2\pi(\{1,1,0,0,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{0,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{0,0,0,1,1,1\})\big) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V = (2\Delta_{51})\big(&2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + \pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,1,1,0,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{52})\big(2\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (2\Delta_{54})\big(\pi(\{1,1,1,1,0,0\}) + \pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + \pi(\{1,0,1,1,1,0\}) \\ &+ \pi(\{1,0,1,1,0,1\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) + \pi(\{0,1,1,1,1,0\}) \\ &+ 2\pi(\{0,1,1,1,0,1\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{55})\big(\pi(\{1,1,1,0,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,0,0,1,1,1\}) \\ &+ 2\pi(\{1,1,0,1,1,0\}) + 2\pi(\{0,1,1,1,1,0\}) + \pi(\{0,1,0,1,1,1\})\big) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} W = (2\Delta_{51})\big(&1 - \pi(\{1,1,0,1,1,1\})\big) \\ &+ (\Delta_{52})\big(2\pi(\{1,1,1,1,1,0\}) + 2\pi(\{1,1,0,1,1,1\}) + \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) \\ &+ (2\Delta_{54})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,1,0\})\big) + (\Delta_{55})\big(1 - \pi(\{1,1,1,1,0,1\})\big) \end{aligned}$$

$$X = 2\Delta_{51} + \Delta_{52} + 2\Delta_{54} + \Delta_{55}$$

Usando una estrategia similar a la empleada en los casos anteriores, se parte de $\Delta_{ii} = -4$, $\Delta_{ij} = \Delta_{ji} = 0,4$ (con ij fosfatos consecutivos) y $\Delta_{ik} = 0$ (con ik fosfatos no consecutivos) [1], y se ajusta el sistema con la restricción de que las probabilidades sean mayores que 0 y menores que 1. Los resultados se detallan en la tabla A11.

Tabla A11. Resultados del ajuste de los parámetros que describen la respuesta de cada fosfato del InsP_6 en los espectros de RMN de ^{31}P a medida que se protona el ligando (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C, σ_{ajuste} = 0,438).

Parámetros			
Δ_{11}	-3,158	Δ_{31}	-0,156
Δ_{12}	-0,087	Δ_{32}	-0,087
Δ_{13}	-0,156	Δ_{33}	-3,158
Δ_{14}	0,608	Δ_{34}	0,608
Δ_{15}	-0,696	Δ_{35}	-0,696
Δ_{16}	0,608	Δ_{36}	0,608
Δ_{21}	-0,136	Δ_{23}	-0,136
Δ_{22}	-3,747	Δ_{26}	-0,283
Δ_{24}	-0,283	Δ_{53}	-0,276
Δ_{25}	-0,303	Δ_{56}	0,374
Δ_{41}	0,178	Δ_{61}	0,178
Δ_{42}	-1,167	Δ_{62}	-1,167
Δ_{43}	0,178	Δ_{63}	0,178
Δ_{44}	-2,334	Δ_{64}	0,667
Δ_{45}	0,644	Δ_{65}	0,644
Δ_{46}	0,667	Δ_{66}	-2,334
Δ_{51}	-0,276	$\pi(\{0,0,1,0,0,0\})$	0,000
Δ_{52}	-0,741	$\pi(\{0,0,0,0,0,1\})$	0,000
Δ_{54}	0,374	$\pi(\{0,0,0,0,1,0\})$	0,000
Δ_{55}	-1,087	$\pi(\{0,0,1,1,0,0\})$	0,006
$\pi(\{1,0,0,0,0,0\})$	0,000	$\pi(\{0,0,1,0,1,0\})$	0,000
$\pi(\{0,1,0,0,0,0\})$	1,000	$\pi(\{0,0,0,0,1,1\})$	0,000
$\pi(\{0,0,0,1,0,0\})$	0,000	$\pi(\{0,0,1,0,0,1\})$	0,033
$\pi(\{1,1,0,0,0,0\})$	0,000	$\pi(\{0,1,1,0,0,0\})$	0,000
$\pi(\{1,0,0,1,0,0\})$	0,033	$\pi(\{0,1,0,0,0,1\})$	0,027
$\pi(\{1,0,0,0,1,0\})$	0,000	$\pi(\{0,0,0,1,0,1\})$	0,400
$\pi(\{1,0,0,0,0,1\})$	0,006	$\pi(\{1,0,0,0,1,1\})$	0,000
$\pi(\{1,0,1,0,0,0\})$	0,000	$\pi(\{1,0,1,0,0,1\})$	0,115
$\pi(\{0,1,0,1,0,0\})$	0,027	$\pi(\{1,0,0,1,0,1\})$	0,000

$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,470	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{0}\})$	0,194	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0}\})$	0,115	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,110	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,194
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,466	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,194
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0}\})$	0,194	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,071
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,057
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,197
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000	$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	1,000
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,417		
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,000		
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,000		
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,000		
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1}\})$	0,057		
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0}\})$	0,197		
$\boldsymbol{\pi}(\{\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{1},\mathbf{0},\mathbf{1}\})$	0,423		

Así como ocurrió con el InsP_5, los valores obtenidos están en acuerdo con algunos aspectos estructurales del ligando. Los valores de Δ_{ii} son diferentes para los fosfatos no equivalentes, y se encuentran en el rango esperado para la variación del corrimiento químico de las señales debido a la protonación del grupo fosfato [2]. Asimismo, para fosfatos no equivalentes $\Delta_{ij} \neq \Delta_{ji}$ con $\boldsymbol{i \neq j}$, dado que el efecto de la protonación de los grupos vecinos depende del entorno individual de cada fosfato. Sin embargo, en contraposición a lo observado para el InsP_5, la relación entre los valores de Δ_{ij} no es clara. La inclusión de un grupo fosfato en C2 en una posición inversa al resto provoca la aparición de un esquema de interacciones de largo alcance más complejo. Δ_{12} y Δ_{21} son realmente muy pequeños, lo que evidencia una interacción débil entre P1, P2 y P3. En este caso, tomando valores absolutos, $\Delta_{14} \approx \Delta_{15} \approx \Delta_{16} \gg 0$, por lo que la interacción de los fosfatos 1 y 3 parece ser importante "hacia atrás", en dirección hacia los grupos en C4, C5 y C6. Esto deja al fosfato en 2, el

cual se encuentra direccionado de forma diferencial al resto, más "aislado", haciendo que los valores de Δ_{2j} con $2 \neq j$ sean más pequeños. Es factible que P2 se encuentre más expuesto al medio, y por tanto presente un nivel de hidratación mayor. Esto, junto al hecho de la posición inversa al resto de los grupos ionizables, permitiría explicar la baja interacción "123" en comparación a la observada en el caso de Ins(1,2,3)P_3. Finalmente, el estado de protonación del fosfato en C2 afecta en gran medida a los grupos en C4, C5 y C6. Seguramente esto se explica por interacciones complejas a través del espacio, las cuales se establecen no sólo a través de la red de enlaces de hidrógeno existente, sino a partir de la interacción de las nubes electrónicas a lo largo del anillo carbonado. Haciendo uso de los valores presentados hasta aquí se puede construir el gráfico que se muestra en la figura A8. El ajuste de los parámetros $\boldsymbol{p\widehat{K}_i}$ y $\boldsymbol{\epsilon_{i,j}}$ se realizó sobre 79 curvas con 91 puntos cada una, dando un sigma acumulado de 1,78. Los resultados se detallan en la tabla A12.

Tabla A12. Resultados del ajuste de los parámetros que describen el equilibrio de microespecies para el sistema InsP_6-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C).

Parámetros			
$\boldsymbol{p\widehat{K}_1}$	9,98	$\boldsymbol{p\widehat{K}_3}$	9,98
$\boldsymbol{p\widehat{K}_2}$	11,21	$\boldsymbol{p\widehat{K}_6}$	10,07
$\boldsymbol{p\widehat{K}_4}$	10,07	ϵ_{31}	-0,78
$\boldsymbol{p\widehat{K}_5}$	10,52	$\boldsymbol{\epsilon_{32}}$	0,14
$\boldsymbol{\epsilon_{12}}$	0,14	ϵ_{34}	0,50
$\boldsymbol{\epsilon_{13}}$	-0,78	ϵ_{35}	1,10
$\boldsymbol{\epsilon_{14}}$	-1,13	ϵ_{36}	-1,13
$\boldsymbol{\epsilon_{15}}$	1,10	$\boldsymbol{\epsilon_{23}}$	0,14
$\boldsymbol{\epsilon_{16}}$	0,50	ϵ_{26}	1,83
$\boldsymbol{\epsilon_{21}}$	0,14	ϵ_{61}	0,50
$\boldsymbol{\epsilon_{24}}$	1,83	ϵ_{62}	1,83
$\boldsymbol{\epsilon_{25}}$	-0,18	ϵ_{63}	-1,13
$\boldsymbol{\epsilon_{41}}$	-1,13	ϵ_{64}	1,26
$\boldsymbol{\epsilon_{42}}$	1,83	ϵ_{65}	1,21
$\boldsymbol{\epsilon_{43}}$	0,50	$\boldsymbol{\epsilon_{53}}$	1,10
$\boldsymbol{\epsilon_{45}}$	1,21	ϵ_{56}	1,21
$\boldsymbol{\epsilon_{46}}$	1,26		
$\boldsymbol{\epsilon_{51}}$	1,10		
$\boldsymbol{\epsilon_{52}}$	-0,18		
$\boldsymbol{\epsilon_{54}}$	1,21		

El valor ajustado de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ para el fosfato en C2 (11,21) es prácticamente el mismo que el valor de $\boldsymbol{\beta_1}$ determinado por los mismos datos espectroscópicos (11,158), además de ser bastante mayor que el correspondiente al resto de los sitios ionizables. Esto está en franco acuerdo con el hecho de que el primer protón se ubica exclusivamente sobre el fosfato 2. El resto de los fosfatos en la especie HL^{11-} se encontrarían altamente hidratados, con baja tendencia hacia la protonación. Es factible, no obstante, que en la dinámica de la solución el protón sea compartido a distancia con ellos. Nuevamente los parámetros que describen el comportamiento espectroscópico del ligando ($\boldsymbol{\epsilon_{ij}}$) son prácticamente insensibles al entorno químico de cada fosfato, por lo que $\boldsymbol{\epsilon_{ij}} = \boldsymbol{\epsilon_{ji}}$ con $i \neq j$. Sin embargo y debido a la intrincada red de interacciones establecida a través del espacio, la relación entre estos valores es compleja. La figura A9 muestra la distribución y los valores de $\boldsymbol{p\widehat{K}}$ de los diversos microestados para este sistema.

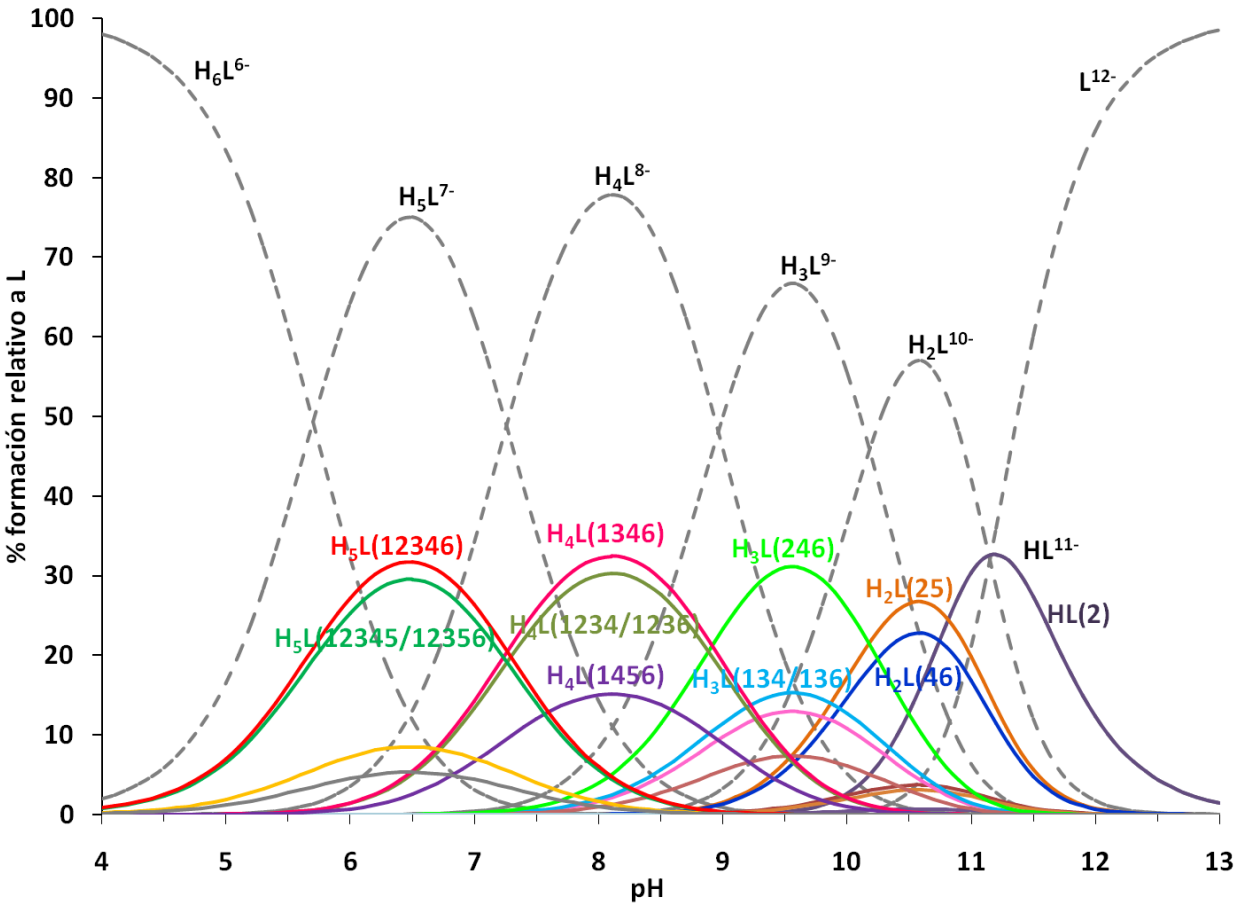
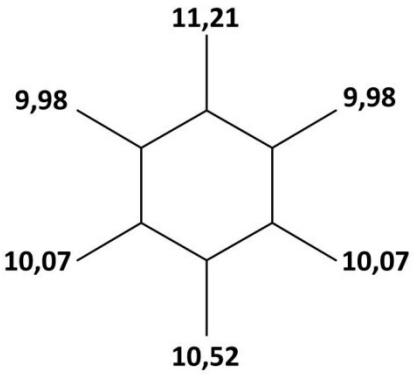


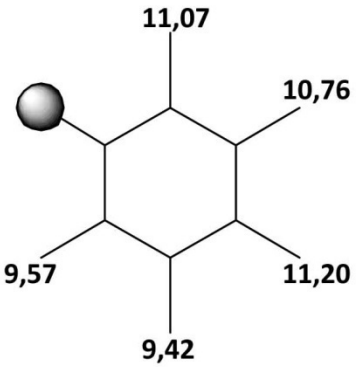
Figura A8. Diagrama de distribución de macro y microespecies del sistema InsP_6-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Se omiten las cargas de las microespecies por claridad.

L^{12-}

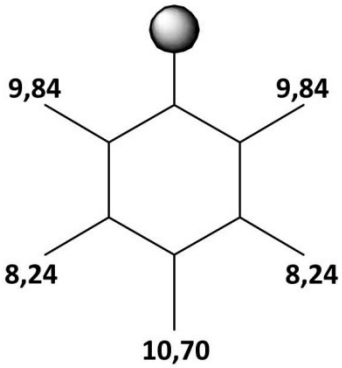


100 %

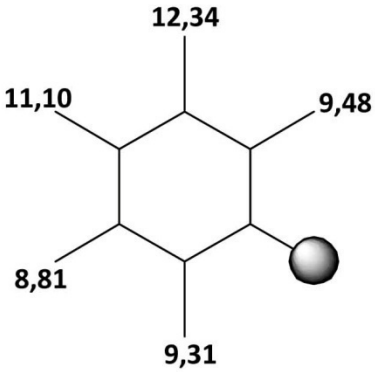
HL^{11-}



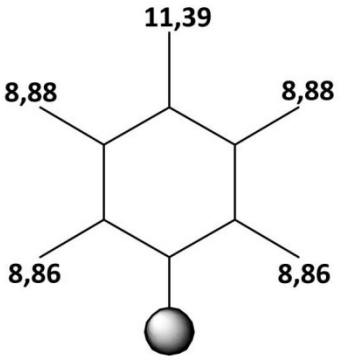
HL^{11-}(1/3) 0 %



HL^{11-}(2) 100 %

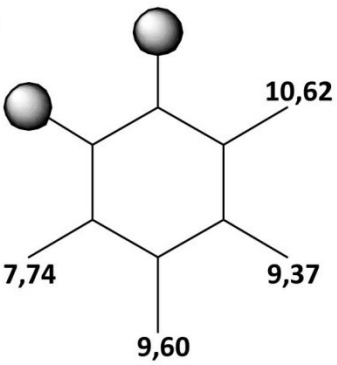


HL^{11-}(4/6) 0 %

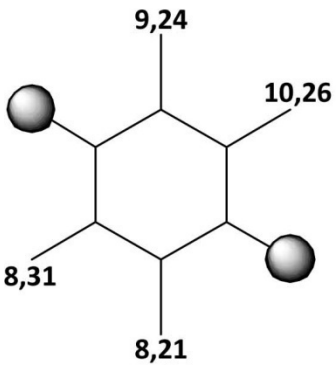


HL^{11-}(5) 0 %

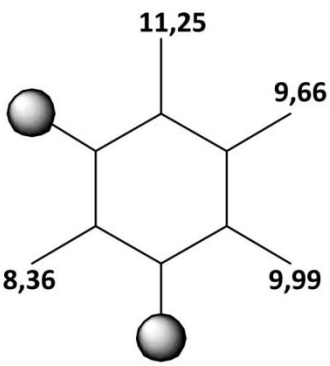
H_2L^{10-}



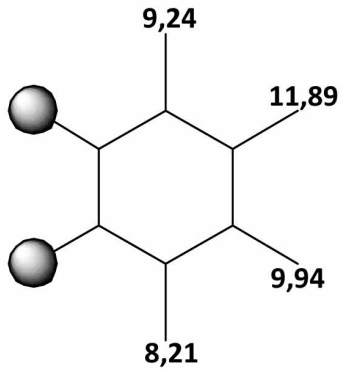
H_2L^{10-}(12/23) 0 %



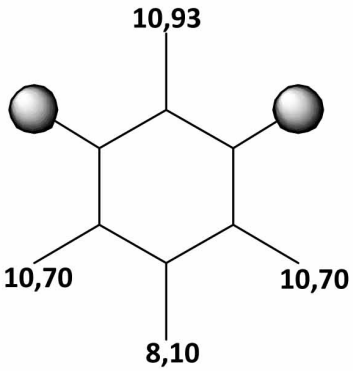
H_2L^{10-}(14/36) 6,6 %



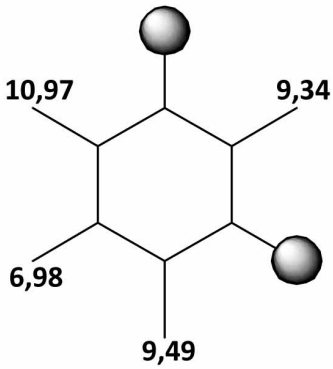
H_2L^{10-}(15/35) 0 %



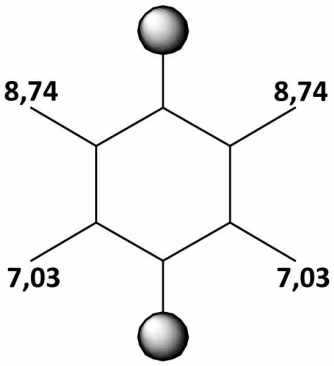
H_2L^{10-}(16/34) 1,2 %



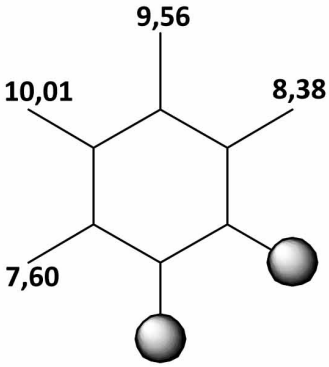
H_2L^{10-}(13) 0 %



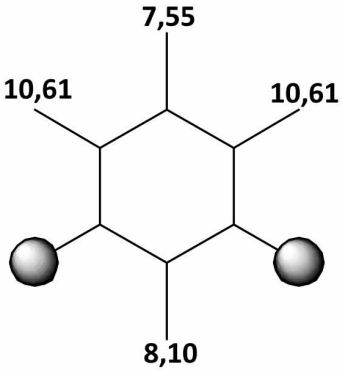
H_2L^{10-}(24/26) 5,4 %



H_2L^{10-}(25) 47 %

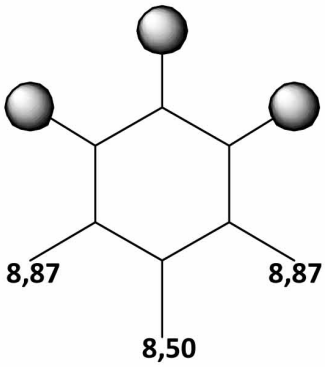


H_2L^{10-}(45/56) 0 %

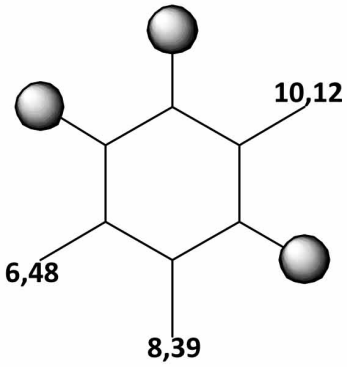


H_2L^{10-}(46) 40 %

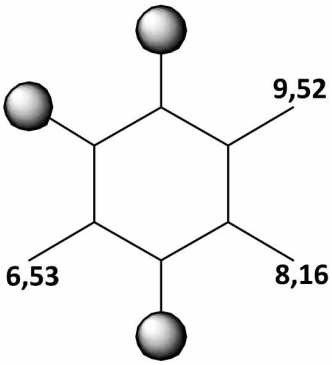
H_3L^{9-}



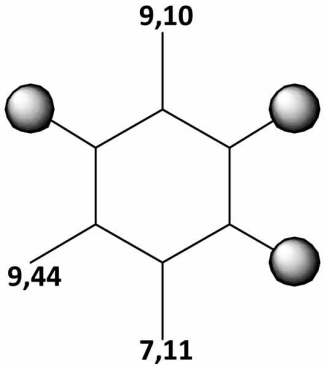
H_3L^{9-}(123) 19,4 %



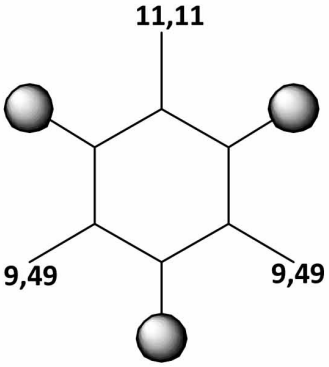
H_3L^{9-}(124/236) 0 %



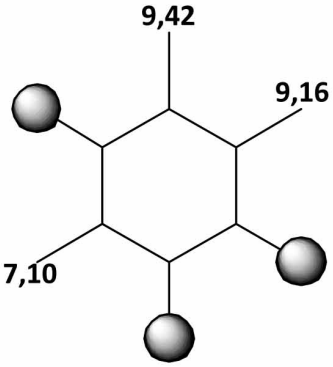
H_3L^{9-}(125/235) 0 %



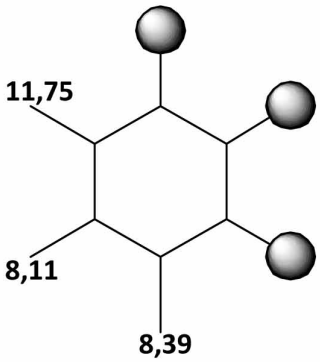
H_3L^{9-}(134/136) 22,8 %



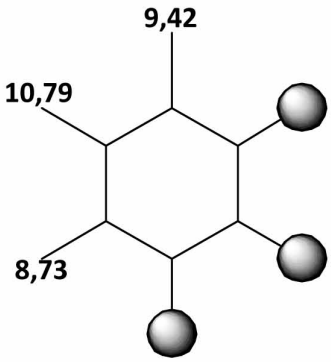
H_3L^{9-}(135) 11 %



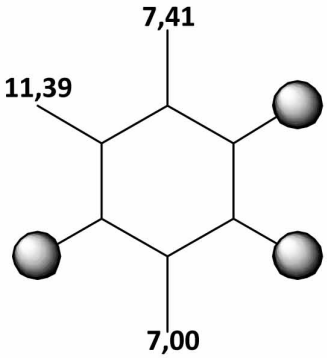
H_3L^{9-}(145/356) 0 %



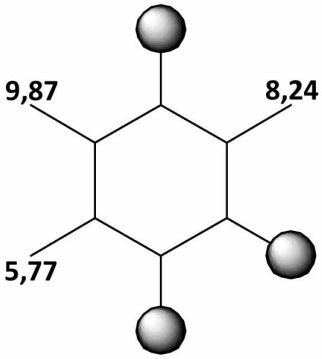
H_3L^{9-}(234/126) 0 %



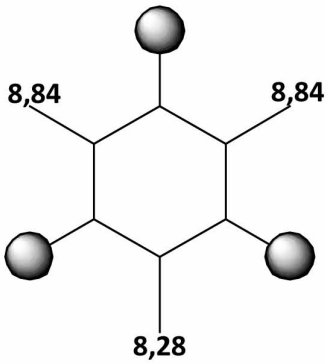
H_3L^{9-}(345/156) 0 %



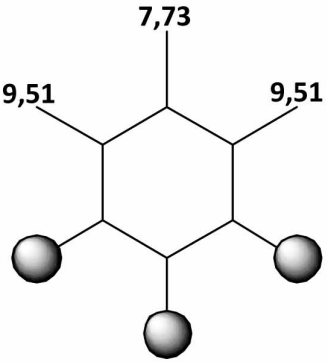
H_3L^{9-}(346/146) 0 %



H_3L^{9-}(245/256) 0 %

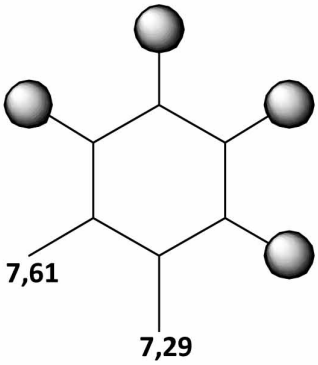


H_3L^{9-}(246) 46,6 %

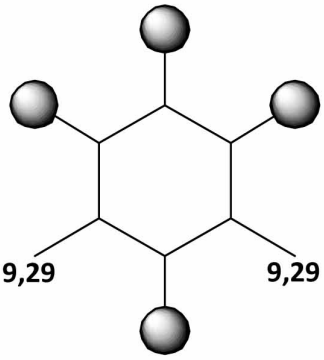


H_3L^{9-}(456) 0 %

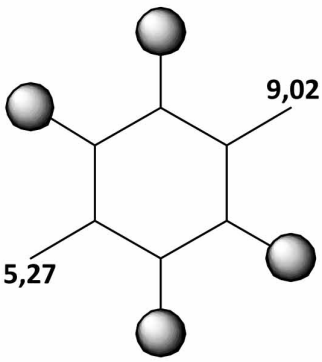
H_4L^{8-}



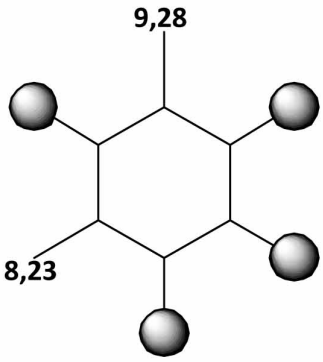
H_4L^{8-}(1234/1236) 38,8 %



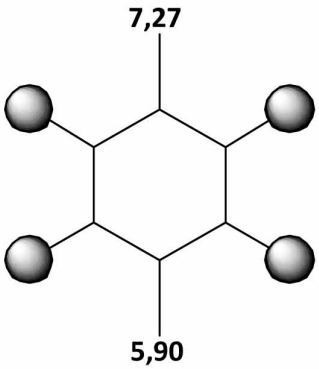
H_4L^{8-}(1235) 0 %



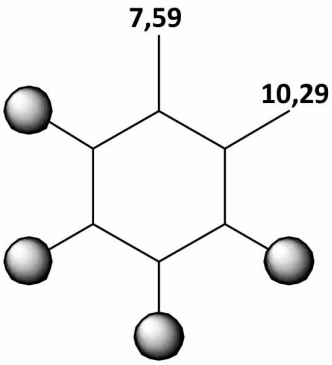
H_4L^{8-}(1245/2356) 0 %



H_4L^{8-}(1345/1356) 0 %



H_4L^{8-}(1346) 41,7 %



H_4L^{8-}(1456/3456) 0 %

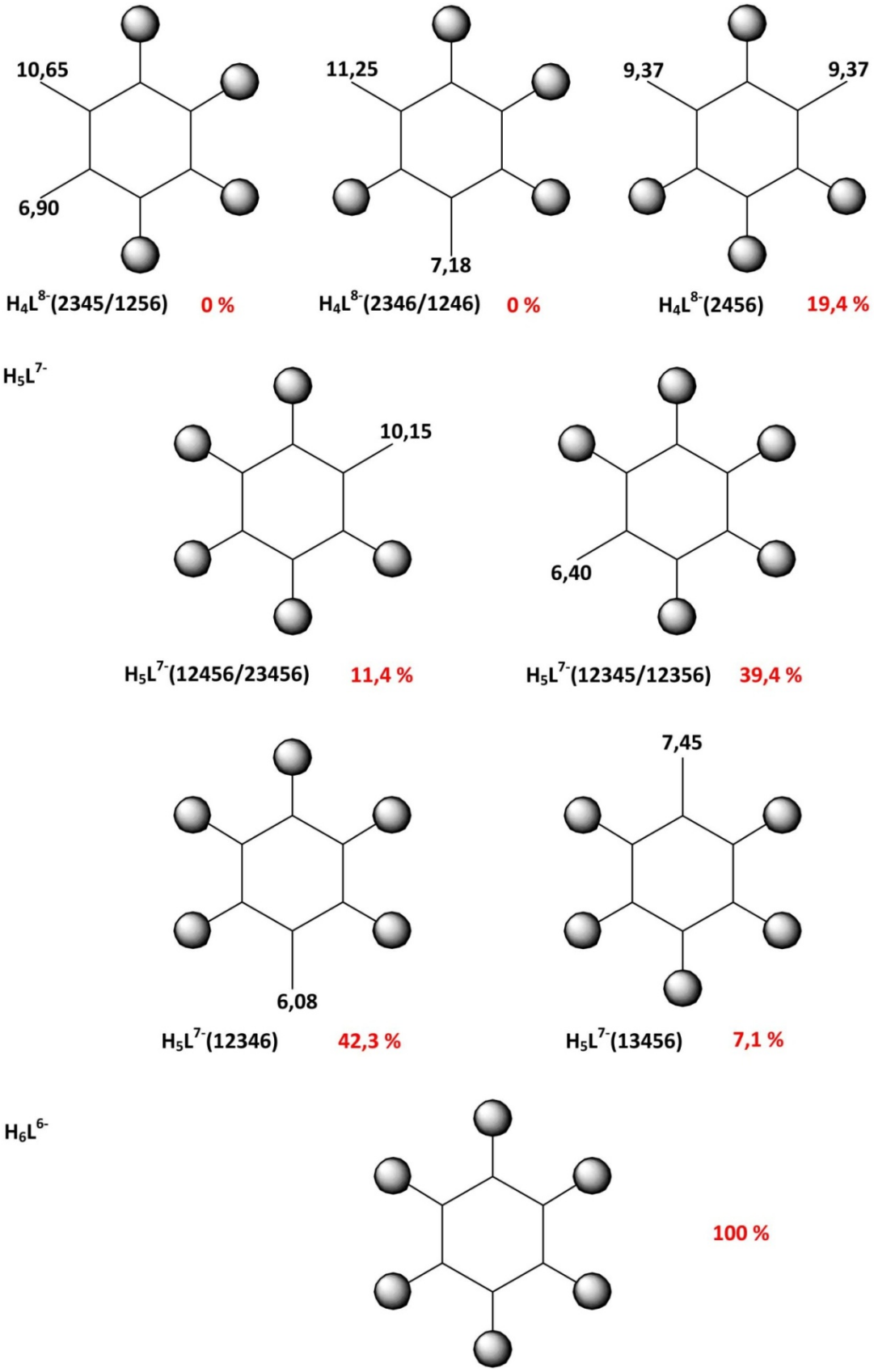


Figura A9. Predominancia y logaritmos de las constantes de deprotonación individuales para los microestados del sistema InsP_6-H^+ (NMe_4Cl 0,15 M a 37,0 ˚C). Los sitios protonados se marcan con círculos grises.

5. Referencias bibliográficas

1. Borkovec, M.; Koper, G. J. M. *Analytical Chemistry* **2000,** *72*, 3272-3279.
2. Mernissi-Arifi, K.; Schmitt, L.; Schlewer, G.; Spiess, B. *Analytical Chemistry* **1995,** *67*, 2567-2574.
3. *Mathematica,* version 5.0; Wolfram Research, Inc.: 2003
4. *Microsoft Office Excel,* version 2007; Microsoft Corporation: 2008

Anexo B

Comportamiento redox del sistema Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+}

Se estudió la variación del potencial e intensidad de pico anódico (E_a, I_a) y catódico (E_c, I_c) con el pH y la velocidad de barrido (v), para la cupla que involucra las especies complejas Ins(1,2,3)P_3-$Fe^{2+/3+}$. Para esto se realizaron los experimentos correspondientes, se deconvolucionaron los voltamperogramas obtenidos y se analizaron los datos respectivos. Los resultados se presentan en la tabla B1 y en las figuras B1 a B4.

Tabla B1. Variación del potencial e intensidad de los picos anódico y catódico de la cupla Ins(1,2,3)P_3-Fe(II)/Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) con la velocidad de barrido y el pH. Las medidas fueron realizadas con un electrodo de Au-*pc*, [Fe(II)] = [Ins(1,2,3)P_3] = 1 mM, en $NaClO_4$ 0,15 M, T = 25 °C, usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

pH	Velocidad de barrido (V/s)	E_a (V)	I_a (µA)	E_c (V)	I_c (µA)
3,0	0,005	---	0,23	---	---
	0,01	---	0,35	0,40	0,21
	0,02	0,47	0,66	0,36	0,46
	0,05	0,46	1,48	0,35	1,24
	0,10	0,43	2,50	---	2,30
5,0	0,005	---	0,18	---	---
	0,01	0,43	0,31	---	0,20
	0,02	0,44	0,55	0,37	0,45
	0,05	0,45	1,25	0,39	1,12
	0,10	---	2,70	0,40	2,30
7,0	0,005	0,36	0,17	---	---
	0,01	0,38	0,28	0,27	0,17
	0,02	0,39	0,47	0,31	0,38
	0,05	0,40	1,05	0,29	0,94
	0,10	0,41	2,00	0,32	1,80
9,0	0,005	0,29	0,14	0,26	0,05
	0,01	0,31	0,23	0,24	0,14
	0,02	0,35	0,42	0,23	0,29
	0,05	0,34	0,89	0,21	0,75
	0,10	0,36	1,60	0,21	1,41

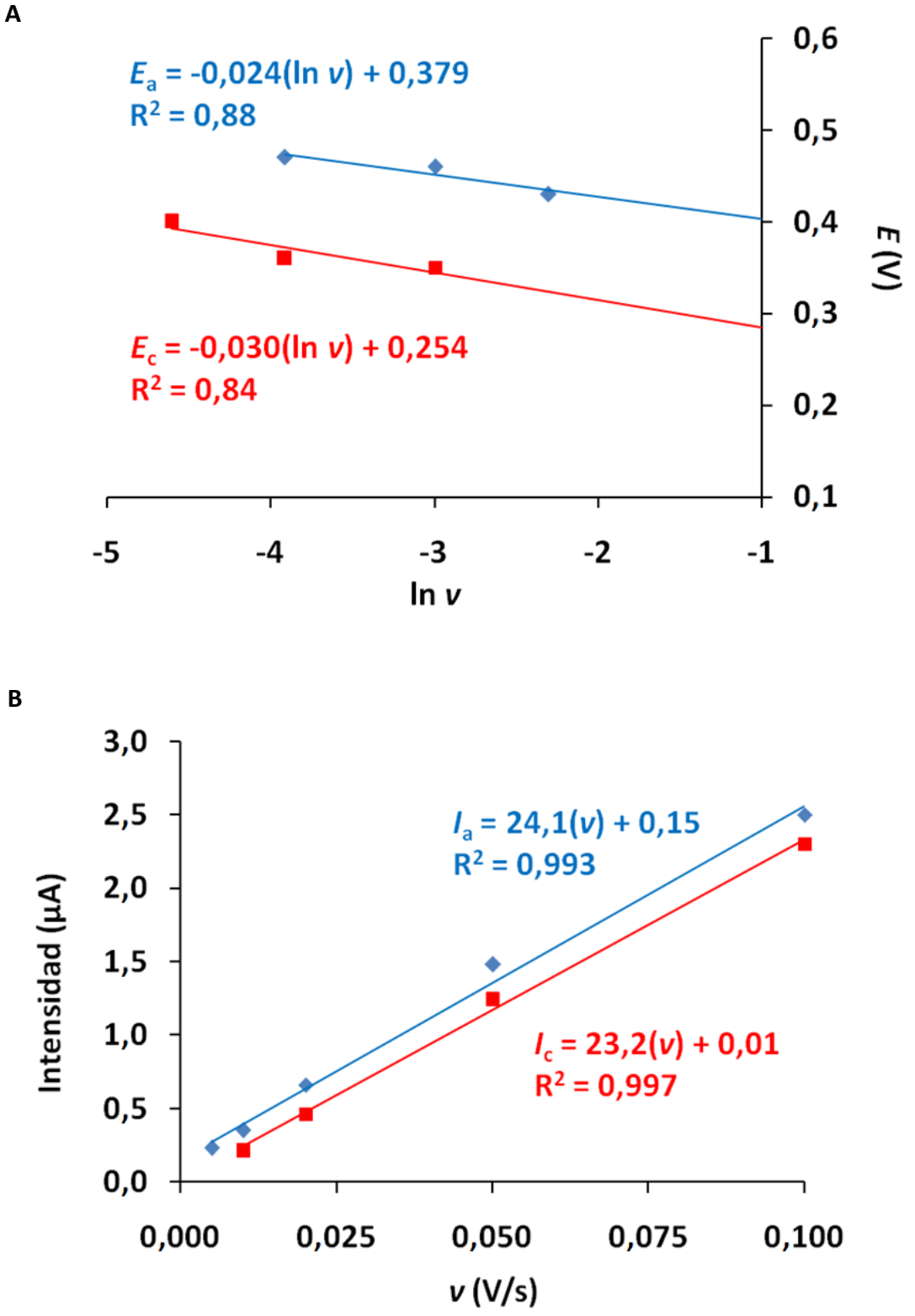
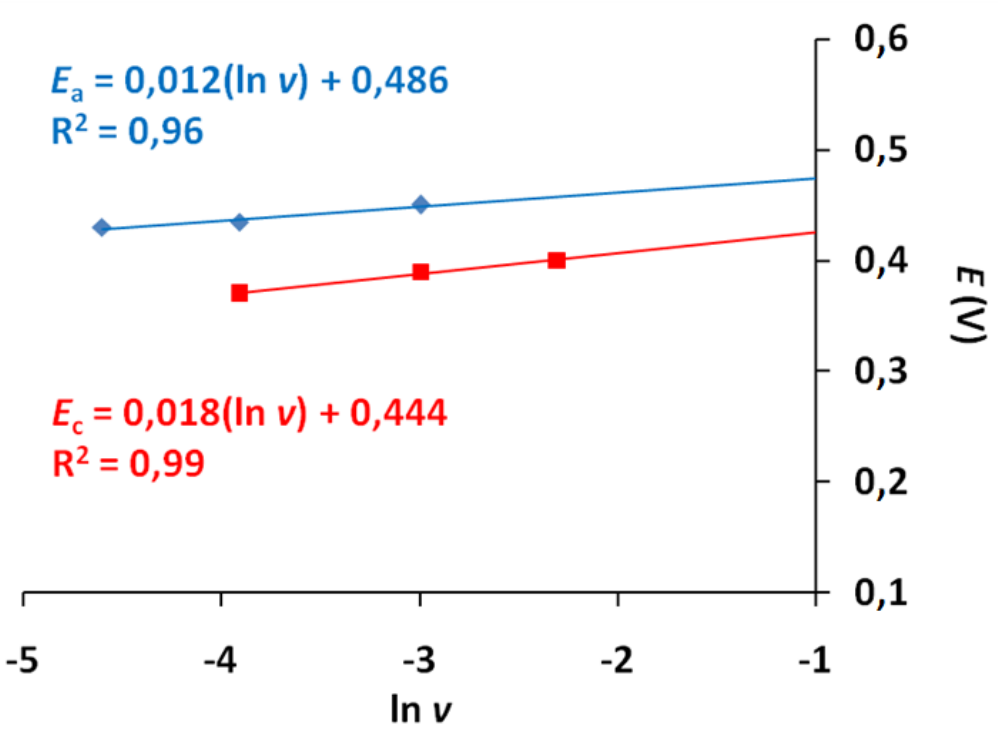


Figura B1. Variación del potencial (A) e intensidad (B) de los picos anódico y catódico de la cupla Ins(1,2,3)P_3-Fe(II)/Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) con la velocidad de barrido (v). Las medidas fueron realizadas a pH = 3, con un electrodo de Au-*pc*, [Fe(II)] = [Ins(1,2,3)P_3] = 1 mM, en $NaClO_4$ 0,15 M, T = 25 °C, usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

A



B

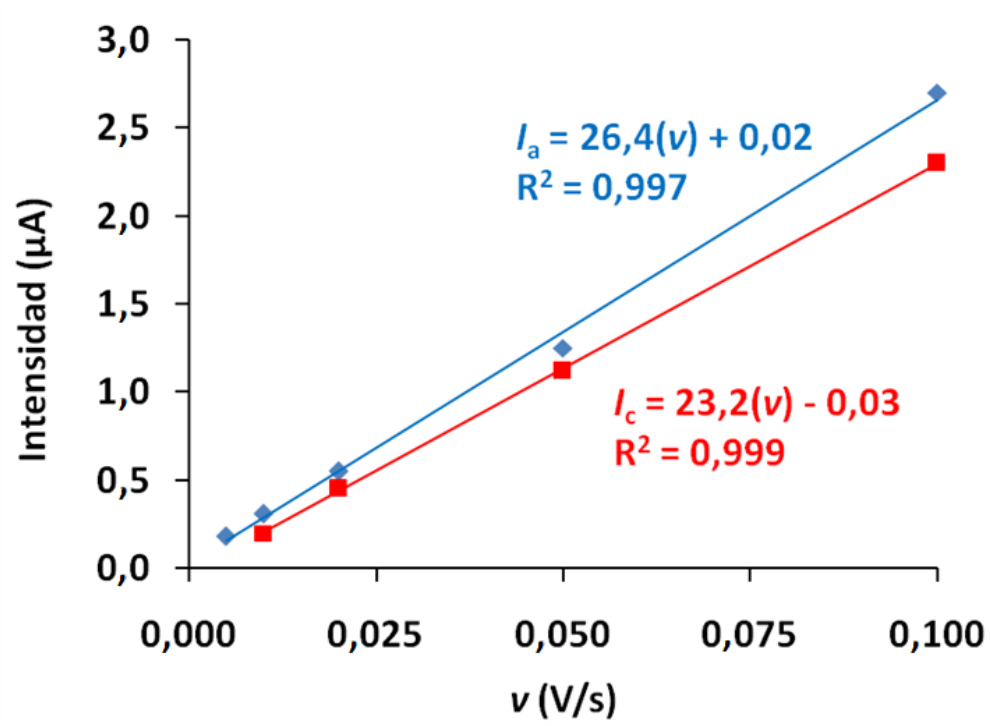
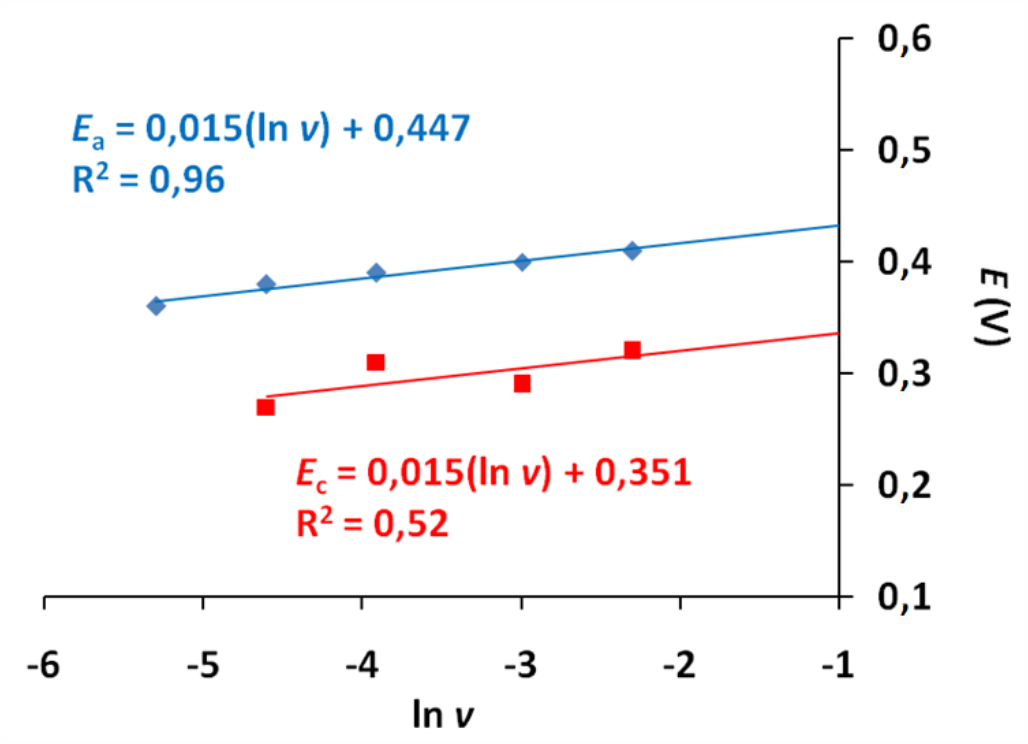


Figura B2. Variación del potencial (A) e intensidad (B) de los picos anódico y catódico de la cupla Ins(1,2,3)P_3-Fe(II)/Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) con la velocidad de barrido (v). Las medidas fueron realizadas a pH = 5, con un electrodo de Au-*pc*, [Fe(II)] = [Ins(1,2,3)P_3] = 1 mM, en $NaClO_4$ 0,15 M, T = 25 °C, usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

A



B

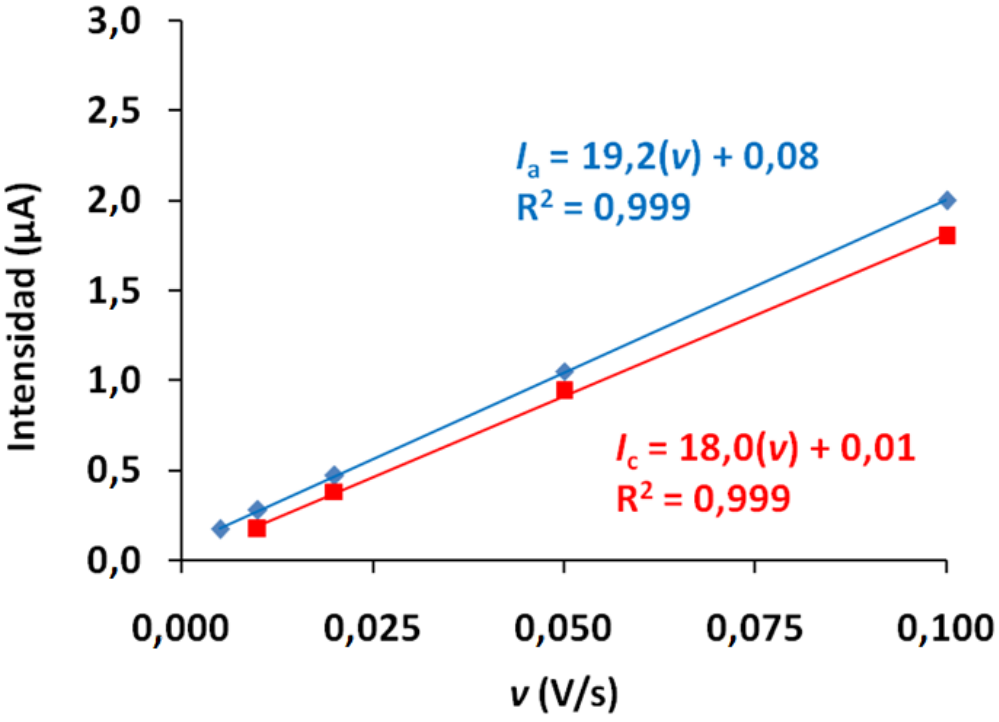


Figura B3. Variación del potencial (A) e intensidad (B) de los picos anódico y catódico de la cupla Ins(1,2,3)P_3-Fe(II)/Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) con la velocidad de barrido (v). Las medidas fueron realizadas a pH = 7, con un electrodo de Au-*pc*, [Fe(II)] = [Ins(1,2,3)P_3] = 1 mM, en $NaClO_4$ 0,15 M, T = 25 °C, usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

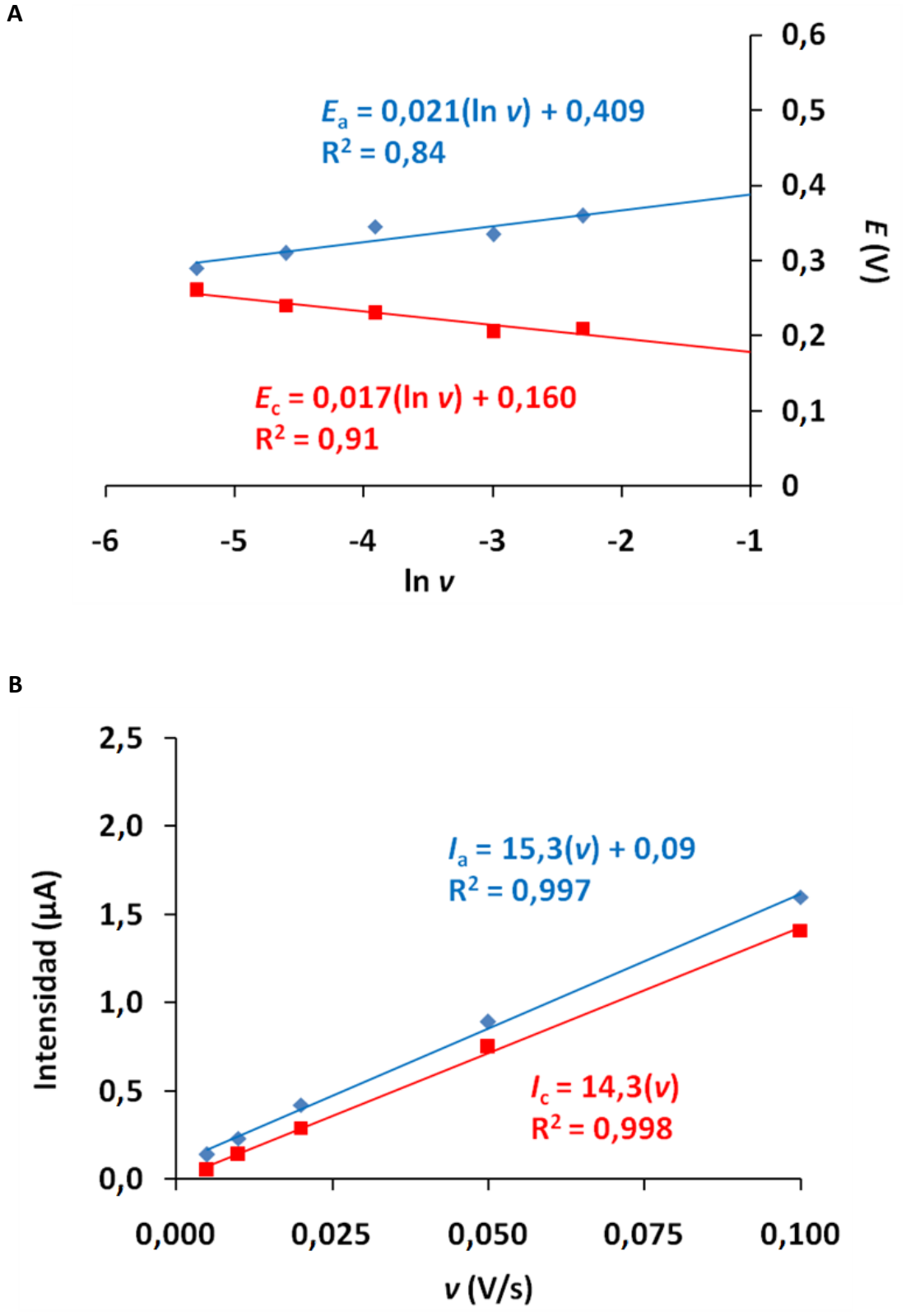


Figura B4. Variación del potencial (A) e intensidad (B) de los picos anódico y catódico de la cupla Ins(1,2,3)P_3-Fe(II)/Ins(1,2,3)P_3-Fe(III) con la velocidad de barrido (v). Las medidas fueron realizadas a pH = 9, con un electrodo de Au-*pc*, [Fe(II)] = [Ins(1,2,3)P_3] = 1 mM, en $NaClO_4$ 0,15 M, T = 25 °C, usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Anexo C

Estudio computacional de la interacción Ins(1,2,3)P_3-Fe^{3+}

1. Especie $[FeL]^{3-}$
   1.1. Conformación 5a1e

Se parte de las geometrías que se muestran en la figura C1, construidas mediante mecánica molecular haciendo uso del campo de fuerza MM+.

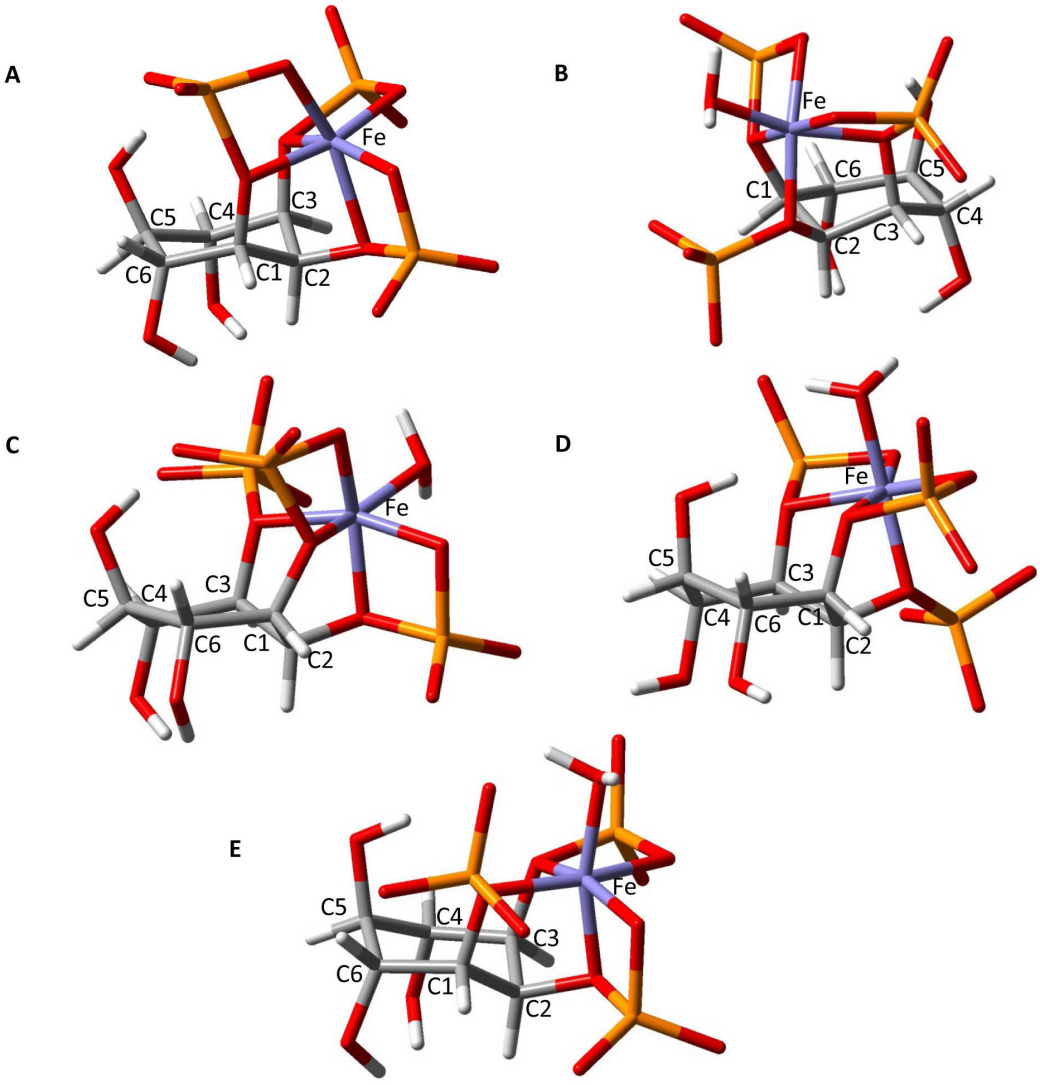


Figura C1. Geometrías iniciales para el estado 5a1e de la especie $[FeL]^{3-}$. Los colores corresponden a distintos tipos de elementos: violeta (Fe), rojo (O), blanco (H), amarillo (P), gris (C).

Se considera, en principio, que los tres grupos fosfato están coordinados al ion metálico por los oxígenos, en concordancia con los resultados espectroscópicos por RMN de ^{31}P. Con el objetivo de sopesar la posibilidad de hidratación del centro metálico, se tienen en cuenta puntos de partida con una molécula de agua de coordinación.

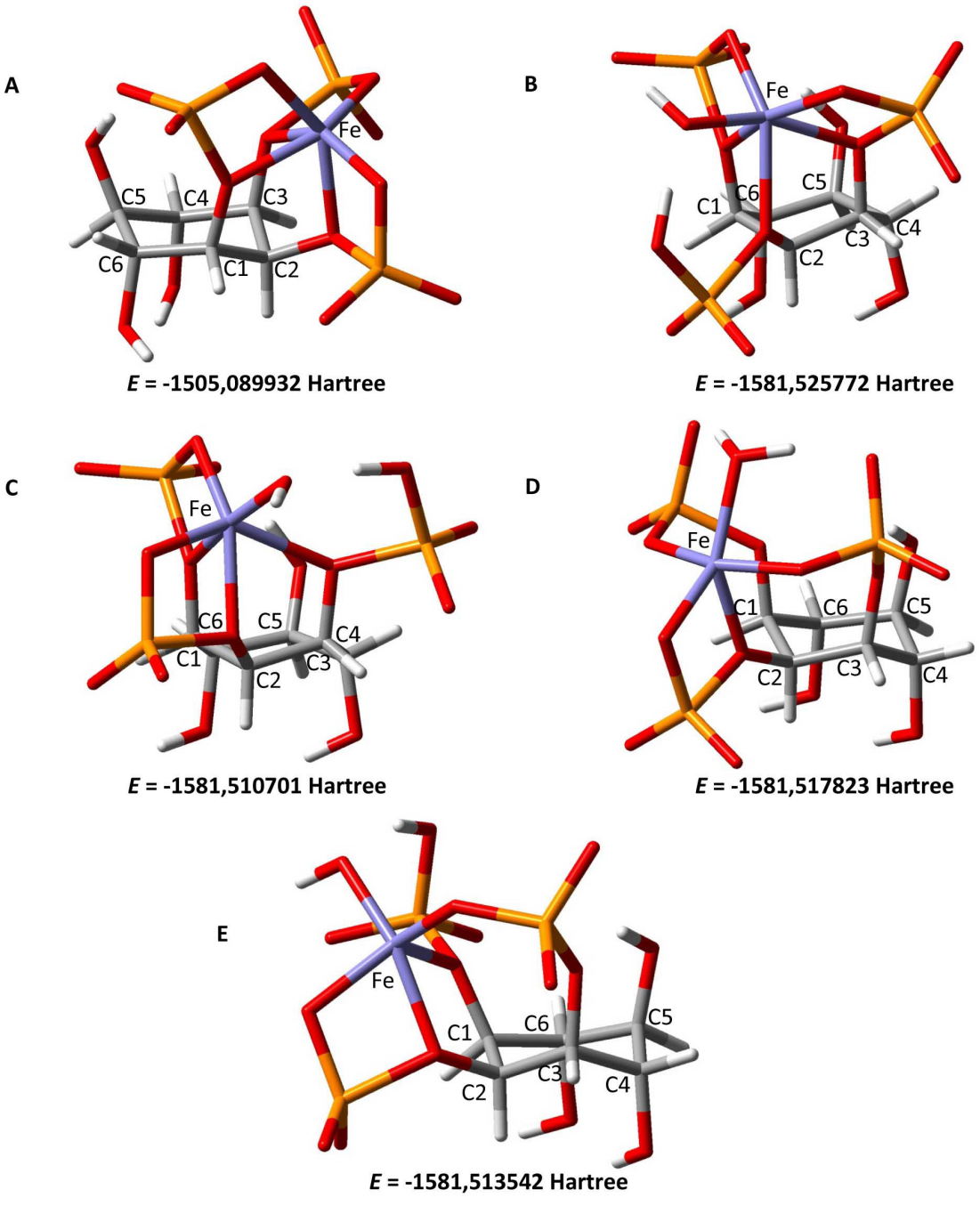


Figura C2. Geometrías UB3LYP/LANL2DZ para el estado 5a1e de la especie $[FeL]^{3-}$. Las soluciones están nombradas según las geometrías iniciales en la figura C1 que les dieron origen. Se detallan asimismo las energías moleculares en hartree para cada una.

Se realiza una optimización de los puntos de partida de la figura C1 mediante el método UB3LYP/LANL2DZ. Por las características del ligando se consideró solamente el estado de alto espín del hierro. Dado que la base LANL2DZ posee potenciales efectivos para la representación de los electrones de core, proporciona una alternativa rápida y confiable para el estudio primario de la superficie de energía potencial de este sistema. Los resultados se resumen en la figura C2, ordenados según las geometrías de partida de la figura C1.

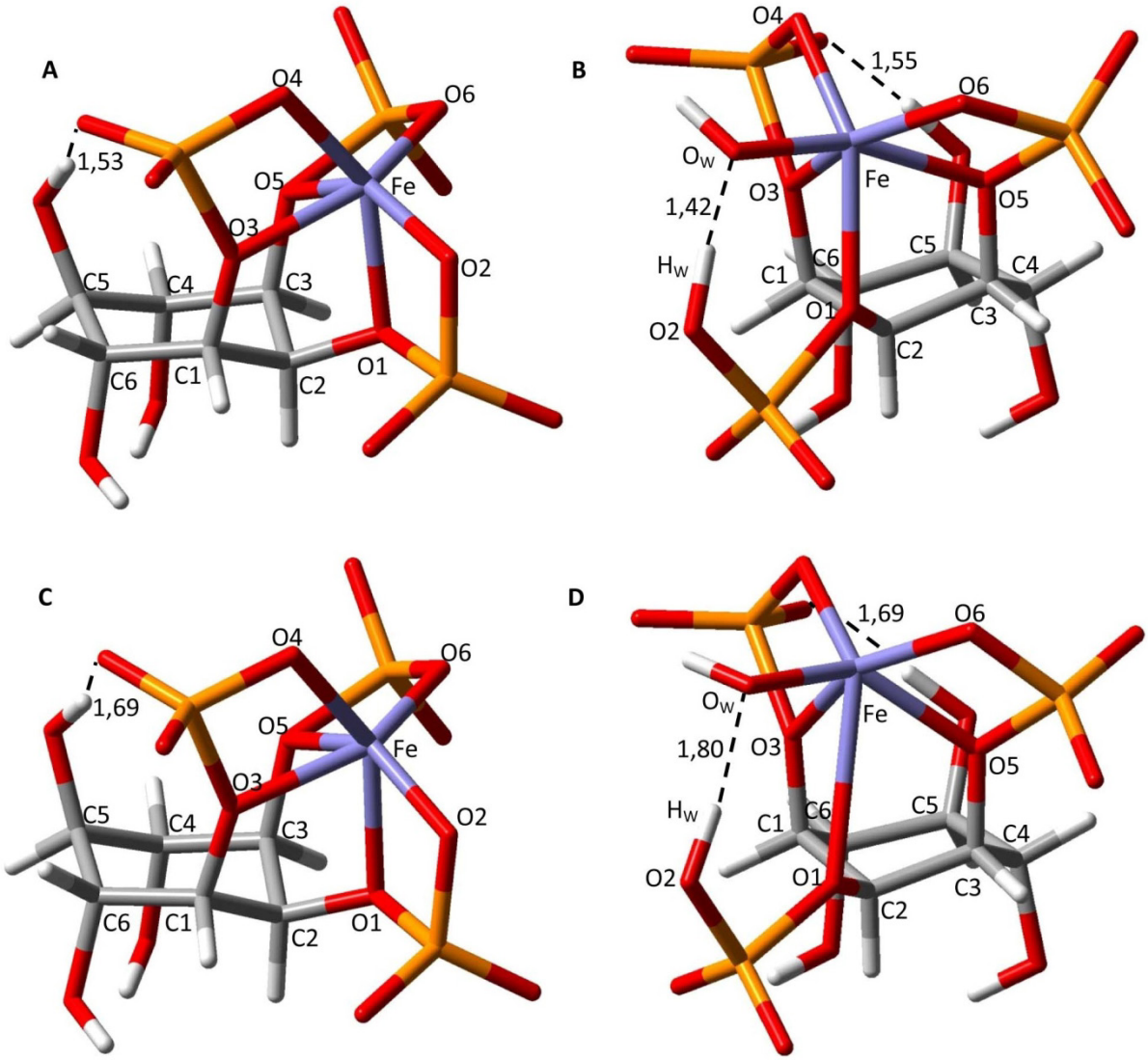


Figura C3. Geometrías más estables para el estado 5a1e de la especie $[FeL]^{3-}$. (A) Geometría UB3LYP/LANL2DZ en fase gaseosa. (B) Geometría UB3LYP/LANL2DZ con una molécula de agua de coordinación. En (C) y (D) se muestran los resultados respectivos con el método UB3LYP/6-31+G*. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se representan mediante líneas discontinuas, con la distancia correspondiente en Å.

Dadas las energías moleculares resultantes, las estructuras más estables para la especie $[FeL]^{3-}$, en fase gaseosa y considerando una molécula de agua de coordinación, resultan ser las correspondientes a las figuras C2A y B. Ambas se muestran en detalle en las figuras C3A y B, donde se indican de forma adicional la asignación de los átomos y algunos parámetros estructurales de relevancia.

Partiendo de estas dos geometrías se refinan las estructuras mediante el método UB3LYP/6-31+G*. Los resultados se detallan en las figuras C3C y D, debajo de las geometrías LANL2DZ análogas. Si se comparan las figuras C3A y C se advierte que en ausencia de moléculas de agua de coordinación existe una variación estructural prácticamente despreciable al mejorar el método de cálculo. De hecho, la distancia de enlace promedio entre el metal y los átomos donores del ligando, D(Fe-X), es muy similar en ambos casos (ver tabla C1). En contraste con lo propuesto por Phillippy y Graf, la geometría del complejo en ausencia de solvente indica un esquema de unión en donde tanto los oxígenos terminales como aquellos asociados al enlace fosfoéster se encuentran involucrados activamente en la coordinación del hierro. Esto resulta en un entorno altamente distorsionado para el centro metálico; las seis distancias Fe-O para la geometría refinada UB3LYP/6-31+G* son: 2,20 Å (Fe-O1), 1,94 Å (Fe-O2), 2,10 Å (Fe-O3), 1,98 Å (Fe-O4), 2,44 Å (Fe-O5) y 1,88 Å (Fe-O6). Los ángulos O1-Fe-X, que dan cuenta de la distorsión de este entorno octaédrico, son: 70,7° (X = O2), 74,7° (X = O3), 144,0° (X = O4), 70,0° (X = O5) y 100,0° (X = O6).

Tabla C1. Distancias promedio (D) para las estructuras optimizadas de la especie $[FeL]^{3-}$. X se refiere a los átomos de oxígeno donores, tanto del ligando como del grupo OH.

	$[FeL(H_2O)_n]^{3-}$	D(Fe-X) (Å)	D(Fe-OH) (Å)
UB3LYP/6-31+G*	n = 0	2,09[a]	---
UB3LYP/LANL2DZ	n = 1	2,08[b]	1,94
UB3LYP/6-31+G*	n = 1	2,16[a] 2,00[b]	1,89

[a] Promedio sobre los seis enlaces Fe-X. [b] Promedio sobre los cinco enlaces Fe-X más cortos.

En presencia de una molécula de agua de coordinación el análisis cambia. En tres de las cuatro geometrías LANL2DZ obtenidas (figuras C2B a E) un grupo hidroxilo aparece unido al centro metálico, dejando al ligando monoprotonado. Al refinar la estructura más estable de este grupo (figura C3B) con la base 6-31+G*, la geometría obtenida (figura C3D) muestra que el poliedro de coordinación cambia levemente. El catión hierro se aleja del átomo O1, cambiando la distancia de enlace correspondiente desde 2,27 a 2,92 Å. Este efecto puede ser racionalizado en base a las funciones difusas contenidas en la base gaussiana, las cuales permiten la existencia de interacciones químicas a distancia. Adicionalmente, este resultado muestra otros dos aspectos estructurales interesantes. En primer lugar el grupo -OH ocupa un volumen que es apreciable, logrando incluso distorsionar levemente el entorno del ion central. Por otra parte, se observa una transferencia protónica entre la molécula de agua de coordinación y el grupo fosfato en C2, la que confiere estabilidad extra por la formación del enlace de hidrógeno O_w...H_wO2 (figura C3D). La distancia de este enlace es 1,80 Å, mientras que los ángulos O2-H_w...O_w y H_w...O_w-Fe son 176,9° y 115,3° respectivamente.

La distancia media Fe-X para esta especie al nivel UB3LYP/LANL2DZ es la misma que la obtenida para el complejo anhidro (2,08 Å, ver tabla C1). Sin embargo, para la geometría 6-31+G* el valor de este parámetro aumenta moderadamente (2,16 Å), debido a la alteración estructural que circunda al ion Fe^{3+}. Tomando en cuenta sólo los cinco enlaces metal-ligando más cortos, el valor de D(Fe-X) se reduce a 2,00 Å, menor incluso que los valores hasta aquí analizados. Esto demuestra que el incremento en la distancia Fe-O1 permite al resto de los átomos donores acercarse al catión central, uniéndose de manera más efectiva. Más aún, el grupo OH^- está ahora 0,05 Å más cerca del hierro que en la geometría LANL2DZ.

Finalmente, utilizando los valores absolutos de la energía libre de Gibbs para las geometrías anteriores es posible determinar el ΔG de la reacción de adición de una molécula de agua en fase gaseosa (ecuación 1). Los resultados predicen que el proceso es espontáneo, con un valor de ΔG de -17,4 kcal/mol (LANL2DZ) y -11,4 kcal/mol (6-31+G*).

$$[FeL]^{3-} + H_2O \rightarrow [FeL(H_2O)]^{3-} \qquad (1)$$

Esta molécula de agua que se adiciona interacciona fuertemente con el centro metálico, se deprotona y da lugar a un grupo OH^- unido directamente al hierro. En suma, se desprende de este análisis teórico que la geometría que mejor representa a la especie $[FeL]^{3-}$ es la expuesta en la figura C3D.

1.2. Conformación 1a5e

Como se ha discutido varias veces en este trabajo de tesis, la conformación más estable del ligando, 1a5e, posee menor capacidad de formar "cajas negativas" que envuelvan al ion metálico. Por tanto, las geometrías obtenidas son más "abiertas", es decir, dejan más posiciones de coordinación libres para la entrada de moléculas del solvente. En efecto, a diferencia de lo que ocurría con la conformación 5a1e de la especie $[FeL]^{3-}$, en este caso no se logra optimizar estructura alguna que contenga al hierro en un entorno octaédrico en ausencia de moléculas de agua. Por esto, se plantea un modelo inicial discreto conteniendo dos y tres moléculas de agua, de forma de satisfacer la esfera de coordinación del átomo central. En las figuras C4A a C se detallan las tres geometrías de partida para este sistema, las cuales fueron diseñadas mediante mecánica molecular (MM+) de forma de cubrir diferentes posibilidades de coordinación e hidratación. La exploración de la superficie de energía potencial a partir de estos puntos se realizó primeramente haciendo uso del método UB3LYP/LANL2DZ. Los resultados se detallan en las figuras C4D a G.

De las soluciones obtenidas, la correspondiente a la figura C4D debe descartarse en principio, ya que sólo participan del enlace dos de los tres fosfatos. Esta configuración abierta, además de ser energéticamente menos favorable respecto de la coordinación del tipo Fe(III)-(P1/P2/P3), no es coherente con la capacidad inhibitoria de la producción de radicales libres que muestra el Ins(1,2,3)P_3. De hecho, este tipo de coordinación es compatible con lo reportado para el ligando Ins(1,2)P_2, el cual potencia la citotoxicidad redox del hierro [1].

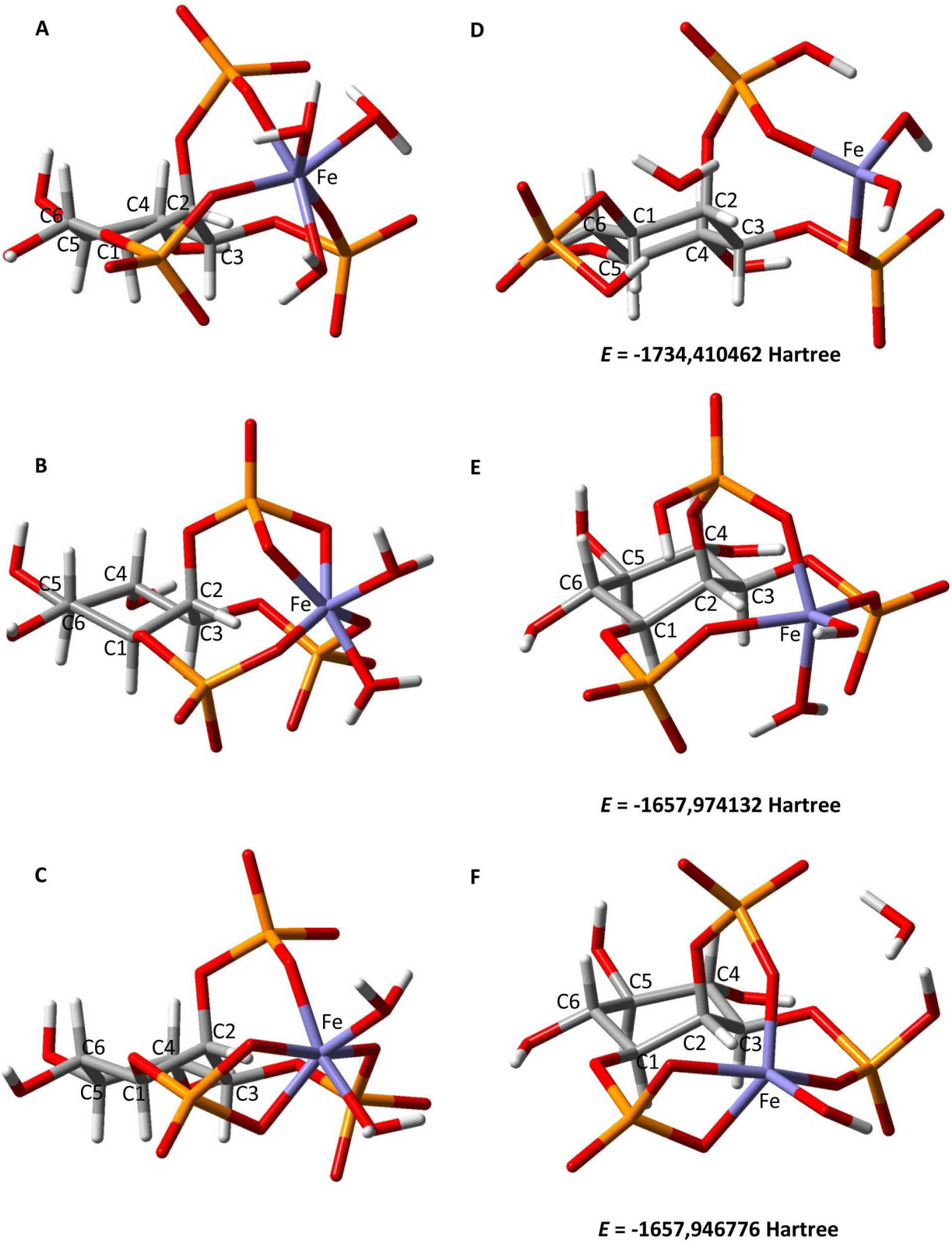


Figura C4. Geometrías iniciales para el estado 1a5e de la especie $[FeL]^{3-}$ conteniendo tres (A) y dos (B y C) aguas de coordinación. En (D), (E) y (F) se muestran las estructuras respectivas optimizadas al nivel UB3LYP/LANL2DZ, con sus energías moleculares en hartree.

De las geometrías optimizadas restantes, las energías moleculares marcan una preferencia energética hacia la unión de dos moléculas de agua de coordinación (figura C4F). Partiendo de esta estructura, se optimiza el sistema bajo el método UB3LYP/6-31+G*, dando como resultado la geometría de la figura C5A. Si se elimina una molécula de agua en la geometría de la figura C4G y se optimiza el sistema bajo el mismo método, se obtiene el resultado que se detalla en la figura C5B, el cual brinda idea aproximada de la estructura del complejo $[FeL]^{3-}$ en presencia de una única molécula de agua de coordinación. Esta variante, aunque menos estable, es posible que tenga existencia real en el marco de la dinámica de la solución.

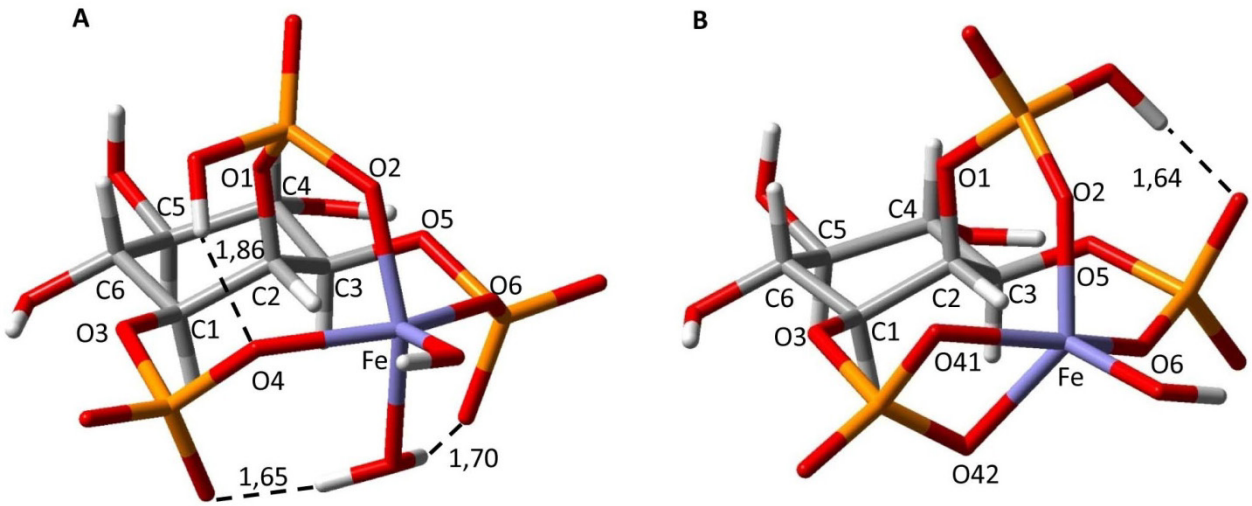


Figura C5. Geometrías UB3LYP/6-31+G* más estables para el estado 1a5e de la especie $[FeL]^{3-}$ en presencia de dos (A) y una (B) moléculas de aguas de coordinación. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se representan mediante líneas discontinuas, con la distancia correspondiente en Å.

A partir de la consideración de la energía libre de esta última geometría y la de la correspondiente a la figura C3D, es posible dar un valor estimativo del ΔG del cambio conformacional para esta especie compleja (reacción 2).

$$(1a5e)\ [FeL(H_2O)]^{3-} \rightarrow (5a1e)\ [FeL(H_2O)]^{3-} \qquad (2)$$

El valor obtenido, 1,73 kcal/mol, es bastante cercano a cero. Es útil comparar este valor con el correspondiente al mismo cambio conformacional pero en ausencia de metal. Para esto se optimizaron las geometrías de la especie L^{6-} bajo el mismo método (RB3LYP/6-31+G*) y se computaron los valores de energía libre de Gibbs para ambos confórmeros (no se muestran los resultados). El valor de Δ*G* derivado, 33,63 kcal/mol, es notoriamente mayor que el correspondiente a la reacción 2, lo que verifica que la unión del ion Fe^{3+} favorece dramáticamente el estado 5a1e del ligando. Este fenómeno se corroboró, de hecho, a nivel experimental [2,3].

2. Especie $[FeL(OH)]^{4-}$

Para el análisis computacional de este sistema se parte de geometrías iniciales construidas por la deprotonación de aquellas más estables para $[FeL]^{3-}$ (figuras C3D y C5A). En las figuras C6A y B se muestran las estructuras optimizadas para ambos estados conformacionales de la especie $[FeL(OH)]^{4-}$ al nivel UB3LYP/6-31+G*.

A partir de estas soluciones es impracticable determinar el valor de cambio en la energía libre de Gibbs asociado al proceso de transición conformacional, ya que ambas geometrías poseen distinto número de aguas de coordinación. Para sortear este obstáculo es necesario adicionar, a la conformación 5a1e (figura C6A), una molécula de agua más, que se coordine directamente al centro metálico. El resultado del proceso de optimización de este estado inicial (no se muestra), bajo el mismo método de trabajo (UB3LYP/6-31+G*), se expone en la figura C6C. A partir de esta misma geometría y la correspondiente a la figura C6B se estima el valor de Δ*G* para la reacción 3, que representa el proceso de cambio conformacional para la especie $[FeL(OH)]^{4-}$:

$$(1a5e)\ [FeL(OH)(H_2O)]^{4-} \rightarrow (5a1e)\ [FeL(OH)(H_2O)]^{4-} \qquad (3)$$

El resultado, -9,41 kcal/mol, indica que el estado axial es el preferido desde un punto de vista energético, invirtiendo el orden observado para el ligando.

Nuevamente, este fenómeno está de acuerdo con los resultados empíricos del análisis conformacional de este inositol fosfato en presencia de hierro(III) [2,3].

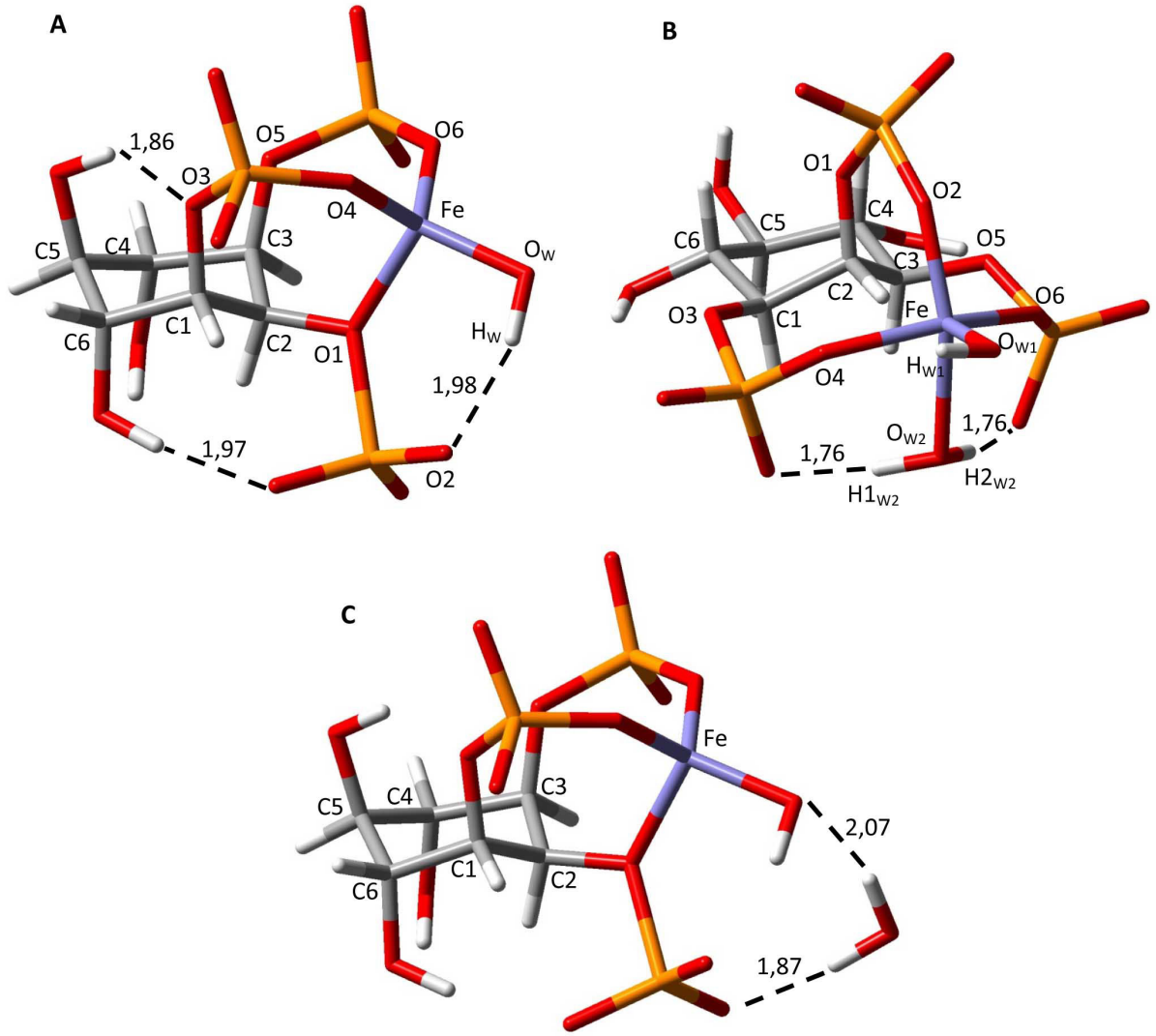


Figura C6. Geometrías UB3LYP/6-31+G* más estables para la especie $[FeL(OH)]^{4-}$ en el estado 5a1e (A) y 1a5e (B). En (C) se muestra la estructura de (A) optimizada en presencia de una molécula de agua adicional. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares más relevantes se representan mediante líneas discontinuas, con la distancia correspondiente en Å.

3. Referencias bibliográficas.

1. Spiers, I. D.; Barker, C. J.; Chung, S. K.; Chang, Y. T.; Freeman, S.; Gardiner, J. M.; Hirst, P. H.; Lambert, P. A.; Michell, R. H.; Poyner, D. R.; Schwalbe, C. H.; Smith, A. W.; Solomons, K. R. H. *Carbohydrate Research* **1996,** *282*, 81-99.
2. Mansell, D.; Rattray, N.; Etchells, L. L.; Schwalbe, C. H.; Blake, A. J.; Bichenkova, E. V.; Bryce, R. A.; Barker, C. J.; Díaz, A.; Kremer, C.; Freeman, S. *Chemical Communications* **2008,** 5161-5163.
3. Mansell, D.; Rattray, N.; Etchells, L. L.; Schwalbe, C. H.; Blake, A. J.; Torres, J.; Kremer, C.; Bichenkova, E. V.; Barker, C. J.; Freeman, S. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2010,** *8*, 2850-2858.

Anexo D

Estudios de *docking* de los sistemas Scn-sideróforo aromático-Fe(III)

1. Validación de la técnica: *redocking*

Para el sistema Fe(III)-Ent-Scn se obtienen 20 soluciones correspondientes a diferentes disposiciones del sustrato en el sitio activo. Todas se encuentran dentro de un RMSD de 2,63 Å. En efecto, como se observa en la figura D1A, las 10 soluciones con mayor *goldscore fitness* son muy similares. Los tres anillos aromáticos se encuentran aproximadamente en la misma dirección para todas las estructuras, provocando que el átomo metálico prácticamente no varíe su posición. Haciendo un análisis exhaustivo de las diversas soluciones, se considera como mejor opción aquella que optimiza el indicador *goldscore fitness* y al mismo tiempo minimiza el cambio en la energía libre de unión dada por la función *chemscore*. El ajuste de esta solución con la estructura del sustrato cristalizado en el sitio activo de la enzima es satisfactorio (figura D1B).

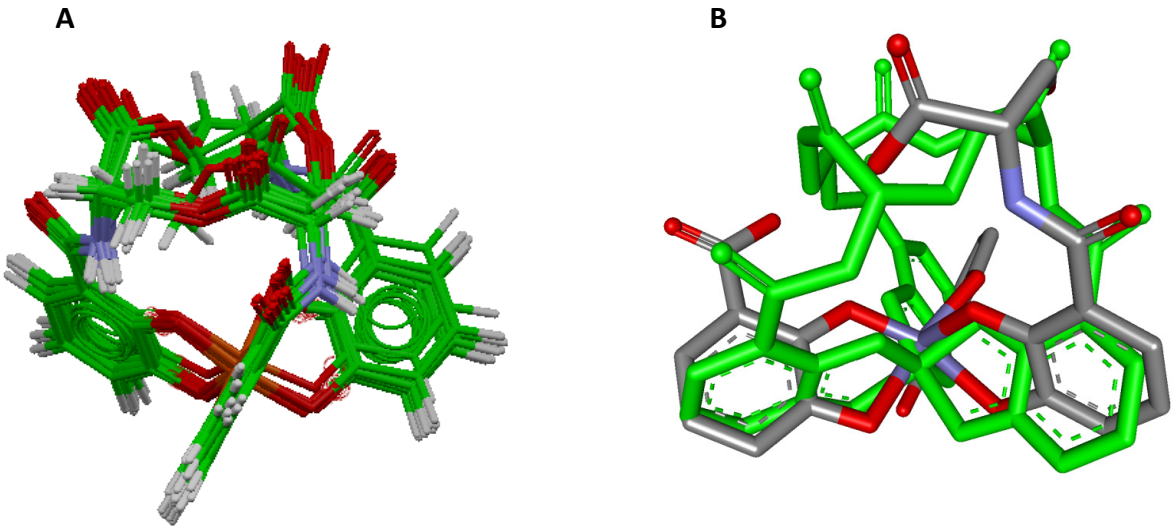


Figura D1. (A) Superposición de las 10 mejores soluciones del *docking* del sistema Scn-Ent-Fe(III). (B) Superposición del mejor resultado del *docking* del sistema Scn-Ent-Fe(III) (en verde) con la estructura del sustrato cristalizado en el sitio activo.

De la misma manera que ha sido reportado para sistemas similares, la enterobactina se descompone en fracciones menores durante la cristalización del aducto. En consecuencia, en el sitio activo el ion metálico se encuentra rodeado por dos moléculas de ácido 2,3-hidroxibenzoico (2,3-DHBA) y una molécula de 2,3-dihidroxibenzoilserina (2,3-DHBS) (figura D1B). La técnica de *docking* aporta en estos casos, por tanto, una visión espacial del complejo proteína-sustrato en solución, del cual no existen datos estructurales.

Las interacciones que estos cálculos predicen entre el complejo $[Fe(Ent)]^{3-}$ y los aminoácidos del sitio activo son compatibles con las ya reportadas en bibliografía [1]. Como se advierte en las figuras D2A y B, el complejo se dispone con los tres anillos aromáticos hacia el centro del sitio activo, donde es anclado por algunos residuos catiónicos. Un análisis pormenorizado de las interacciones que operan sobre el sustrato, revela que la siderocalina une al complejo sideróforo-hierro mediante la intercalación de la carga positiva de dos cadenas de lisina (Lys 125 y Lys 134) y una de arginina (Arg 81), entre dos pares de anillos de catecol del ligando. Este arreglo se estabiliza tanto por interacciones electrostáticas alternadas de tipo catión-densidad electrónica π, como por enlaces de hidrógeno establecidos entre los grupos amino terminal y algunos átomos de oxígeno del sustrato. Adicionalmente, un tercer residuo, Tyr 106, se acopla al sustrato desde abajo, uniéndose a través de enlaces de hidrogeno entre el grupo OH aminoacídico y los oxígenos metafenólicos de los grupos catecol. En una esfera más externa, existen aminoácidos que soportan y asisten esta estructura. El Trp 79 establece interacciones densidad electrónica π-densidad electrónica π de largo alcance con uno de los anillos aromáticos del ligando. Además, mediante una asociación densidad electrónica π – dipolo, el residuo Phe 123 (no se muestra) asiste a la Lys 134, estabilizándola en esa posición, la cual es crucial a la hora de direccionar y retener al sustrato en el sitio activo.

Resulta interesante analizar, en esta misma línea, la unión de la apo-enterobactina a la Scn. En ausencia de hierro, las soluciones de los cálculos de *docking* presentan una variación estructural entre sí bastante importante. El RMSD de los resultados aumenta de 2,63 Å en presencia de hierro, a 8,74 Å en ausencia del mismo. Es factible, por tanto, que una de las funciones del hierro

en estos sistemas sea reducir los grados de libertad, hacia estados conformacionales que mejoren la interacción del sustrato con los aminoácidos del sitio activo. De acuerdo con esto, el Δ*G* estimado del proceso de unión a la Scn es sustancialmente menor para el complejo Fe(III)-Ent que para la apo-Ent (-40,2 kJ/mol frente a -29,6 kJ/mol).

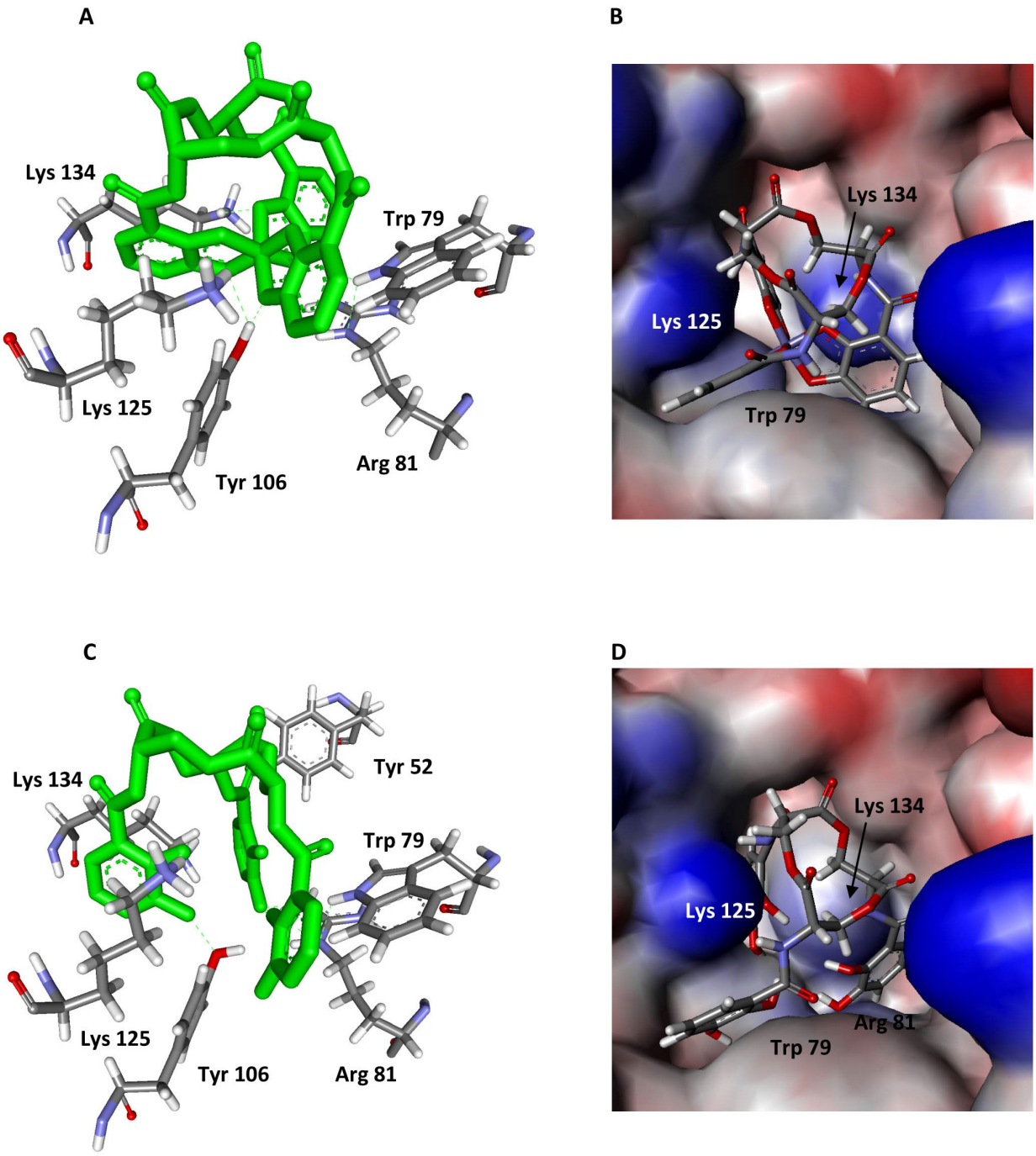


Figura D2. Vista esquemática de las interacciones del sustrato con el sitio activo para el complejo Ent-Fe (A) y la Ent (C). (B) y (D) muestran el acople de estos sustratos al sitio activo.

En la figura D3 se muestra el ajuste de la solución que maximiza el *goldscore fitness* y el cambio en la energía libre unión, con la estructura del ligando cristalizado. De la misma manera que se mencionó para el complejo Ent-hierro, el ligando se descompone en productos menores durante el proceso de cristalización del aducto, por lo que no se tienen datos sobre su disposición específica en el sitio activo. A partir del estudio de *docking* de este sistema se logra tener una imagen del esquema de asociación de la enterobactina a la Scn en solución.

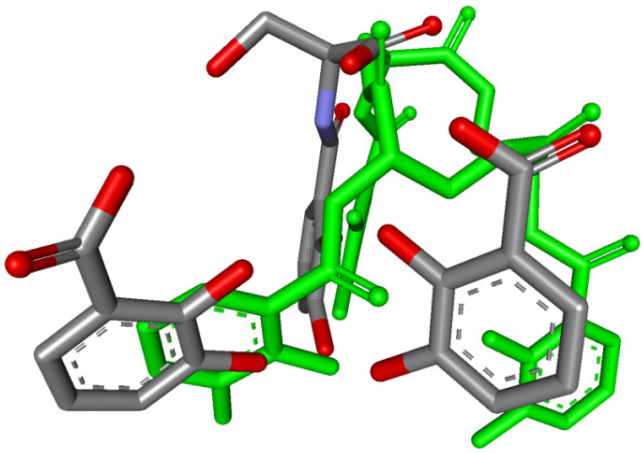


Figura D3. Superposición del mejor resultado del *docking* del sistema Scn-Ent (en verde) con la estructura del sustrato cristalizado en el sitio activo.

Aunque los anillos aromáticos se predicen teóricamente en posiciones similares a las determinadas experimentalmente, el acuerdo con la estructura cristalina es un poco menos satisfactorio respecto del analizado para el complejo $[Fe(Ent)]^{3-}$. La conformación calculada del sustrato es más abierta que la de los fragmentos cristalizados. Esto estaría indicando que el anillo de trilactona (corona) fuerza a los anillos de catecol a estar más lejos entre sí, y por tanto éstos no son capaces de optimizar las interacciones con los residuos aminoacídicos adyacentes. Es así que, al cristalizar, la corona se descompone liberando los anillos aromáticos, los cuales se acercan entre sí para llenar cada uno de los tres lóbulos del sitio activo. En consecuencia, es muy probable que el anillo de trilactona contribuya a la efectividad de la enterobactina como

sideróforo asociado a la siderocalina, ya que en ausencia de hierro provoca una disminución apreciable en la afinidad proteína-sustrato.

Las figuras D2C y D muestran la unión de la apo-enterobactina a la Scn. El esquema general de asociación es similar al del complejo con hierro, aunque se observa que el apartamiento de los anillos aromáticos provoca una disminución en las interacciones con los residuos aminoacídicos. De hecho, debido a repulsiones estéricas, la Lys 134 se retrae levemente, dando paso al sustrato. En ausencia de hierro, una de las cadenas de la enterobactina se estira hacia atrás e interacciona con el Trp 79, lo cual está de acuerdo con el *quenching* que sufre la fluorescencia de este aminoácido en presencia del sideróforo [1].

El estudio del sistema siderocalina-catecol-hierro resulta un poco más complejo, debido a que existen varias especies que pueden interaccionar con la proteína en diversas relaciones molares. En principio, además del ligando, el cual podría formar un aducto en relación 1:1 a 3:1 catecol-Scn, se tienen las tres especies complejas detectadas en solución: $[Fe(Catecol)]^{+}$, $[Fe(Catecol)_2]^{-}$ y $[Fe(Catecol)_3]^{3-}$. Según se ha logrado establecer, el complejo que se une al sitio activo es, en última instancia, el tris-catecol, el cual se descompone en las condiciones de cristalización [2]. El análisis de *docking* de este sistema arroja 20 soluciones que se encuentran dentro de un RMSD de 4,62 Å. Si se superponen las 10 mejores soluciones se observa que existen algunas variaciones en la disposición de los anillos de catecol (figura D4A), aunque se reconocen, como en el sistema Ent-Scn, tres zonas donde los mismos prefieren ubicarse. De nuevo se elige como solución final aquella que optimiza el *goldscore fitness* y minimiza el cambio en la energía libre de unión. Según la figura D4B, el ajuste de la misma con la disposición del fragmento de complejo cristalizado en el sitio activo resulta satisfactorio.

Las interacciones que mantienen unido el complejo catecol-hierro a la Scn se muestran esquemáticamente en las figuras D5A y B. El perfil de acople del sustrato es muy similar al del complejo Fe-enterobactina, siendo los residuos que participan en la unión los mismos que ya se discutieron para ese sistema. Asimismo, nuevamente los anillos aromáticos se ubican ocupando el espacio de cada uno de los tres lóbulos que conforman el sitio activo de la siderocalina. Bao y sus colaboradores han logrado caracterizar además el mecanismo por el

cual el complejo catecol-hierro se ancla a la proteína [2]. Inicialmente, una molécula de $[Fe(Catecol)_2]^-$ interacciona con los residuos del sitio activo, se une al mismo y por último un anillo de catecol se acopla cubriendo los dos sitios de coordinación restantes del ion metálico.

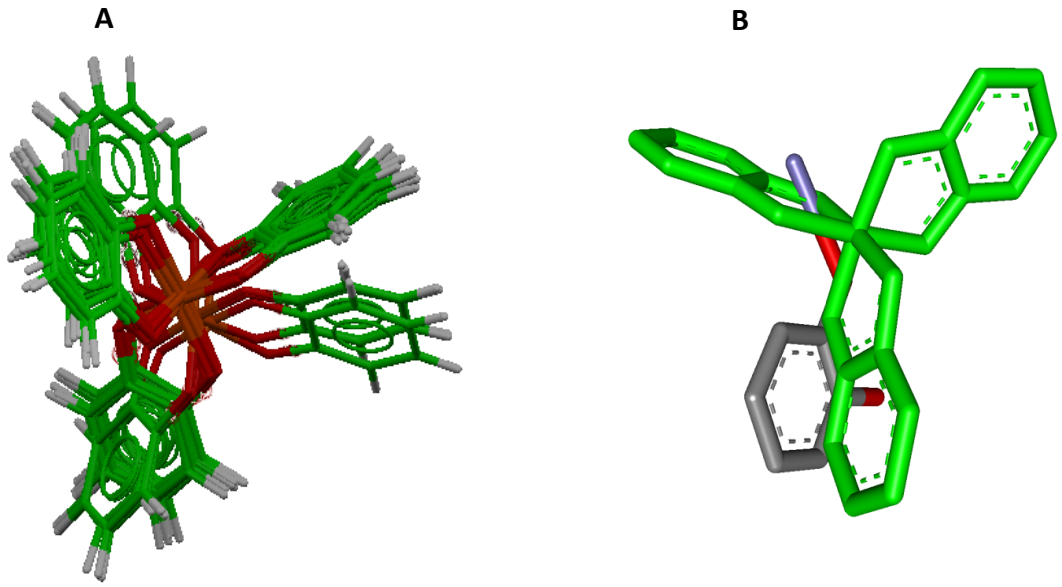


Figura D4. (A) Superposición de las 10 mejores soluciones del *docking* del sistema Scn-catecol-Fe(III). (B) Superposición del mejor resultado del *docking* del sistema Scn-catecol-Fe(III) (en verde) con la estructura del sustrato cristalizado en el sitio activo.

En este sentido, resulta interesante por tanto modelar el aducto Scn-$[Fe(Catecol)_2]^-$. Utilizando como sustrato el complejo $[Fe(Catecol)_2(H_2O)_2]^-$, los resultados de detallan en la figura D5C y D. La interacción con los aminoácidos es muy similar a la del complejo tris-catecol. En ambos casos, uno de los anillos interacciona directamente con el Trp 79, explicando la importante disminución en la intensidad de la fluorescencia de este residuo, reportada luego de la unión del sustrato [2].

La comparación con el sistema $[Fe(Catecol)_3]^{3-}$-Scn, sugiere que no todos los lóbulos del sitio activo poseen la misma afinidad por los anillos de catecol. En efecto, el último sitio en llenarse corresponde al delimitado por la Arg 81 y la Lys 134. Asimismo, los valores de $\Delta G_{unión}$ (tabla D1) señalan una gran afinidad

del complejo tris-catecol por la Scn, en comparación con su precursor $[Fe(Catecol)_2]^-$.

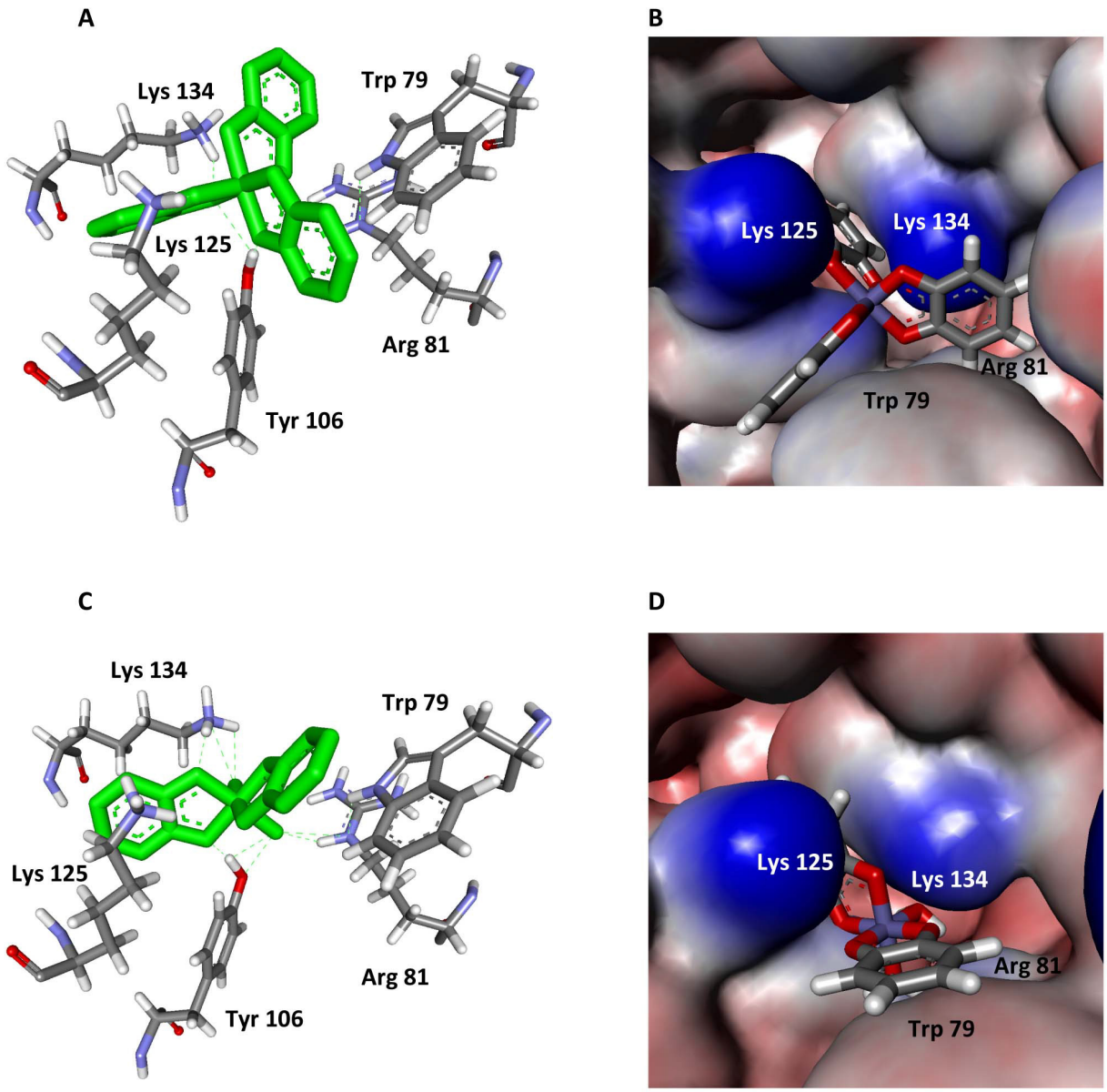


Figura D5. Vista esquemática de las interacciones del complejo $[Fe(Catecol)_3]^{3-}$ (A) y $[Fe(Catecol)_2]^-$ (C) con el sitio activo. (B) y (D) muestran el acople de ambos sustratos al sitio activo.

El ligando libre puede unirse a la siderocalina, como lo confirman estudios de fluorescencia molecular [2]. Sin embargo, no se tienen datos del patrón de asociación al sitio activo. El modelado de este sistema sugiere que podría

hacerlo progresivamente, ocupando los diversos lóbulos según la afinidad de los mismos por el anillo aromático (figura D6). La primera molécula de catecol se ancla fuertemente entre las dos lisinas 125 y 134. De hecho, la mutación de ambos aminoácidos a alanina provoca la pérdida de la capacidad que posee la siderocalina de capturar los complejos de hierro con Ent y catecol [2]. Cuando un segundo catecol se acerca al sitio activo, se une preferentemente al lóbulo delimitado por el residuo de triptofano 79, con el que establece interacciones de tipo π - π.

Tabla D1. Valores estimados de $\Delta G_{unión}$ para los sistemas siderocalina-catecol-hierro.

Sistema	$\Delta G_{unión}$(kJ/mol)
Scn-$[Fe(Catecol)_3]^{3-}$	-41,6
Scn-$[Fe(Catecol)_2]^{-}$	-29,8
Scn-Catecol 1:1	-21,4
Scn-Catecol 1:2	-18,4
Scn-Catecol 1:3	-15,3

En un tercer paso, otra molécula de ligando ocupa el hueco restante, justo por encima de la arginina 81, con la que establece interacciones de tipo catión - densidad electrónica π. Como se observa en la tabla D1, la afinidad de los lóbulos por los anillos aromáticos disminuye en el sentido: lóbulo delimitado por lisinas > lóbulo delimitado por triptofano > lóbulo delimitado por arginina. Experimentalmente, el *quenching* en la fluorescencia del residuo de triptofano generado por la asociación del catecol es bastante menor que el registrado para el complejo $[Fe(Catecol)_3]^{3-}$ [2]. Además, como se detalla en la figura D6, es el segundo residuo de catecol el que se encuentra más cerca de este aminoácido, interaccionando sólo de forma lateral. Es posible, por tanto, que en el caso del ligando se ocupe el primer lóbulo y, en parte, el segundo, de forma que la interacción catecol - Trp 79 sea moderada.

En esta sección se ha verificado la validez del modelo empleado. El mismo ha resultado satisfactorio en la interpretación del patrón de unión de los sustratos al sitio activo, así como en la estimación de las energías libres de unión. Se aplicará entonces, de la misma manera, a los sistemas a analizar en esta tesis.

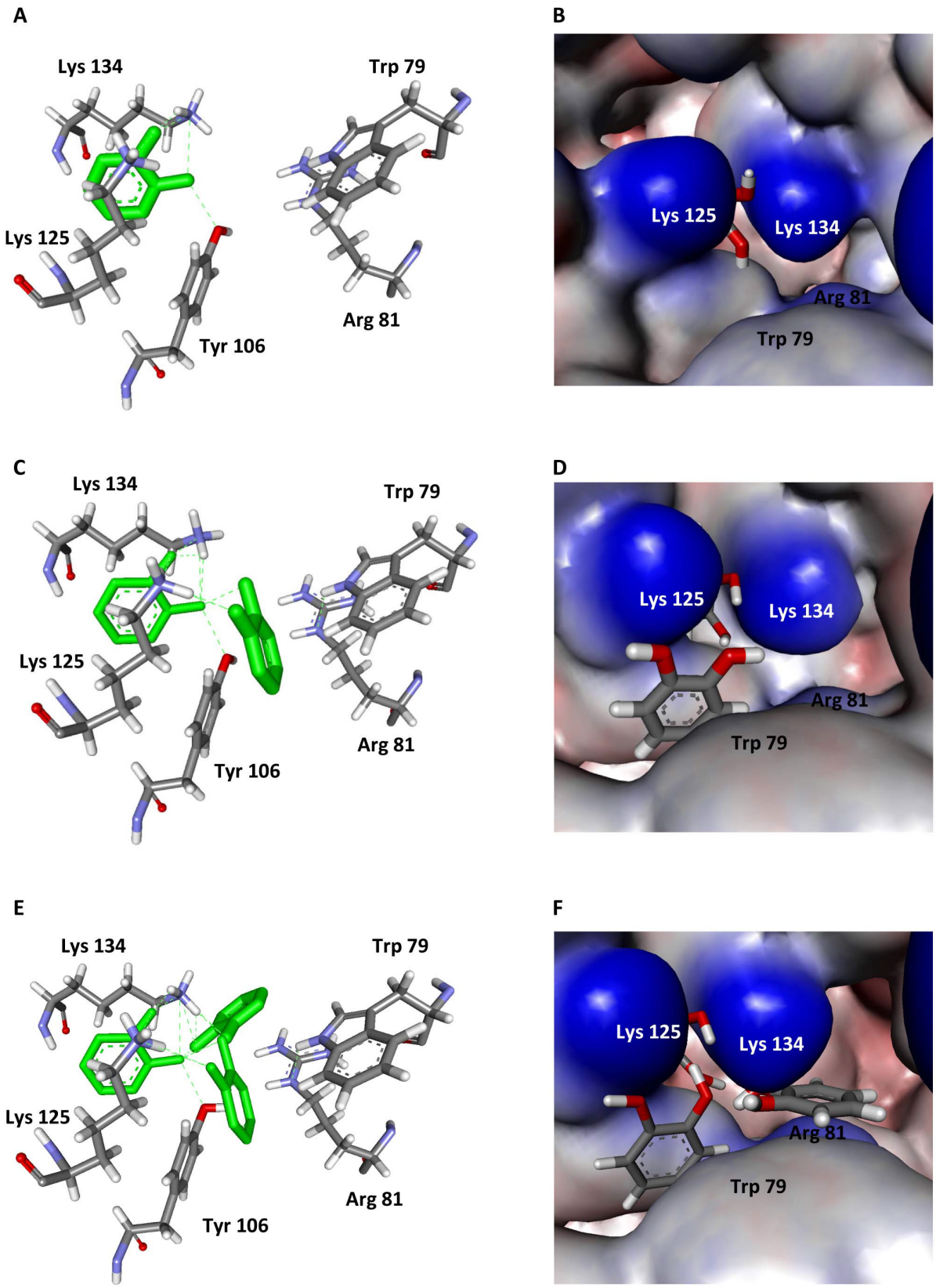


Figura D6. Unión progresiva del catecol a la siderocalina. (A), (C) y (E) muestran un esquema de las interacciones del/los ligando/s con el sitio activo. (B), (D) y (F) muestran el acople de los sustratos al sitio activo.

2. Estudio del sistema Siderocalina-2,5-DHBA-Fe(III)

En el año 2010, Devireddy y sus colaboradores propusieron que el fragmento cuya función es unir al hierro en el sideróforo mamífero asociado a la siderocalina es el ácido 2,5 dihidroxibenzoico (2,5-DHBA, figura D7A) [3]. Sin embargo, no se han dado hasta el momento datos sobre la disposición del sustrato (ligando o complejo con hierro) y su interacción con los aminoácidos del sitio activo. ¿Cómo se comportará, entonces, el 2,5-DHBA, como sideróforo asociado a la siderocalina? Dada la falta de información sobre la química de este sistema, se supone aquí en base a la similitud estructural con el catecol, que la especie que se une finalmente a la proteína es $[Fe(2,5\text{-}DHBA)_3]^{3-}$. Aplicando la misma estrategia metodológica, pero realizando 40 corridas de *docking*, se llega a soluciones que se encuentran dentro de un RMSD de 7,12 Å. Aunque este valor es relativamente alto, las mejores 10 soluciones concuerdan bastante bien entre sí (figura D7B), marcando nuevamente tres zonas del espacio donde los anillos prefieren ubicarse.

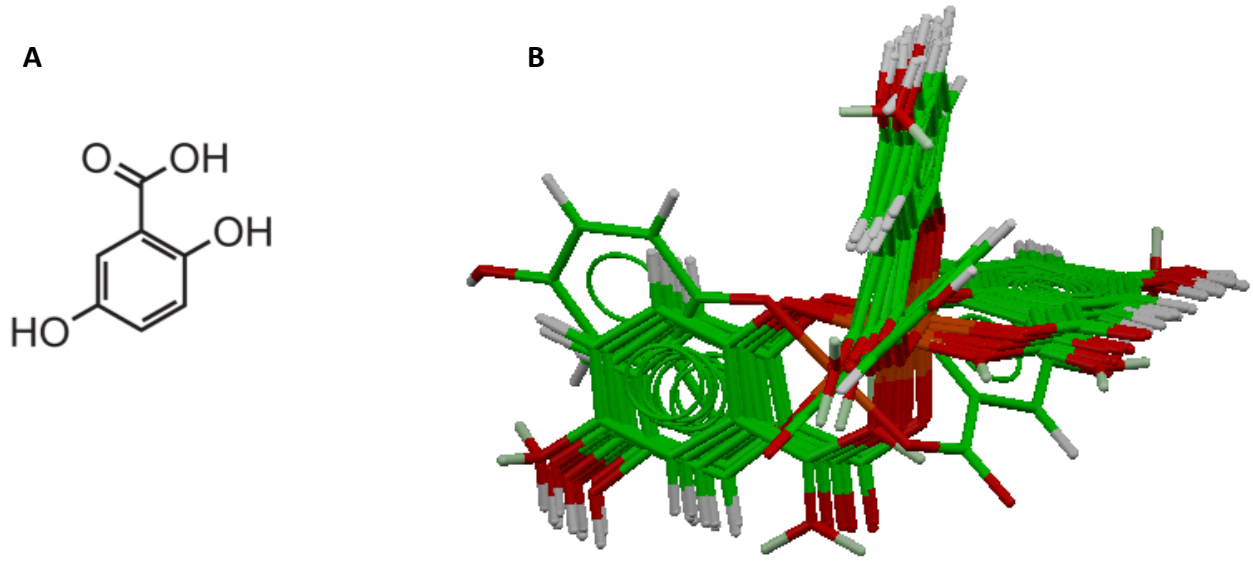


Figura D7. (A) Estructura química del 2,5-DHBA. Superposición de las 10 mejores soluciones del *docking* del sistema Scn-$[Fe(2,5\text{-}DHBA)_3]^{3-}$.

La semejanza estructural del 2,5-DHBA con el catecol hace que el esquema de interacciones que operan sobre ambos complejos metálicos y su disposición en el sitio activo sean muy similares (figuras D5 y D8). En efecto, ambas lisinas

unen fuertemente uno de los anillos aromáticos, mientras que los otros dos ocupan los lóbulos restantes. Sin embargo, existen características estructurales propias de este sistema que generan pequeñas diferencias en el modo de unión del sustrato. Se generan ahora dos nuevos fragmentos capaces de establecer enlaces de hidrógeno: grupo –OH en para y grupo C=O del carboxilato. El lóbulo cercano a la arginina 81 posee varios aminoácidos conteniendo grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, por lo que atrae fuertemente al sustrato, disponiendo, además de la propia arginina, dos nuevos residuos que rodean al segundo anillo: Thr 54 y Ser 68. Finalmente, dadas las restricciones geométricas impuestas por las interacciones mencionadas, el tercer fragmento de catecol se ubica hacia afuera del sitio activo, interaccionando sólo moderadamente con la densidad electrónica del Trp 79.

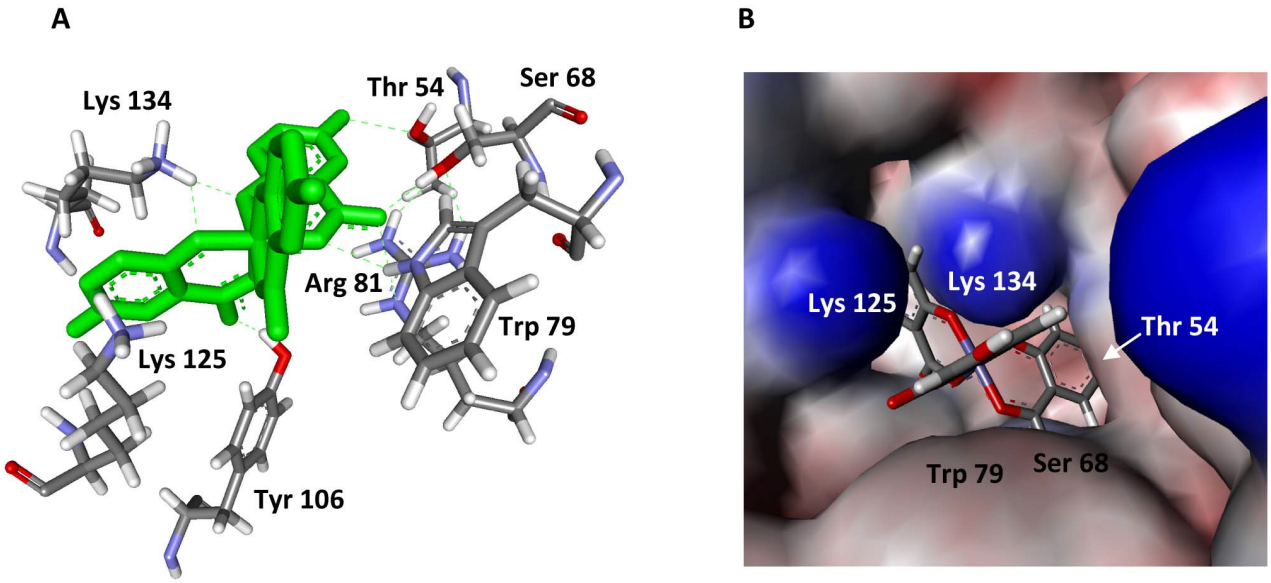


Figura D8. (A) Vista esquemática de las interacciones del complejo $[Fe(2,5\text{-}DHBA)_3]^{3-}$ con el sitio activo. (B) Acople del sustrato al sitio activo.

En ausencia de hierro, el 2,5-DHBA se une a la siderocalina, provocando un *quenching* en la fluorescencia intrínseca del triptofano 79, mayor que en el caso del catecol. De la misma manera que este último, el 2,5-DHBA tiene la posibilidad de unirse progresivamente a la siderocalina. El modelado de este sistema arroja los resultados que se muestran en la figura D9.

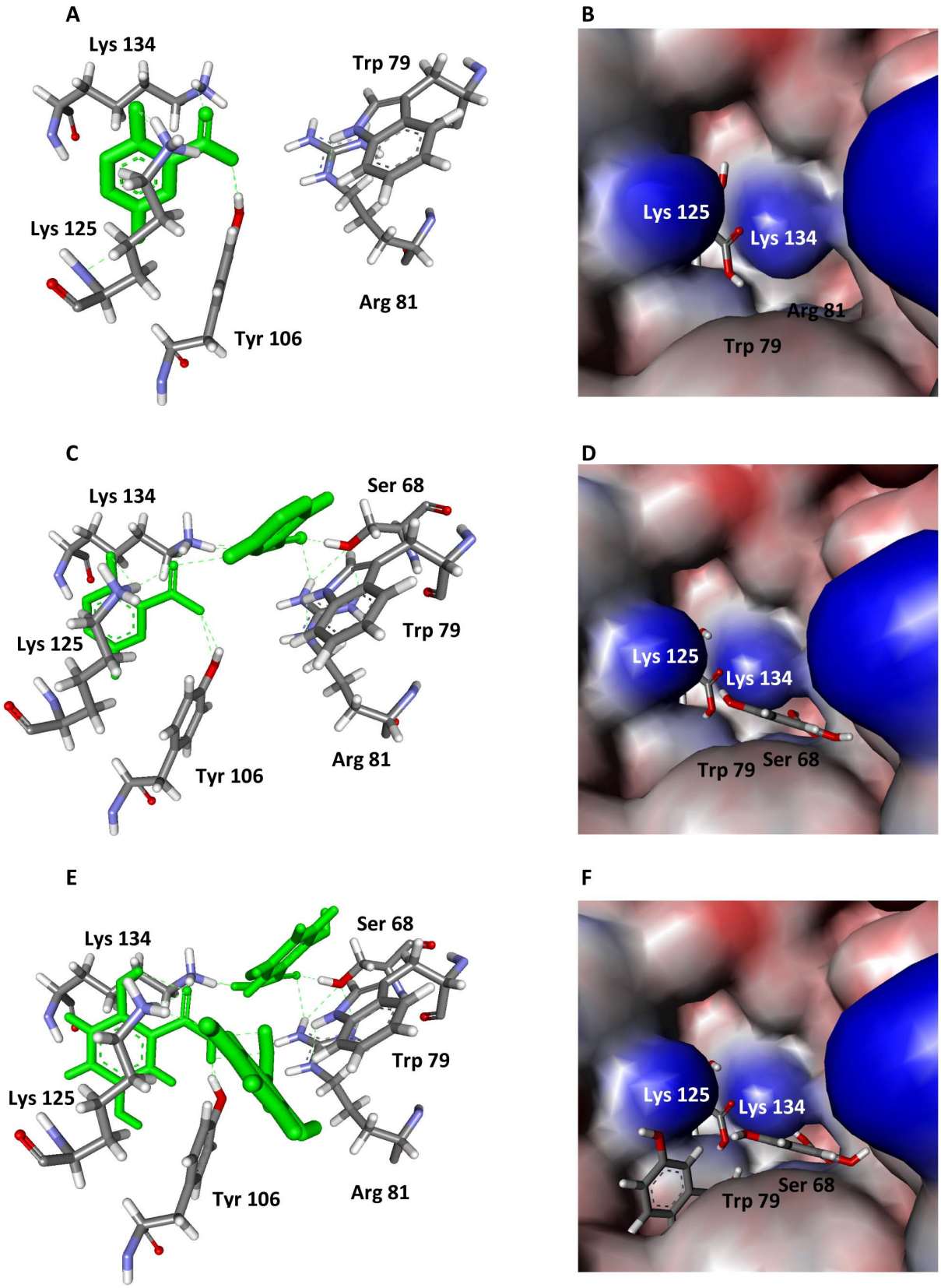


Figura D9. Unión progresiva del 2,5-DHBA a la siderocalina. (A), (C) y (E) muestran un esquema de las interacciones del/los ligando/s con el sitio activo. (B), (D) y (F) muestran el acople de los sustratos al sitio activo.

En términos generales, el ligando prefiere unirse al lóbulo rodeado por ambas lisinas. Queda claro, como ya fue discutido, que este arreglo ha sobrevivido al proceso evolutivo de esta proteína por su inusual capacidad de anclar anillos aromáticos. No obstante, en contraposición a lo expuesto para el catecol, el siguiente lóbulo en ocuparse corresponde al delimitado por la arginina. El origen de este fenómeno estriba en el grupo carboxilo adicional, el cual se dispone hacia el centro de este hueco donde se encuentran los residuos aminoacídicos capaces de formar enlaces de hidrógeno (Ser 68 y Arg 81). Además, el anillo de cinco miembros del Trp 79 interacciona con la porción aromática de este segundo 2,5-DHBA, disponiéndose los anillos de forma casi paralela. Esta última interacción explica la disminución observada en la fluorescencia del triptofano, efecto que es mayor en este caso que para el catecol, donde los anillos del aminoácido y del ligando se enfrentan de forma perpendicular. En caso de que se uniera una tercera molécula de 2,5-DHBA, la misma se ubicaría en el lóbulo restante, aunque hacia afuera del sitio activo, asociada a la estructura sólo por enlaces de hidrógeno con los ligandos ya unidos.

3. Referencias bibliográficas.

1. Goetz, D. H.; Holmes, M. A.; Borregaard, N.; Bluhm, M. E.; Raymond, K. N.; Strong, R. K. *Molecular Cell* **2002,** *10*, 1033-1043.
2. Bao, G.; Clifton, M.; Hoette, T. M.; Mori, K.; Deng, S. X.; Qiu, A.; Viltard, M.; Williams, D.; Paragas, N.; Leete, T.; Kulkarni, R.; Li, X.; Lee, B.; Kalandadze, A.; Ratner, A. J.; Pizarro, J. C.; Schmidt-Ott, K. M.; Landry, D. W.; Raymond, K. N.; Strong, R. K.; Barasch, J. *Nature Chemical Biology* **2010,** *6*, 602-609.
3. Devireddy, L. R.; Hart, D. O.; Goetz, D. H.; Green, M. R. *Cell* **2010,** *141*, 1006-1017.

Anexo E

Especiación de Ins*P* en el tracto gastrointestinal

1. Componentes no comprendidos en el modelo

Los componentes detallados en la tabla E1 no han sido considerados en el modelo a emplear. En todos los casos los datos disponibles resultaron insuficientes, o se encuentran reportados en condiciones muy alejadas a las del sistema en estudio, por lo que no permiten realizar un análisis riguroso de su especiación química en solución.

Tabla E1. Componentes no comprendidos en el modelo.

Compuesto	
Ácido araquidónico	Dextrina
Ácido docosahexenoico	Etanol
Ácido eicosapentenoico	Lecitina
Ácido láurico	Lipasa
Ácido linoleico	Lisozima
Ácido linolénico	Maltosa
Ácido palmítico	Mucinas
Ácido esteárico	Pepsina
Ácido oleico	Purinas
Ácidos biliares	Quimotripsina
Albúmina	Rafinosa
Almidón	Sacarosa
Amilasa	Tripsina
Carboxipeptidasa A	Vit A
Carotenos	Vit B12
Celulosa y lignina	Vit E
Colesterol	Vit K
Colina	γ-globulina
Creatinina	

2. Información nutricional de alimentos

Tabla E2. Composición química de algunos alimentos[a]. Datos tomados de las referencias[1-11].

mg/100 g porción	Leche entera	Leche descremada	Leche semidescremada	Leche de oveja	Leche de cabra	Leche entera en polvo	Leche descremada en polvo	Leche condensada	Yogur
Li									
Na	50	55	50	30	40	370	555	100	50
K	155	150	150	180	175	1160	1580	320	155
Mg	12	14	12	12	14	110	110	25	12
Ca	120	125	120	185	130	920	1290	250	120
Sr									
Ba									
Mn	0,003	0,004	0,003	0,013	0,011	0,07	0,1	0,008	0,003
Fe	0,045	0,075	0,045	0,1	0,06	0,6	0,8	0,095	0,05
Co									
Ni									
Cu	0,017	0,01	0,01	0,09	0,025	0,13	0,075	0,02	0,01
Zn	0,38	0,4	0,37	0,47	0,3	2,1	4,1	0,75	0,38
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	90	95	90	125	105	715	1020	190	90
F	0,017	0,017	0,017	0,02	0,015	0,12	0,13	0,03	0,015
Cl	100	100	100	75	135	810	1000	210	100
Br									
I	0,003	0,003	0,003	0,01	0,004	0,045	0,055	0,015	0,006
Se		0,005				0,014	0,005	0,001	0,0003

Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D	0,00006		0,00003	0,00016	0,00025	0,0006	0,000025	0,0001	0,00006
Vit B1	0,035	0,04	0,035	0,065	0,05	0,27	0,34	0,065	0,035
Vit B2	0,18	0,17	0,18	0,29	0,15	1,4	2,18	0,37	0,18
Nicotinamida	0,09	0,095	0,09	0,465	0,3	0,7	1	0,2	0,09
Ácido pantoténico	0,35	0,28	0,35	0,395	0,33	2,7	3,45	0,64	0,35
Vit B6	0,045	0,05	0,045	0,08	0,04	0,3	0,28	0,06	0,045
Biotina	0,004	0,002	0,004	0,009	0,004	0,025	0,014	0,006	0,004
Ácido fólico	0,006	0,005	0,005	0,006	0,001	0,04	0,02	0,006	0,01
Vit C	2	1	2	4	2	11	6	2	2
Ala									
Gly									
Arg	120	130	130	180	130	920	1280	230	140
His	90	90	95	130	80	660	920	170	100
Ile	210	220	220	310	230	1610	2240	430	240
Leu	350	340	360	540	390	2470	3430	700	410
Lys	260	270	280	440	340	1960	2720	470	310
Met	85	85	90	140	95	620	860	165	100
Phe	170	170	180	260	180	1220	1700	335	210
Thr	150	160	160	250	230	1160	1610	330	170
Trp	45	50	50	70	50	350	490	90	45
Tyr	170	180	180	260	240	1280	1780	320	200
Val	230	240	240	320	280	1730	2400	450	300
Glu									
Cys									
Asp									

Ser									
Pro									
Glucosa									30
Galactosa									1150
Fructosa									
Sacarosa									
Lactosa	4550	4800	4570	4550	4200	35100	50500	9190	3190
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico	210	220	210	120	130	1620	2210	340	
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									1050
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6									

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Yogur semidescremado	Yogur descremado	Queso Fresco, queso crema	Queso Cottage	Queso Mozzarella	Queso fresco en capas	Queso Requesón	Queso Cheddar	Queso Gruyer
Li									
Na	45	55		230		35	35	675	335
K	150	185	120	90	150	120	85	100	80
Mg	11	14	9	9	15	9	11	35	
Ca	115	145	100	95	350	80	85	810	1000
Sr									
Ba									
Mn	0,003	0,004			0,02	0,007	0,06	0,017	
Fe	0,045	0,055	0,68	0,3	0,25	0,3	0,335	0,59	
Co									
Ni									
Cu	0,01	0,012		0,02	0,05	0,016	0,015	0,08	
Zn	0,36	0,45		0,5		0,5	0,5	4	
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	90	110	170	150	200	180	165	530	605
F	0,015	0,02		0,017	0,06	0,016	0,02	0,14	
Cl	95	120		450	700	70	110	1100	
Br							0,004	0,035	
I	0,006	0,007		0,01	0,015	0,01	0,004	0,035	
Se				0,005			0,005	0,011	
Urea									
Ácido úrico									

Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D	0,00003			0,00011	0,0004	0,00015	0,000085	0,00034	
Vit B1	0,035	0,04	0,055	0,03	0,035	0,03	0,035	0,035	0,05
Vit B2	0,17	0,18	0,28	0,26	0,335	0,29	0,27	0,44	0,3
Nicotinamida	0,09	0,09	0,14	0,11	0,37	0,1	0,14	0,11	0,14
Ácido pantoténico	0,35	0,36	0,54	0,57		0,57	0,68	0,29	0,52
Vit B6	0,045	0,045	0,075	0,03	0,08	0,03	0,06	0,055	0,08
Biotina	0,003	0,004	0,006		0,002		0,006	0,002	0,001
Ácido fólico	0,005	0,012		0,003	0,02	0,003	0,009	0,019	0,01
Vit C	2	2					0,4		
Ala									
Gly									
Arg	130	160	520	450	730	445	500	900	980
His	95	120	450	300	650	295	380	800	1110
Ile	220	330	850	790	1200	695	790	1810	1610
Leu	380	460	1400	1230	2090	1210	1290	2520	3100
Lys	280	350	1210	1000	1650	990	1050	2070	2710
Met	90	110	410	150	350	150	390	770	820
Phe	190	240	720	635	1100	630	650	1450	1740
Thr	160	180	660	640	950	585	580	980	1090
Trp	45	50	150	150	280	175	160	290	420
Tyr	180	220	660	580	770	575	650	1300	1780
Val	270	340	890	825	1400	815	830	1810	2240
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									

Glucosa	30							3,6	
Galactosa	1180							55	
Fructosa									
Sacarosa									
Lactosa	3280	4200	3410	3300		3600	2700	300	
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico	1110	1210	890	550	800	890	740	1330	850
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico					0,02				
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6									

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Queso Parmesano	Huevo de Gallina	Yema de huevo líquida	Clara de huevo líquida	Mantequilla	Margarina vegetal	Carne de vaca	Carne de oveja	Carne de ternera
Li									
Na	705	145	50	170	5	100	50	95	95
K	130	145	140	155	16		340	290	350
Mg	45	12	16	12	3		20	19	20
Ca	1290	55	140	11	13		5	12	12
Sr									
Ba									
Mn		0,03	0,125	0,04	0,04		0,02	0,013	0,01
Fe	1	2,1	7	0,2	0,09		2,1	2	1,4
Co									
Ni									
Cu	0,36	0,14	0,35	0,13	0,015		0,07	0,09	0,06
Zn	3	1,35	4	0,02	0,23		3,6	2	4,3
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	840	215	590	20	20		165	160	200
F	0,16	0,11	0,03	0,013	0,13		0,1	0,02	0,02
Cl	950	180	180	0,17	20	160			75
Br									
I	0,04	0,01	0,012	0,007	0,004		0,001		0,002
Se		0,01	0,03	0,007			0,005	0,001	
Urea									
Ácido úrico									

Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D	0,00065	0,002	0,006		0,001	0,003			
Vit B1	0,02	0,1	0,29	0,02	0,005		0,1	0,18	0,15
Vit B2	0,62	0,31	0,4	0,32	0,02		0,13	0,25	0,3
Nicotinamida	0,17	0,085	0,065	0,09	0,035		4,6	6	6,5
Ácido pantoténico	0,86	1,6	4	0,14	0,045		1	0,59	0,9
Vit B6	0,095	0,12	0,3	0,012	0,005		0,5	0,29	0,4
Biotina	0,003	0,025	0,053	0,007			0,005		
Ácido fólico	0,02	0,065	0,15	0,016			0,01	0,003	0,005
Vit C				0,3	0,2				
Ala									
Gly									
Arg	1330	890	1280	680	25		1350	1440	1400
His	1200	330	440	280	19		740	630	740
Ile	1930	930	1090	740	45		1090	1210	1110
Leu	3500	1260	1630	1080	75		1700	1800	1660
Lys	2980	890	1300	740	55		2020	2000	1710
Met	960	450	470	470	19		570	560	470
Phe	1910	800	790	760	35		930	920	840
Thr	1450	710	1010	580	35		1010	1090	930
Trp	490	230	290	200	9		260	290	350
Tyr	1750	590	780	460	35		780	770	765
Val	2520	1120	1240	980	50		1150	1180	1120
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									

Glucosa		340	210	410					
Galactosa									
Fructosa									
Sacarosa									
Lactosa	60				570				
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6									

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Carne de cerdo	Corned Beef	Jamón cocido de cerdo	Panceta	Salchichas	Carne de gallina	Merluza	Atún	Salmón
Li									
Na	75	950	960	1770	780	85	100	45	50
K	350	140	270	225	180	360	295	360	370
Mg	25	15	25			35		50	30
Ca	5	14	15	9	8	12	40	40	13
Sr									
Ba									
Mn	0,014					0,02			0,014
Fe	0,89	4,1	2,3	0,8	1,75	1,8		1	1
Co									
Ni									
Cu	0,105	0,24				0,3			0,2
Zn	3,63	5,6				0,85			0,8
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	175	150	135	110	105	200	140	200	265
F						0,035		0,03	0,03
Cl		1430	1700		1200	85			
Br									
I	0,001							0,05	0,035
Se	0,007							0,13	0,025
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									

Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D	0,001							0,005	0,016
Vit B1	0,9	0,02	0,61	0,43	0,18	0,085	0,1	0,16	0,17
Vit B2	0,23	0,23	0,21	0,14	0,19	0,16	0,2	0,16	0,17
Nicotinamida	5	3,2	3,7	2,3	2,3	6,8		8,5	7,5
Ácido pantoténico	0,7	0,4	0,58		0,43	0,96		0,66	0,75
Vit B6	0,5	0,06	0,36	0,35	0,14	0,5		0,46	0,98
Biotina	0,005	0,002				0,002			0,001
Ácido fólico	0,006	0,002	0,005			0,009		0,015	0,02
Vit C	2								
Ala									
Gly									
Arg	1355	1630	1420	610	910	1440	1070	1250	1330
His	890	890	930	400	350	630	520	1090	660
Ile	1130	1240	1170	510	640	1330	1270	1210	1160
Leu	1865	1920	1950	840	940	1840	1440	2170	1770
Lys	2120	2130	2210	950	1050	2110	1560	2210	2020
Met	545	690	580	250	280	660	480	610	700
Phe	900	910	940	400	480	940	650	1050	910
Thr	1035	1110	1070	460	540	1040	980	1180	1110
Trp	265	230	280	120	110	290	230	300	260
Tyr	860	850	900	390	430	790	800	970	720
Val	1260	1270	1320	570	660	1220	1100	1420	1390
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									
Glucosa									

Galactosa									
Fructosa									
Sacarosa									
Lactosa									
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico			670						
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6									

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Copos de avena	Cereal de avena Ready Brek de Weetabix (145)	Cereal de avena Cheerios General Mills	Cereal de avena Cheerios Apple Cinn, General Mills	Cereal de avena Life Quaker	Avena Old Fashioned Quaker	Avena instantánea Quaker	Cereal de salvado de avena Oat bran Quaker	Cereal de salvado de avena Cracklin' Kellogg's
Li									
Na	5	23	571	450	500	0	268	368	306
K	335	390	607	217	281		375		449
Mg	140	120	143	53			114	140	122
Ca	55	65	357	333	313	0	357	175	41
Sr									
Ba									
Mn	5								
Fe	4,6	4,8	29	15	25,3	4,5	25,7	28	3,7
Co									
Ni									
Cu	0,53	0,41							0,33
Zn	4,4	2,7	13,3	12,5	11,7			6,6	3,1
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	390	420	357	200	313		357	439	306
F	0,035								
Cl	60	66							
Br									
I	0,004								
Se									

Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D		0	0,004	0,003		0			0,002
Vit B1	0,59	1,5	1,3	1,25	1,1	0,375		0,66	0,77
Vit B2	0,15	0,09	1,5	1,42	1,3	0,085		0,75	0,87
Nicotinamida	1	9,4	17,9	16,7	15,6	0		8,77	10,2
Ácido pantoténico	1,09	1,3							
Vit B6	0,16	1,5	1,8	1,7	1,6			0,88	1,02
Biotina	0,02	0,023							
Ácido fólico	0,025	0,053	0,71	0,67	0,75			0,7	0,2
Vit C		0	21,4	20	0	0	0	10,5	30,6
Ala	627	627	627	627	627	627	627	627	627
Gly	655	655	655	655	655	655	655	655	655
Arg	870	870	870	870	870	870	870	870	870
His	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Ile	610	610	610	610	610	610	610	610	610
Leu	1130	1130	1130	1130	1130	1130	1130	1130	1130
Lys	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Met	240	240	240	240	240	240	240	240	240
Phe	780	780	780	780	780	780	780	780	780
Thr	530	530	530	530	530	530	530	530	530
Trp	190	168	190	190	190	190	190	190	190
Tyr	570	570	570	570	570	570	570	570	570
Val	810	810	810	810	810	810	810	810	810
Glu	2913	2913	2913	2913	2913	2913	2913	2913	2913
Cys	376	376	376	376	376	376	376	376	376
Asp	1073	1073	1073	1073	1073	1073	1073	1073	1073

Ser	655	655	655	655	655	655	655	655	655
Pro	725	725	725	725	725	725	725	725	725
Glucosa		100							
Galactosa									
Fructosa		0							
Sacarosa	700	1100							
Lactosa		0							
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3	21		60	40	8	8	3	7	50
InsP_4	118		220	140	60	70	60	100	210
InsP_5	350		460	240	250	300	280	560	460
InsP_6	958	1273	510	250	700	1030	930	2120	1070

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Cereal de salvado de avena Organic Oat Bran Flakes - Health Valley	Copos de maíz	Copos de maíz Crunchy cornbran Quaker	Copos de maíz Cornflakes Kellogg's (130)	Cereal de maíz Old fash, grits Quaker	Cereal de trigo Frosted mini-wheats Kellogg's	Cereal de trigo Weetabix (154)	Cereal de trigo Shredded Wheat (148)	Cereal de trigo Puffed Wheat (144)
Li									
Na	380	910	889	1110	0	9,8	370	8	4
K	340	140		100		333	370	330	390
Mg		14		14		118	120	130	140
Ca	80	13	0	15		0	35	38	26
Sr									
Ba									
Mn		0,05		0,08					
Fe	2,88	2	30	6,7	4,4	28,2	6	4,2	4,6
Co									
Ni									
Cu		0,2		0,03		0,31	0,54	0,4	0,56
Zn		0,3	14	0,3		2,94	2	2,3	2,8
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P		60		38		294	290	340	350
F									
Cl		1800		1820			570	53	50
Br									
I		0,001		0,01					

Se		0,003		0,002					
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D				0,0028			0	0	0
Vit B1	0,75	0,06	0,44	1	0,55	0,74	0,7	0,27	0
Vit B2	0,85	0,06	1,57	1,5	0,41	0,83	1	0,05	0,06
Nicotinamida	10	1,4	18,5	16	4,88	9,8	10	4,5	5,2
Ácido pantoténico		0,17		0,3			0,7	0,8	0,5
Vit B6	1	0,07	1,85	1,8		0,98	0,22	0,24	0,14
Biotina				0,002			0,008	0,009	0,007
Ácido fólico		0,006	1,48	0,25	0,2	0,2	0,05	0,029	0,019
Vit C	120		0	0		0	0	0	0
Ala	627	713	713	713	713	536	536	536	536
Gly	655	352	352	352	352	580	580	580	580
Arg	870	240	240	240	240	684	684	684	684
His	300	240	240	240	240	342	342	342	342
Ile	610	330	330	330	330	491	491	491	491
Leu	1130	1240	1240	1240	1240	997	997	997	997
Lys	500	180	180	180	180	431	431	431	431
Met	240	170	170	170	170	223	223	223	223
Phe	780	430	430	430	430	669	669	669	669
Thr	530	320	320	320	320	431	431	431	431
Trp	190	50	50	54	50	164	126	126	174
Tyr	570	270	270	270	270	446	446	446	446
Val	810	440	440	440	440	655	655	655	655
Glu	2913	1796	1796	1796	1796	4448	4448	4448	4448
Cys	376	152	152	152	152	372	372	372	372

Asp	1073	599	599	599	599	729	729	729	729
Ser	655	475	475	475	475	684	684	684	684
Pro	725	846	846	846	846	1473	1473	1473	1473
Glucosa				1400			1800	0	
Galactosa									
Fructosa				1400			800	0	100
Sacarosa				4000			2900	800	200
Lactosa				0			0	0	0
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3	3	10	10			8		10	110
InsP_4	40	16	50	6	3	50		70	120
InsP_5	190	40	110	9	30	220		320	80
InsP_6	530	185	150	330	200	670	682	970	40

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Cereal de trigo Wheaties General Mills	Cereales de salvado de trigo All-Bran Kellogg's (126)	Cereales de salvado de trigo Fiber one General Mills	Cereales de arroz Rice Krispies (146)	Cereales de arroz inflado Puffed rice Quaker	Mezcla de cereales Crispix Kellogg's (arroz + maíz)	Mezcla de cereales Froot Loops Kellogg's (maíz+trigo+avena)	Mezcla de cereales Grape Nuts Post (trigo+cebada)	Mezcla de cereales Grape Nut Flakes Post (trigo+cebada)
Li									
Na	704	1480	350	1260	0	759	466	500	431
K	352	900	333	150		138	121	397	345
Mg	89	370	53,3	50				138	110
Ca	74	69	333	20	0	0	0	34,5	0
Sr									
Ba									
Mn				1					
Fe	30	12	15	6,7		27,9	15,5	27,9	27,9
Co									
Ni									
Cu	0,15	0,44		0,1				0,345	0,28
Zn	27,8	8,4	12,5	1,1		5,17	5,17	2,1	7,76
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	370	620	200	130				345	276
F									
Cl		2390		1980					
Br									
I									

Se									
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D	0,004	0,0028	0	2,8		0,003	0,0034	0,0017	0,0034
Vit B1	2,78	1	1,25	1	0,2	1,81	1,29	0,65	1,29
Vit B2	3,15	1,5	1,42	1,5	0	2,05	1,47	0,73	1,47
Nicotinamida	37	16	16,7	16	0	24,1	17,2	8,62	17,2
Ácido pantoténico		1,7		0,7					
Vit B6	3,7	1,8	1,7	1,8		2,41	1,72	0,86	1,72
Biotina		0,025		0,002					
Ácido fólico	0,74	0,25	0,33	0,25	0,053	0,97	0,34	0,345	0,69
Vit C	22,2	0	20	0	0	20,7	51,7	0	0
Ala	536	536	536	544	544	628	625	504	504
Gly	580	580	580	453	453	402	529	520	520
Arg	684	684	684	752	752	496	598	622	622
His	342	342	342	227	227	233	294	276	276
Ile	491	491	491	344	344	337	477	475	475
Leu	997	997	997	743	743	992	1122	898	898
Lys	431	431	431	344	344	262	370	406	406
Met	223	223	223	208	208	189	211	202	202
Phe	669	669	669	471	471	451	626	630	630
Thr	431	431	431	353	353	337	427	431	431
Trp	164	192	164	84	84	67	135	157	157
Tyr	446	446	446	317	317	294	429	418	418
Val	655	655	655	498	498	469	635	617	617
Glu	4448	4448	4448	1867	1867	1831	3052	3618	3618
Cys	372	372	372	100	100	126	300	322	322

Asp	729	729	729	933	933	766	800	701	701
Ser	684	684	684	489	489	482	605	578	578
Pro	1473	1473	1473	426	426	636	1014	1380	1380
Glucosa		900		1000					
Galactosa									
Fructosa		700		700					
Sacarosa		12100		8800					
Lactosa		0		0					
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
Ins*P*$_3$	60	80	7	5	10	3	2	20	40
Ins*P*$_4$	180	390	80	40	10	30	30	30	140
Ins*P*$_5$	370	1150	480	90	10	70	80	120	310
Ins*P*$_6$	510	2260	2170	120	5	80	170	520	420

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Mezcla de cereales Multi-grain Cheerios General Mills (maíz+avena +cebada+trigo+arroz)	Mezcla de cereales Product 19 Kellogg's (maíz+avena+trigo+arroz)	Cereales con frutas Muesli-Swiss style Kellogg's y Weetabix (137) (cebada+avena+trigo+maíz+arroz)	Cebada	Harina de trigo	Pan de Trigo (blanco)	Pan de germen de trigo (98)	Pan integral de Trigo	Pan de centeno
Li									
Na	552	700	380	18	2	540	570	380	550
K	293	167	440	445	290	130	190	270	170
Mg	55,2	53,3	85	115		25	54	90	35
Ca	345	0	120	40	40	60	120	65	30
Sr									
Ba									
Mn				1,65		0,6	1,78	2,3	0,92
Fe	62,1	60	5,6	2,8	3,3	1	2,9	2	2,5
Co									
Ni									
Cu			0,1	0,3	0,4	0,22	0,21	0,42	0,27
Zn	51,7	50	2,5	3,1	1,3	0,5	1,9	2	0,86
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}							88		
SCN^-									
P	276	133	280	340	370	90	180	195	120
F				0,12		0,08			0,013
Cl			790	25		450	920		670
Br									
I				0,007	0,008	0,006	0,022		0,009
Se				0,002		0,002		0,002	

Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D	0,00345	0,0033	0				0		
Vit B1	5,17	5	0,5	0,43	0,47	0,085	0,52	0,25	0,18
Vit B2	5,86	5,7	0,7	0,18	0,17	0,06	0,09	0,15	0,11
Nicotinamida	69	66,7	6,5	4,8	5	0,85	3	3,3	0,92
Ácido pantoténico	34,5	33,3	1,2	0,68	1,2	0,69	0,3	0,65	0,47
Vit B6	6,9	6,67	1,6	0,56	0,46	0,04	0,15	0,36	
Biotina			0,015		0,008	0,003	0,002	0,004	
Ácido fólico	1,38	1,33	0,14	0,065	0,05	0,015	0,046	0,06	0,016
Vit C	51,7	200	0				0		
Ala	578	605	578	473	536	343	343	343	
Gly	500	510	500	461	580	371	371	371	
Arg	621	637	621	560	600	310	310	360	420
His	264	277	264	210	250	180	180	150	240
Ile	447	444	447	460	520	380	380	310	260
Leu	982	1027	982	800	860	590	590	530	470
Lys	367	364	367	380	350	200	200	200	300
Met	204	210	204	180	210	130	130	140	60
Phe	588	588	588	590	590	420	420	360	350
Thr	413	409	413	430	390	250	250	240	250
Trp	128	122	138	150	150	85	120	100	50
Tyr	399	401	399	390	370	230	230	220	170
Val	597	601	597	580	600	390	390	360	330
Glu	2762	2756	2762	2788	4448	2846	2846	2846	
Cys	254	250	254	272	372	238	238	238	
Asp	801	834	801	673	729	466	466	466	

Ser	555	576	555	473	684	438	438	438	
Pro	951	867	951	1288	1473	942	942	942	
Glucosa			3800	100					520
Galactosa									
Fructosa			4300	100					380
Sacarosa			10900	990					610
Lactosa			4500				0		
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico									
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico									
Ácido oxálico									
Ácido salicílico									
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3	30	9		125		30		60	
InsP_4	130	40		352		20		20	
InsP_5	290	100		159		50		60	
InsP_6	450	170	1030	245	1782	320	530	870	79

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Pan integral de Centeno	Croissants (120)	Pastas al huevo	Arroz (sancochado)	Arroz (sancochado, hervido con sal y escurrido)	Arroz frito con ajo y cebolla (45)	Papa	Zanahoria	Perejil (hojas)
Li									
Na	525	390	17	6	450	56	5	60	35
K	290	140	165	105	10	85	445	290	1000
Mg		26	65	65	20	5	25	18	40
Ca	45	80	25	6	3	7	10	40	245
Sr									
Ba									
Mn		0,35	0,73	2		0,28	0,15	0,21	3
Fe	3,3	2	1,6	0,6	0,1	0,3	0,4	2	6
Co									
Ni									
Cu	0,68	0,26	0,15	0,13	0,1	0,06	0,15	0,13	0,52
Zn		0,9	1,6	0,5	0,2	0,5	0,27	0,64	0,9
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}		79				33			
SCN^-									
P	200	130	190	120	35	38	50	35	130
F			0,08	0,05			0,01	0,025	0,11
Cl		610	30		680	98	45	60	155
Br									
I				0,002			0,004	0,015	0,015
Se				0,04			0,012		0,055

Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D		0,00013				0			
Vit B1	0,18	0,18	0,17	0,06	0,02	0,03	0,11	0,07	0,14
Vit B2	0,15	0,16	0,075	0,03	0,01	0,01	0,045	0,055	0,3
Nicotinamida	0,56	2	1,9	1,3	0,32	0,3	1,22	0,58	1,35
Ácido pantoténico		0,5	0,3	0,63	0,11	0,1	0,4	0,27	0,3
Vit B6		0,11	0,06	0,15		0,06	0,21	0,095	0,2
Biotina		0,009	0,001	0,003		0,001	0,0004	0,005	
Ácido fólico		0,073	0,011	0,03		0,003	0,007	0,008	0,115
Vit C		0				1	17	7	165
Ala									
Gly									
Arg	410		710	570			120	40	170
His	220		460	170			40	15	100
Ile	320		530	340			100	45	215
Leu	530		1010	660			140	40	300
Lys	320		450	290			130	45	280
Met	100		100	170			30	8	20
Phe	370		640	390			100	30	245
Thr	290		420	280			90	35	185
Trp	60	108	80	90		30	30	10	90
Tyr	200		420	260			80	16	125
Val	400		590	490			130	40	300
Glu									
Cys									
Asp									

Ser									
Pro									
Glucosa	755	300				900	240	1400	530
Galactosa									
Fructosa	1115	300				500	170	1290	320
Sacarosa	230	400		150		400	300	1900	
Lactosa		0							
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico							520	50	
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico							90	295	
Ácido oxálico								6	5
Ácido salicílico							0,12	0,23	0,08
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3								2	
InsP_4								4	
InsP_5								2	
InsP_6		136				15		60	

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Remolacha	Apio	Coliflor	Broccoli	Ajo	Lechuga	Acelga	Puerro	Espárrago
Li									
Na	60	130	16	13	19	10	90	5	4
K	335	345	330	465	530	225	375	225	205
Mg	25	12	17	25	35	11		18	20
Ca	30	80	20	105	40	35	105	85	20
Sr									
Ba									
Mn	0,11		0,17	0,26	0,46	0,35	0,3	0,19	0,27
Fe	0,93	0,5	0,63	1,3	1,4	1,1	2,7	1	1
Co									
Ni									
Cu	0,19	0,12	0,04	0,2	0,26	0,055	0,08	0,055	0,15
Zn	0,59	0,11	0,23	0,94	1	0,22	0,35	0,31	0,5
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	45	50	55	80	135	35	40	45	45
F	0,02		0,012	0,01		0,03		0,01	0,05
Cl	80		30	80	30	55		25	55
Br									
I	0,001			0,001	0,003	0,003		0,001	0,007
Se	0,011		0,008		0,02	0,005		0,005	
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									

D-glucosamina									
Vit D									
Vit B1	0,02	0,05	0,11	0,095	0,2	0,06	0,1	0,1	0,11
Vit B2	0,04	0,075	0,1	0,21	0,08	0,08	0,16	0,06	0,12
Nicotinamida	0,23	0,55	0,6	1	0,6	0,32	0,65	0,53	1
Ácido pantoténico	0,13	0,43	1,01	1,29		0,11	0,17	0,14	0,62
Vit B6	0,05	0,09	0,2	0,17		0,055		0,25	0,06
Biotina			0,002	0,001		0,002		0,002	0,002
Ácido fólico	0,095	0,007	0,055	0,035		0,035	0,03		0,085
Vit C	10	7	75	115	14	13	40	30	20
Ala									
Gly									
Arg	25	50	110	190	615	60	55	115	110
His	20	20	50	65	115	20	30	40	30
Ile	50	45	110	130	240	70	90	75	70
Leu	55	85	170	160	380	75	120	130	85
Lys	80	25	140	150	210	70	85	140	90
Met	5	20	50	50	125	12	6	30	25
Phe	25	55	75	120	180	55	70	65	60
Thr	35	40	110	120	175	55	90	75	55
Trp	13	15	35	35	80	15		20	17
Tyr	12	15	35		80	35		40	40
Val	45	60	150	170	260	65	85	95	90
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									
Glucosa	270		1100	940		410	210	930	800
Galactosa									

Fructosa	250	100	980	1030		560	270	1220	990
Sacarosa	7850	2080	170	520		100	210	840	240
Lactosa									
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol			25						
Ácido cítrico	195			210		13			60
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico	35			120					95
Ácido oxálico	180						650		
Ácido salicílico	0,18			0,65	0,1			0,08	0,14
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3	7	7							
InsP_4	4	2							
InsP_5	1	2							
InsP_6	23	20							

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Espinaca	Repollo	Cebolla	Berenjena	Chirivía	Nabo	Pepino	Tomate	Manzana
Li									
Na	65	13	9	4	8	60	9	6	3
K	635	225	175	265	470	240	140	295	145
Mg	60	25	11	11	20	7	8	20	6
Ca	125	45	30	13	50	50	15	14	7
Sr									
Ba									
Mn	0,76	0,1	0,23	0,19	0,4	0,07	0,15	0,14	0,065
Fe	4	0,5	0,5	0,42	0,62	0,44	0,5	0,5	0,48
Co									
Ni									
Cu	0,12	0,06	0,08	0,09	0,1	0,07	0,09	0,09	0,1
Zn	0,5	0,21	0,82	0,28	0,85	0,23	0,16	0,24	0,12
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	55	30	40	20	75	30	25	25	12
F	0,11	0,012	0,04		0,01		0,02	0,025	0,007
Cl	55	35	40	55		70	35	60	2
Br									
I	0,012	0,005	0,002	0,001	0,004	0,008	0,003	0,002	0,002
Se	0,010	0,018	0,005			0,014	0,003	0,005	0,003
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									

D-glucosamina									
Vit D									
Vit B1	0,11	0,05	0,035	0,04	0,08	0,04	0,018	0,055	0,035
Vit B2	0,23	0,045	0,03	0,05	0,13	0,05	0,03	0,035	0,03
Nicotinamida	0,62	0,32	0,2	0,6	0,94	0,67	0,2	0,53	0,3
Ácido pantoténico	0,25	0,26	0,17	0,23	0,5	0,2	0,24	0,31	0,1
Vit B6	0,22	0,11	0,13	0,09	0,11	0,08	0,035	0,1	0,045
Biotina	0,007	0,003	0,004			0,002	0,001	0,004	0,004
Ácido fólico	0,08	0,08	0,007	0,03	0,06	0,02	0,02	0,04	0,007
Vit C	50	45	9	5	18	20	8	25	12
Ala									
Gly									
Arg	130	100	90	40	140	15	45	18	8
His	55	25	13	20	20	8	8	13	6
Ile	120	40	25	65	50	19	19	25	10
Leu	190	55	40	75	70	40	25	30	16
Lys	160	65	50	35	80	18	26	30	15
Met	45	13	10	7	16	11	6	7	3
Phe	110	30	35	55	45	18	14	25	9
Thr	110	40	20	45	50	30	16	25	8
Trp	40		20	11	14	13	4	6	2
Tyr	80		30		25	15		12	5
Val	140	40	30	75	70	25	20	25	12
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									
Glucosa	130	2040	1870	1030	180	1920	890	1210	2210
Galactosa									

Fructosa	120	1760	1600	1030	160	1510	860	1540	6040
Sacarosa	200	310	2130	200	2570	540	55	130	2470
Lactosa									
Glicerol									
Sorbitol									510
Xilitol									
Ácido cítrico	25	100	20	10	130		20	440	16
Ácido clorogénico									
Ácido láctico	9							6	
Ácido málico	45	330	170	170	350		240	35	550
Ácido oxálico	440	6,5		10					0,5
Ácido salicílico	0,58			0,3	0,45		0,78	0,13	0,31
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3		1	16			1			
InsP_4		5	30		5	4			
InsP_5		4	60		5	5			
InsP_6		8	580		370	30			

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Pera	Membrillo	Cereza	Durazno	Ciruela	Frutilla	Arándano	Uva	Piña
Li									
Na	2	2	3	1	2	3	1	2	2
K	125	200	230	205	220	145	65	190	175
Mg	8	8	11	9	10	15	2	9	17
Ca	10	10	17	8	14	25	10	18	16
Sr									
Ba									
Mn	0,05	0,04	0,063	0,11	0,08	0,2	2,65	0,075	0,11
Fe	0,26	0,6	0,35	0,48	0,44	0,96	0,74	0,51	0,4
Co									
Ni									
Cu	0,09	0,13	0,095	0,05	0,095	0,12	0,11	0,06	0,08
Zn	0,23		0,15	0,14	0,07	0,12	0,1	0,08	0,26
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	15	20	20	25	18	30	13	20	9
F	0,012	0,006	0,018	0,02	0,002	0,025	0,002	0,014	0,014
Cl	2	2	3	3	2	14	5	2	40
Br									
I	0,002		0,001	0,001	0,001	0,001		0,001	0,005
Se	0,001							0,003	0,001
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									

D-glucosamina									
Vit D									
Vit B1	0,035	0,03	0,04	0,027	0,07	0,03	0,02	0,045	0,08
Vit B2	0,04	0,03	0,04	0,05	0,045	0,055	0,02	0,025	0,03
Nicotinamida	0,22	0,2	0,27	0,85	0,44	0,51	0,4	0,23	0,22
Ácido pantoténico	0,062		0,19	0,14	0,18	0,3	0,16	0,065	0,18
Vit B6	0,015		0,045	0,025	0,045	0,06	0,06	0,075	0,075
Biotina			0,001	0,002		0,004	0,001	0,002	
Ácido fólico	0,014		0,006	0,003	0,002	0,016	0,006	0,005	0,004
Vit C	5	13	15	10	5	65	30	4	19
Ala									
Gly									
Arg	15		14	17	8	35			
His	10		11	17	6	16			
Ile	20		16	13	10	19			
Leu	30		23	30	16	45			
Lys	30		31	30	12	35			11
Met	5		4	30	3	1			2
Phe	20		16	18	12	25			13
Thr	15		18	25	9	25			
Trp	5		8	5	2	15	10		6
Tyr	5		10	20	5	30			13
Val	25		20	40	15	25			
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									
Glucosa	1660		6930	1030	3360	2190	2460	7370	2130
Galactosa									

Fructosa	6720		6140	1230	2010	2300	3340	7530	2440
Sacarosa	1800	640	190	5720	3380	920	190	450	7830
Lactosa									
Glicerol									
Sorbitol	2170			890	1410	30	4	200	
Xilitol						30	2		
Ácido cítrico	140		13	240	35	870	525	25	630
Ácido clorogénico							120		
Ácido láctico									
Ácido málico	170	930	940	330	1220	140	850	540	95
Ácido oxálico	6,2		7,2		12	16		8	
Ácido salicílico			0,85	0,58	0,14	1,4		1,4	2,1
Ácido tartárico							0,22	530	
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6									

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Naranja	Banana	Higo	Pomelo	Kiwi	Sandía	Coco	Limón	Jugo de Piña
Li									
Na	1	1	2	2	4	1	35	3	1
K	175	395	240	180	295	160	380	150	140
Mg	14	35	20	10	25	3	39	30	12
Ca	40	9	55	18	40	10	20	11	12
Sr									
Ba									
Mn	0,03	0,53		0,013		0,11	1,31	0,03	
Fe	0,4	0,55	0,6	0,34	0,8	0,4	2,25	0,45	0,7
Co									
Ni									
Cu	0,065	0,13	0,07	0,04		0,07	3,65	0,35	0,09
Zn	0,1	0,22	0,25	0,17		0,1	0,5	0,12	
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	25	30	30	17	30	11	95	16	10
F	0,005	0,02	0,02	0,025		0,011		0,01	
Cl	4	110	18	2	65	8	120	5	0,04
Br									
I	0,002	0,003	0,002	0,001		0,001	0,001	0,001	
Se	0,004	0,004					0,81	0,065	
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									
Ácido glucurónico									

D-glucosamina									
Vit D									
Vit B1	0,08	0,045	0,045	0,05	0,017	0,045	0,06	0,05	0,05
Vit B2	0,04	0,055	0,05	0,025	0,05	0,05	0,008	0,02	0,02
Nicotinamida	0,3	0,65	0,42	0,24	0,41	0,15	0,38	0,17	0,2
Ácido pantoténico	0,24	0,23	0,3	0,25		1,6	0,2	0,27	0,1
Vit B6	0,05	0,37	0,11	0,03		0,07	0,06	0,06	0,1
Biotina	0,002	0,006							
Ácido fólico	0,024	0,02	0,007	0,011		0,005	0,03	0,006	0,002
Vit C	50	12	3	44	160	6	2	55	8
Ala									
Gly									
Arg	75	55	30	40			490	40	
His	12	75	19	6			70	10	
Ile	20	40	40	10			200	19	
Leu	30	85	55	15			310	18	
Lys	40	55	50	19			150	35	
Met	8	9	11	3			70	10	
Phe	20	35	30	10		10	180	25	
Thr	20	40	40	11			130	10	
Trp	7	18	11	4		7	40	4	
Tyr	13	20	55	7		10	120	14	
Val	35	55	50	14			220	25	
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									
Glucosa	2230	3890		2380	4490	1800		1400	3520
Galactosa									

Fructosa	2520	3710		2090	3540	3500		1350	3610
Sacarosa	3220	10400		2930	1250	2400		410	4230
Lactosa									
Glicerol									
Sorbitol									
Xilitol									
Ácido cítrico	1060	270		1370	990			4920	590
Ácido clorogénico									
Ácido láctico									
Ácido málico	160	360		180	500				130
Ácido oxálico									
Ácido salicílico	2,4		0,18	0,68	0,32	0,48		0,18	0,16
Ácido tartárico									
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6							74		

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Jugo de Manzana	Jugo de Naranja	Jugo de Pomelo	Cerveza	Vino Tinto	Vino blanco	Almendra (dulce)	Avellana	Anacardo (Castaña de cajú)
Li									
Na	2	1	1	5	3	2	22,5	2	14
K	115	170	150	40	105	95	835	635	550
Mg	4	12	8	9	10	10	170	155	265
Ca	7	15	9	4	9	10	250	225	30
Sr									
Ba									
Mn	0,12	0,03	0,01	0,03	0,2	0,14	2	6	0,84
Fe	0,26	0,27	0,57	0,04	0,6	0,6	4	3,8	2,8
Co									
Ni									
Cu	0,06	0,055	0,012	0,04	0,04	0,07	0,85	1,28	3,7
Zn	0,12	0,12	0,11	0,02	0,13	0,23	2	1,87	4,8
Cd									
Al									
NH_4^+									
HCO_3^-									
SO_4^{2-}									
SCN^-									
P	7	16	13	30	20	15	455	335	375
F	0,01			0,05	0,012	0,03	0,09	0,017	0,14
Cl	0,3		6	35	10	5	40	10	18
Br									
I	0,001		0,001	0,001			0,002	0,002	0,01
Se				0,01			0,002	0,002	
Urea									
Ácido úrico									
Histamina									

Ácido glucurónico									
D-glucosamina									
Vit D									
Vit B1	0,02	0,075	0,035	0,004			0,22	0,39	0,63
Vit B2	0,025	0,02	0,018	0,03	0,02	0,01	0,62	0,21	0,26
Nicotinamida	0,3	0,25	0,21	0,88	0,1	0,1	4,18	1,35	42
Ácido pantoténico	0,055	0,16	0,15	0,08	0,2	0,02	0,58	1,15	1,2
Vit B6	0,05	0,03	0,013	0,05	0,02	0,02	0,06	0,45	
Biotina	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01		
Ácido fólico	0,003	0,035	0,002	0,005			0,045	0,07	
Vit C	1	45	35				3,65	3	
Ala									
Gly									
Arg	2		45				2750	2030	1980
His	1		7				520	280	390
Ile	2		12				880	770	1160
Leu	4		17				1460	890	1440
Lys	5		20				580	380	750
Met	1		3				270	140	330
Phe	2		12				1160	510	900
Thr	2		12				610	400	700
Trp	1		5				170	200	450
Tyr	1		9				620	470	680
Val	3		17				1140	870	1510
Glu									
Cys									
Asp									
Ser									
Pro									
Glucosa	2400	2500	4300	13					

Galactosa									
Fructosa	6400	2600	4200						
Sacarosa	1700	3900	1600						
Lactosa									
Glicerol				200					
Sorbitol	560			2		5			
Xilitol									
Ácido cítrico	9	1000	1230	12	11	15			
Ácido clorogénico									
Ácido láctico	17			3	225	170			
Ácido málico	740	160	30	6	25	350			
Ácido oxálico				2		1,66			
Ácido salicílico	0,19		0,42			0,63	3	0,14	0,07
Ácido tartárico					150	140			
Ácido N-acetilneuramínico									
Bilirrubina									
µmol/100 g porción									
InsP_3									
InsP_4									
InsP_5									
InsP_6							3198	3545	1862

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

mg/100 g porción	Pistachos	Maní	Nuez de macadamia	Nuez de nogal (inglesa)	Nuez Pecán (Pacana)	Harina de soja	Palomitas de maíz al natural (20)	Palomitas de maíz acarameladas (19)
Li								
Na		5		2	3	4	4	56
K	1200	705	265	545	605	1870	220	75
Mg	160	165		130	140	245	81	26
Ca	135	60	50	85	75	195	10	6
Sr								
Ba								
Mn		1		2	3,5	4	0,32	0,1
Fe	7,3	2,11	0,2	2,5	2,4	12	1,1	0,4
Co								
Ni								
Cu		0,55		0,88				
Zn		3,07		2,7		5	0,7	1,7
Cd								
Al								
NH_4^+								
HCO_3^-								
SO_4^{2-}								
SCN^-								
P	500	370	200	410	290	555	170	58
F		0,13		0,68		0,11		
Cl		7		25		105	8	101
Br								
I		0,013		0,003		0,001	0,002	0,003
Se	0,45	0,002			0,003			
Urea								
Ácido úrico								

Histamina								
Ácido glucurónico								
D-glucosamina								
Vit D							0	0,00005
Vit B1	0,69	0,9	0,28	0,34	0,86	0,77	0,18	0,06
Vit B2	0,2	0,15	0,12	0,12	0,13	0,28	0,11	0,04
Nicotinamida	1,45	15	1,5	1	2	2,2	1	0,3
Ácido pantoténico		2,6		0,82		1,8	0,3	0,1
Vit B6		0,3		0,87		1	0,2	0,07
Biotina		0,035		0,0185			0,004	0,001
Ácido fólico	0,06	0,055		0,075		0,19	0,009	0,003
Vit C	7			3			0	0
Ala								
Gly								
Arg		3460		2090		3140		
His		710		360		950		
Ile		1230		670		1900		
Leu		2030		1140		2880		
Lys		1100		440		2560		
Met		310		220		580		
Phe		1540		660		1860		
Thr		850		540		1610		
Trp		320		170		480	42	12
Tyr		1190		640		1450		
Val		1450		770		1970		
Glu								
Cys								
Asp								
Ser								
Pro								

Glucosa							100	
Galactosa								
Fructosa							100	
Sacarosa						3100	900	62100
Lactosa								
Glicerol								
Sorbitol								
Xilitol								
Ácido cítrico								
Ácido clorogénico								
Ácido láctico								
Ácido málico								
Ácido oxálico								
Ácido salicílico	0,55	1,12	0,52	0,3	0,12			
Ácido tartárico								
Ácido N-acetilneuramínico								
Bilirrubina								
µmol/100 g porción								
Ins*P*$_3$								
Ins*P*$_4$						90		
Ins*P*$_5$						440		
Ins*P*$_6$	4295	3042	1435	2098	2889	2180	954	318

[a] Los números entre paréntesis corresponden al número de receta en la referencia [2].

3. Composición de fluidos del tracto gastrointestinal

Tabla E3. Composición química de los fluidos del tracto gastrointestinal en mM. Datos tomados de las referencias[12-14].

Componente	Saliva	Jugo gástrico	Jugo pancreático	Bilis vesicular	Jugo duodenal
Na	10,3 – 24,0	49	141	220	168
K	19,0 – 20,7	11,6	4,8	13,5	7,80
Mg	0,269 – 0,300	0,313 – 0,750	0,5		0,33
Ca	1,50 – 1,55	1,80 – 1,88	1,7	15,4	6,43
Fe				0,0394	0,014
Co	0 – 0,00212				
Cu	0,005	0,00157 – 0,00630			
Zn	0,0044				0,0093
NH_4^+	2,63	6,06			
HCO_3^-	2 – 13		87,5	19	63,9
SO_4^{2-}	4,01				2,10
SCN^-	1,90 – 2,13				
P	3,68 – 4,80	0,73 – 2,80	0,8		0,52
F	0,0042 – 0,013	0,021 – 0,037			0,00364
Cl	17,0 – 28,9	77,6 – 159	66,5	31	54,2
Br	0,0025 – 0,089	0,0075 – 0,11			
I	0,0008				
Urea	3,01 – 3,33	0,33 – 1,40	1,78	5,41	3,03
Ácido úrico	0,089	0,048 – 0,41	0,012		0,0079
Histamina	0,0013 – 0,157	0,000063 – 0,00043			
Ácido glucurónico		9,7			
D-glucosamina		1,53			
Ácido fólico	0,000093			0,000075	0,00003
Vit C	0,008 – 0,0125	0,0086 – 0,086			

Ala	0,135	0,235			
Gly	0,140	0,193			
Arg	0,380	0,198			
His	0,0850	0,106			
Ile	0,042	0,08			
Leu	0,012	0,129			
Lys	0,0530	0,109			
Met	0,0005	0,0109			
Phe	0,094	0,0787			
Thr	0,252	0,168			
Trp	0,0270				
Tyr	0,033	0,08			
Val	0,120				
Glu	0,0820	0,178			
Cys	0,01	0,112			
Asp	0,011	0,150			
Ser	0,063	0,185			
Pro	0,08	0,217			
Glucosa	0,144	3,61	0,735	1,92	1,14
Ácido cítrico	0,0537 – 0,104				
Ácido láctico	0,00135 – 0,56	0,333		3,39	1,17
Ácido N-acetilneuramínico		0,16			

4. Datos termodinámicos empleados para algunos componentes orgánicos

Aquí se incluyen las constantes de equilibrio para algunos componentes orgánicos del modelo, las que se adicionaron a la base termodinámica del JESS con un factor de confianza de 5 (medio). Estas fueron seleccionadas de la base IUPAC[15] teniendo en cuenta el medio (acuoso), la temperatura (cercana a 37,0 ˚C), el método empleado y el año de publicación (recientes; año de la última actualización de la base termodinámica del JESS: 2000).

Vitamina D

C27H44O L Vitamin D3 CAS 67-97-0 (6103) PF = 384,64
7-Dehydrocholesterol, Cholecalciferol

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
H+ gl KNO3 25°C 0.10M C 1999MSc (106590) 1
K(H-1L+H)=12.4

Zn++ gl KNO3 25°C 0.10M C 1999MSc (106597) 1
K(Zn+H-1L)=8.8
K(Zn+2H-1L)=16.5

Fe++ gl KNO3 25°C 0.10M C 1999MSc (106605) 2
K(Fe+H-1L)=8.5
K(Fe+2H-1L)=16.5

Fe+++ gl KNO3 25°C 0.10M C 1999MSc (106606) 3
K(Fe+H-1L)=15.5
K(Fe+2H-1L)=28.5
K(Fe+3H-1L)=34.7
*K(FeL)=-3.0

Mn++ gl KNO3 25°C 0.10M C 1999MSc (106608) 4
K(Mn+H-1L)=6.6
K(Mn+2H-1L)=12.4

REFERENCES
1999MSc A Merce,B Szpoganicz,G Bouet; J.Inorg.Biochem.,73,167 (1999)

Vitamina B1

C12H17N4OClS HL Vitamin B1 CAS 59-43-8 (2777) PF = 300,81
Thiamine, Aneurine;

Metal	Mtd	Medium	Temp	Conc	Cal	Flags	Lg K values	Reference	ExptNo
H+	gl	KNO3	35°C	0.10M	C		K1=4.97	1999DSb (83177)	1
Cu++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U	M	K1=2.69 B2=4.30	1989SRc (83181)	2
Ni++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U	M	K1=2.52 B2=4.22	1989SRc (83183)	4
Zn++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U	M	K1=2.30 B2=4.10	1989SRc (83185)	6
Co++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U	M	K1=2.36 B2=4.19	1989SRc (83187)	8

REFERENCES

1999DSb A Devi,S Satanarayana; Indian J.Chem.,38A,624 (1999)

1989SRc S Satyanarayana,K Reddy; Indian J.Chem.,28A,169 (1989)

Vitamina B2

C17H20N4O6 HL Riboflavin CAS 83-88-5 (1438) PF = 376,37

7,8-Dimethyl-10(D-1'-ribityl)isoalloxazine, Vitamin B2, Vitamin H

Metal	Mtd	Medium	Temp	Conc	Cal	Flags	Lg K values	Reference	ExptNo
H+	gl	KNO3	35°C	0.10M	U		K1=9.50 B2=13.07	1973TMa (98007)	2
Cu++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U		K1=6.53	1973TMa (98011)	2
							K(Cu+HL)=3.74		
Ni++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U		K1=4.22	1973TMa (98016)	7
							K(Ni+HL)=3.54		
Zn++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U		K1=4.16	1973TMa (98022)	13
							K(Zn+HL)=3.68		
Co++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U		K1=4.09	1973TMa (98032)	23
							K(Co+HL)=3.54		
Mn++	gl	KNO3	35°C	0.10M	U		K1=3.72	1973TMa (98039)	30
							K(Mn+HL)=3.24		

REFERENCES

1973TMa M Taqui-Khan,M Mohan; J.Inorg.Nucl.Chem.,35,1749 (1973)

Nicotinamida

C6H6N2O L Nicotinamide CAS 98-92-0 (1473) PF = 122,13

Pyridine-3-carboxylic acid amide, Vitamin PP, C5H4N.CO.NH2

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

Ni++ gl KNO3 15°C 0.10M U K1=1.54 1990BSa (44006) 4

Cd++ EMF NaNO3 25°C 0.50M U K1=0.85 B2=1.08 1977BNb (44018) 16

REFERENCES

1990BSa J Bidwell,J Stuehr; Inorg.Chem.,29,1143 (1990)

1977BNb G Budu,L Nazarova,A Thoryak; Zh.Neorg.Khim.,22,1128(618) (1977)

Ácido Pantoténico

C9H17NO5 HL Pantothenic acd CAS 63409-48-3 (2629) PF = 219,24

N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethylbutyryl)-3-aminopropanoic acid;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

Cu++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=2.60 B2=4.21 1980FMd (69042) 1

Ni++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=1.87 B2=3.07 1980FMd (69043) 2

Zn++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=1.65 1980FMd (69044) 3

Cd++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=1.75 1980FMd (69045) 4

Co++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=1.90 B2=3.07 1980FMd (69046) 5

Fe++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=1.38 1980FMd (69047) 6

Mn++ gl KCl 25°C 0.24M U K1=0.95 1980FMd (69048) 7

REFERENCES

1980FMd Y Fridman,A Moldogazieva,D Sarbaev; Zh.Neorg.Khim.,25,1868(1035) (1980)

Vitamina B6

C8H11NO3 HL Vitamin B6 CAS 65-23-6 (254) PF = 169,18

5-Hydroxy-6-methyl-3,4-pyridinedimethanol, Pyridoxine;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

H+ gl KCl 37°C 0.15M C K1=8.80 B2=13.67 1990SEa (62198) 2

Zn++ vlt NaClO4 25°C 1.0M C K1=1.72 B2= 2.93 1997KKb (62211) 5

Cd++ vlt KNO3 30°C 0.10M C M K1=1.40 B2= 2.34 1985KCb (62213) 7
B(Cd(ala)L)=5.30
B(Cd(ala)L2)=6.33
B(Cd(ala)2L)=8.25
B(Cd(gly)L)=5.20
Method: polarography. B(Cd(gly)L2)=6.26, B(Cd(gly)2L)=8.35;
B(Cd(glu)L)=5.35, B(Cd(glu)L2)=6.18, B(Cd(glu)2L)=8.40. Medium pH 8.9.

Fe+++ gl NaCl 37°C 0.15M U 1984ABd (62219) 13
K(Fe+HL)=4.69
K(Fe+OH+HL)=15.73
K(Fe+2OH+HL)=25.48
K(Fe+2OH+2HL)=27.89

REFERENCES
1997KKb F Khan,F Khan; J.Indian Chem.Soc.,74,171 (1997)
1990SEa N Shuaib,M El-Ezaby,R Ghodsian; Polyhedron,9,629 (1990)
1985KCb R Kumari,C Chandel,C Gupta; J.Indian Chem.Soc.,62,740 (1985)
1984ABd A Agranovich,A Borisova et al; Zh.Neorg.Khim.,29,1763(1012) (1984)

Ácido Fólico

C19H19N7O6 H3L Folic acid CAS 75708-92-8 (194) PF = 441,40
Pteroylglutamic acid;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ vlt NaClO4 25°C 0.15M C K1=4.78 B2= 8.40 1989EGa (101058) 1
B3=13.46
Method: DPASV. Medium: 0.15 M NaClO4, 0.002 M phosphate, pH 7.4.

Cd++ vlt NaClO4 25°C 0.15M C K1=5.56 B2= 9.87 1989EGa (101064) 7
B3=16.63
Method: differential pulse polarography. Medium pH = 7.4.

Co++ sp KNO3 25°C 0.20M C 1996TFa (101066) 9
K(Co+HL)=0.90
*K(CoHL)=-5.70

REFERENCES
1996TFa A Thomas,M Feliz,A Capparelli; Transition Met.Chem.,21,317 (1996)
1989EGa N El-Maali,M Ghandour,G Patriarche; Electroanalysis,1,87; 1,341 (1989)

Vitamina C

C6H8O6 H2L Ascorbic acid CAS 50-81-7 (285) PF = 176,13
Ascorbic acid (Vitamin C);

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ gl KNO3 25°C 0.10M M 1976JBa (46307) 4
K(Cu+HL)=2.32
K(Cu+H+HL)=3.94
K(2Cu+2HL=Cu2H2L2)=6.33
K(2Cu+2HL=Cu2L2+2H)=0.05

Mg++ gl NaClO4 20°C 1.00M M 1983MOa (46327) 24
K(Mg+HL)=0.98
K(Mg+2HL)=1.85

Ba++ gl NaClO4 20°C 1.00M M 1983MOa (46332) 29
K(Ba+HL)=1.03
K(Ba+2HL)=1.85

Sr++ gl NaClO4 20°C 1.00M M 1983MOa (46363) 60
K(Sr+HL)=1.02
K(Sr+2HL)=1.97

REFERENCES
1992ONa L Ohman,A Nordin; Acta Chem.Scand.,46,515 (1992)
1988MOa J Maslowska,A Owczarek; Pol.J.Chem.,62,75 (1988)
1983MOa J Maslowska,A Owczarek; Pol.J.Chem.,57,719 (1983)
1976JBa R Jameson,N Blackburn; J.Chem.Soc.,Dalton Trans.,534 (1976)

Arginina

C6H14N4O2 HL Arginine CAS 74-79-3 (40) PF = 174,20
2-Amino-5-guanidopentanoic acid; H2N.CH((CH2)3.NH.C(:NH)(NH2)COOH

Cd++ vlt KNO3 25°C 1.0M C M K1=3.60 B2= 6.30 1997KKb (51865) 34
B3=9.11
B(CdAL)=4.40
B(CdA2L)=7.01
B(CdAL2)=10.00
Method: polarography. HA is pyridoxine (vitamin B6). Medium pH 8.50.

REFERENCES
1997KKb F Khan,F Khan; J.Indian Chem.Soc.,74,171 (1997)

Histidina

C6H9N3O2 HL Histidine CAS 71-00-1 (1) PF = 155,16
2-Amino-3-(4'-imidazolyl)propanoic acid; H2N.CH(CH2.C3H3N2)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---

Cu++ gl NaClO4 37°C 0.15M U M 1995NAc (47993) 14
B(CuLZn)=14.61
B(CuL2Zn)=21.96
B(CuH-1L2Zn)=16.16
B(CuHL2Ni)=27.96
B(CuL2Ni)=23.30, B(CuH-1L2Ni)=16.17, B(CuH-2L2Ni)=8.11.

Ni++ gl NaClO4 37°C 0.15M U M 1995NAc (48079) 98
B(NiLZn)=11.75
B(NiL2Zn)=19.82
B(NiH-1L2Zn)=13.06
B(NiH-1LZn)=5.28

Al+++ gl oth/un 25°C 0.10M C K1=7.21 2005DCb (48262) 280
B(AlHL)=12.15
B(AlHL2)=20.1
B(Al2H-1L)=6.15
Medium: 0.10 M LiCl. Ligand is the S conformer.

Al+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U T HM K1=10.37 B2=15.70 2004KFa (48263) 281
Data for 25-55 C. DH(K1)=-56.7 kJ mol-1, DS(K1)=177 J K-1 mol-1.

Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C 2002DCa (48264) 282
B(Al2H-2L)=1.163

Fe+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U T HM K1=12.90 B2=24.86 2004KFa (48293) 311
Data for 25-55 C. DH(K1)=-111 kJ mol-1, DS(K1)=204 J K-1 mol-1.

REFERENCES
2005DCb P Djurdjevic,M Cvijovic,J Zakrzewska; J.Coord.Chem.,58,1615 (2005)
2004KFa M Khalil,A Fazary; Monatsh.Chem.,135,1455 (2004)
2002DCa S Dayde,D Champmartin,G Berthon; Inorg.Chim.Acta,339,513 (2002)
1995NAc M Nair,P Arasu,S Mansoor,P Shenbagavalli; Indian J.Chem.,34A,365 (1995)

Lisina

C6H14N2O2 HL Lysine CAS 56-87-1 (41) PF = 146,19
2,6-Diaminohexanoic acid; H2N.(CH2)4.CH(NH2)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Zn++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=5.76 B2=10.71 2004KFa (51667) 35

Co++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=4.45 B2= 8.65 2004KFa (51681) 49

Al+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=5.76 B2= 9.48 2004KFa (51687) 55

Fe+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=9.56 B2=18.48 2004KFa (51696) 64

REFERENCES
2004KFa M Khalil,A Fazary; Monatsh.Chem.,135,1455 (2004)

Metionina

C5H11NO2S HL Methionine CAS 63-68-3 (42) PF = 149,21
2-Amino-4-(methylthio)butanoic acid; H2N.CH(CH2.CH2.S.CH3)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Zn++ vlt NaClO4 25°C 1.0M C M K1=4.38 B2= 8.36 1997KKb (41672) 47
B3=11.73
B(ZnAL)=4.52
B(ZnA2L)=8.72
B(ZnAL2)=11.92
Method: polarography. HA is pyridoxine (vitamin B6). Medium pH 8.50.

Cd++ vlt KNO3 25°C 1.0M C M K1=3.69 B2= 7.00 1997KKb (41695) 70
B3=9.23
B(CdAL)=4.43
B(CdA2L)=7.39
B(CdAL2)=10.21
Method: polarography. HA is pyridoxine (vitamin B6). Medium pH 8.50.

REFERENCES
1997KKb F Khan,F Khan; J.Indian Chem.Soc.,74,171 (1997)

Fenilalanina

C9H11NO2 HL Phenylalanine CAS 63-91-2 (2) PF = 165,19
2-Amino-3-phenylpropanoic acid; H2N.CH(CH2.C6H5)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ gl NaCl 37°C 0.15M C B(CuHL)=9.81 1997KAa (66945) 10

Ni++ gl KNO3 25°C 0.70M C K(Ni+OH+L)=9.08 1992AAc (67010) 69

REFERENCES
1997KAa S Khaleif,G Anderegg; Inorg.Chim.Acta,257,225 (1997)
1992AAc J Alvarez Salgado,J Antelo,F Arce; An.Quim.,88,167 (1992)

Treonina

C4H9NO3 HL Threonine CAS 72-19-5 (48) PF = 119,12
2-Amino-3-hydroxybutanoic acid; H2N.CH(CH(OH).CH3)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C 2002DCa (34780) 109
B(Al2H-2L)=-0.177

REFERENCES
2002DCa S Dayde,D Champmartin,G Berthon; Inorg.Chim.Acta,339,513 (2002)

Triptofano

C11H12N2O2 HL Tryptophan CAS 73-22-3 (3) PF = 204,23
2-Amino-3-(3-indolyl)propanoic acid; H2N.CH(CH2.C8H6N)COOH

Zn++ vlt NaClO4 25°C 1.0M C M K1=5.00 B2= 9.60 1997KKb (79542) 56
B3=12.30
B(ZnAL)=5.20
B(ZnA2L)=9.85
B(ZnAL2)=12.50
Method: polarography. HA is pyridoxine (vitamin B6). Medium pH 8.50.

Cd++ vlt KNO3 30°C 1.0M C M K1=4.40 B2= 7.40 1986KCb (79575) 89
B3=10.50
B(CuAL)=5.18
B(CuA2L)=5.59
B(CuAL2)=8.25
Method: polarography. Medium pH 8.5. H2A is ascorbic acid.
By potentiometry, K(H+L)=9.65

REFERENCES
1997KKb F Khan,F Khan; J.Indian Chem.Soc.,74,171 (1997)
1986KCb R Kumari,C Chandel,C Gupta; Indian J.Chem.,25A,877 (1986)

Tirosina

C9H11NO3 H2L Tyrosine CAS 60-18-4 (4) PF = 181,19
2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid; HO.C6H4.CH2.CH(NH2).COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ gl KNO3 25°C 0.10M M M 2006SMb (67290) 1
K(Cu+HL=CuH-1L+2H)=-8.20

Co++ gl KNO3 35°C 0.10M C M 1997PSb (67367) 77
K(Co+HL)=4.05

Zn++ vlt NaClO4 25°C 1.0M C M 1997KKb (67342) 52
K(Zn+HL)=4.15
K(Zn+2HL)=8.28
K(Zn+3HL)=11.00
K(Zn+HL+A)=4.30
Method: polarography. K(Zn+HL+2A)=8.45, K(Zn+2HL+A)=11.30.
HA is pyridoxine (vitamin B6). Medium pH 8.50.

Cd++ vlt KNO3 25°C 1.0M C M 1997KKb (67359) 69
K(Cd+HL)=3.54
K(Cd+2HL)=6.11
K(Cd+3HL)=9.00
K(Cd+HL+A)=4.32
Method: polarography. K(Cd+HL+2A)=6.85, K(Cd+2HL+A)=9.71.
HA is pyridoxine (vitamin B6). Medium pH 8.50.

REFERENCES
2006SMb A Silva,A Merce,A Mangrich,J Felcman; Polyhedron,25,1319 (2006)
1997KKb F Khan,F Khan; J.Indian Chem.Soc.,74,171 (1997)

Valina

C5H11NO2 HL Valine CAS 72-18-4 (43) PF = 117,15
2-Amino-3-methylbutanoic acid; H2N.CH(CH(CH3)2)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

Cu++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M 2004SSa (41179) 4
B(CuH-1L)=1.68
B(CuH-2L)=-10.10

Zn++ gl KNO3 35°C 0.10M C M 1998ZWa (41262) 79
B(ZnH-1L2)=0.95
B(ZnH-2L2)=-8.19

Cd++ gl KNO3 35°C 0.10M C M K1=3.82 B2= 6.93 1998ZWa (41287) 104
B(CdH-1L2)=-1.98
B(CdH-2L2)=-11.32

Al+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=5.83 B2= 9.58 2004KFa (41320) 136

Fe+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=10.25 B2=19.22 2004KFa (41342) 157

REFERENCES
2004KFa M Khalil,A Fazary; Monatsh.Chem.,135,1455 (2004)
2004SSa M Shehata,M Shoukry,M Bakarat; J.Coord.Chem.,57,1369 (2004)
1998ZWa Y-S Zhang,Z-M Wang,H-K Lin,S-R Zhu; Chem.J.of Chin.Univ.,19,1992 (1998)

Glucosa

C6H12O6 L D-Glucose CAS 492-62-6 (1560) PF = 180,16

Metal	Mtd	Medium	Temp	Conc	Cal	Flags	Lg K values	Reference	ExptNo
Cu++	ISE	KNO3	25°C	0.70M	U		K1=-0.82	1986HAe	(50344) 1

REFERENCES
1986HAe J Haas; Marine Chem.,19,299 (1986)

Galactosa

C6H12O6 L D-Galactose CAS 59-23-4 (1559) PF = 180,16

Metal	Mtd	Medium	Temp	Conc	Cal	Flags	Lg K values	Reference	ExptNo
Cu++	ISE	KNO3	25°C	0.70M	U		K1=-0.62	1986HAe	(50326) 1

REFERENCES
1986HAe J Haas; Marine Chem.,19,299 (1986)

Fructosa

C6H12O6 L D-Fructose CAS 57-48-7 (1561) PF = 180,16
D-Fructose

Metal	Mtd	Medium	Temp	Conc	Cal	Flags	Lg K values	Reference	ExptNo
H+	gl	KCl	20°C	0.15M	M	M	K(H-1L+H)=12.34	1985KPc	(50303) 1
Cu++	ISE	KNO3	25°C	0.70M	U		K1=-0.59	1986HAe	(50304) 1

REFERENCES
1985KPc I Kalinichenko,N Petrovskaya; Zh.Obshch.Khim.,55,840 (1985)
1986HAe J Haas; Marine Chem.,19,299 (1986)

Sacarosa

C12H22O11 L Sucrose CAS 57-50-1 (2523)
beta-D-Fructofuranosyl-alpha-D-glucopyranoside; Saccharose;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
H+ nmr NaCl 25°C 1.0M C 2006PSa (84346) 1
K(H-1L+H)=13.1
Method C-13 NMR

Cu++ vlt NaNO3 25°C 3.0M U 1995NVa (84349) 1
B(CuL(OH)2)=17.6
B(CuL(OH)3)=19.4
B(CuL2(OH)2)=19.6
Method: DC polarography, pH > 9. Ligand may be anion of sucrose?

REFERENCES
2006PSa K Popov,N Sultanova et al; Food Chem.,96,248 (2006)
1995NVa E Norkus,A Vaskelis,R Vaitkus et al; J.Inorg.Biochem.,60,299 (1995)

Lactosa

C12H22O11 L alpha-Lactose CAS 5989-81-1 (2486)
4-D-Beta-D-Galactopyranosyl-alpha-D-glucose;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ ISE KNO3 25°C 0.70M U K1=-0.80 1986HAe (84311) 1

Fe+++ sp NaClO4 25°C 0.30M C K1=2.40 1983ZGa (84317) 7

REFERENCES
1986HAe J Haas; Marine Chem.,19,299 (1986)
1983ZGa I Zay,F Gaizer,K Burger; Inorg.Chim.Acta,80,L9 (1983)

Glicerol

C3H8O3 L Glycerol CAS 56-81-5 (2707) PF = 92,09
Propane-1,2,3-triol; HO.CH2.CH(OH).CH2.OH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
H+ cal NaClO4 25°C 3.0M C H 1983BIa (28063) 1
K(H-1L+H)=14.76
DH(H-1L+H2O=L+OH-)=-20.89 kJ mol-1.

REFERENCES
1983BIa E Bottari,P Ippoliti,R Porto; Ann.Chim.(Rome),73,473 (1983)

Sorbitol

C6H14O6 L Glucitol CAS 50-70-4 (2878) PF = 182,17
D-Sorbitol;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
H+ EMF NaCl 25°C 3.0M C 1981VIa (51965) 1
K(H-1L+H)=13.56
Method: Pt/H2 electrode.

Cu++ ISE KNO3 25°C 0.70M U K1=-0.11 1986HAe (51966) 1

Ca++ ISE KNO3 25°C 0.70M U K1=-0.52 1986HAe (51967) 2

Fe+++ gl KNO3 25°C 0.10M C 1999CMa (51976) 11
B(FeH-1L)=2.0
B(FeH-2L)=-2.8
B(FeH-3L)=-4.9
B(FeH-4L)=-14.0
B(Fe3H-9L)=-12.8, B(Fe3H-10L)=-23.1, B(Fe6H-6L)=3.1, B(Fe6H-18L)=-24.2,
B(Fe6H-24L)=-90.

REFERENCES
1999CMa D Chen,A Martell,R Motekaitis; Inorg.Chim.Acta,293,206 (1999)
1986HAe J Haas; Marine Chem.,19,299 (1986)
1981VIa M Vicedomini; Ann.Chim.(Rome),71,213 (1981)

Xilitol

C5H12O5 L Xylitol CAS 87-99-0 (2139) PF = 152,15

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ ISE KNO3 25°C 0.70M U K1=-0.17 1986HAe (42337) 1

Ca++ ISE KNO3 25°C 0.70M U K1=-0.54 1986HAe (42338) 2

REFERENCES
1986HAe J Haas; Marine Chem.,19,299 (1986)

Ácido cítrico

C6H8O7 H3L Citric acid CAS 77-92-9 (95) PF = 192,13
2-Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid; HOOCCH2.CH(OH)(COOH).CH2COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Ca++ gl NaClO4 25°C 0 C I 2001CTc (46632) 74
Kso(Ca3L2.4H2O)=-17.81
Extrapolated over the range 3.5 to 0.1 mol kg-1

Fe++ gl NaCl 25°C 1.0M C 2000KKc (46794) 234
B(FeH-1L2)=-0.86

K+ gl R4N.X 25°C 0.1M U IH K1=0.84 2005ZZa (46851) 289
K(2K+L)=1.09
Medium: Et4NCl. For 0.3 mol/L K1=0.72; K(2K+L)=0.92

REFERENCES
2005ZZa T Zelenina,O Zelenin; Koord.Khim.,31,253 (2005)
2001CTc L Ciavatta,G de Tommaso,M Iuliano; Anal.Lett.,34,1053 (2001)
2000KKc L Konigsberger,E Konigsberger,P May; J.Inorg.Biochem.,78,175 (2000)

Ácido clorogénico

C16H18O9 HL Chlorogenic acd CAS 327-97-9 (2844) PF = 354,31
3-(3',4'-Dihydroxycinnamoyl)-1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexane carboxylic acid;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Cu++ gl KNO3 20°C 1M U K1=12.74 B2=23.35 1996AAa (95502) 1
B(CuHL)=16.92

Cu++ gl KCl 25°C 0.20M C K1=13.6 B2=24.2 1989KNa (95503) 2
K(Cu+H2L)=2.18
K(Cu+CuL)=3.15
K(2CuL+L)=13.36

Zn++ gl KNO3 20°C 1M U K1=8.79 B2=16.20 1996AAa (95505) 4
*B(ZnL2(H2O))=4.30
*B(ZnL2(H2O)2)=-8.05

Al+++ gl KCl 25°C 0.10M C 2002AOa (95506) 5
B(-2,1,1)=-3.91
B(-3,1,1)=-8.17
B(-4,1,1)=-13.79
B(-6,1,2)=-19.28
B(-7,1,2)=-27.65, B(-9,1,3)=-34.01.
B(p,q,r): pH+qAl+rH3L=HpAlq(H3L)r

Fe+++ gl KNO3 20°C 1M U K1=17.64 1996AAa (95507) 6
B(FeHL)=22.20

Mn++ gl KNO3 20°C 1M U K1=7.02 B2=12.13 1996AAa (95508) 7

REFERENCES
2002AOa M Adams,B O'Sullivan,K Powell; J.Chem.Eng.Data,47,289 (2002)
1996AAa J Ameziane,M Aplincourt,L Dupon et al; Bull.Soc.Chim.Fr.,133,243 (1996)
1989KNa T Kiss,G Nagy,M Pecsi et al; Polyhedron,8,2345 (1989)
1985LSb I Lamy,M Seywert et al; Anal.Chim.Acta,176,201 (1985)

Ácido málico

C4H6O5 H2L Malic acid CAS 617-48-1 (393) PF = 134,09
2-Hydroxybutane-1,4-dioic acid, Hydroxy-succinic acid; HOOC.CH2.CH(OH).COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Co++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M K1=3.13 2005TKa (31007) 60

Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C K1=4.519 2001VBa (31015) 68
B(AlHL)=7.032
B(AlHL2)=10.981
B(AlH-1L)=1.268
B(Al2H-2L)=0.564
B(Al2H-3L)=-3.054, B(Al2H-3L2)=1.779, B(Al2H-4L2)=-4.462,
B(Al2H-1L3)=12.789, B(Al3H-4L4)=10.132, B(Al4H-5L4)=10.537.

REFERENCES
2005TKa M Taha,M Khalil,S Mohamed; J.Chem.Eng.Data,50,882 (2005)
2001VBa M Venturini-Soriano,G Berthon; J.Inorg.Biochem.,85,143 (2001)

Ácido oxálico

C2H2O4 H2L Oxalic acid CAS 144-62-7 (24) PF = 90,04
Ethanedioic acid; (COOH)2

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Ca++ ISE NaCl 25°C 0.10M C K1=2.46 2005SCb (18789) 121
B(CaHL)=5.61
Method: Ca ion selective electrode

Ca++ EMF none 37°C 0 C TI 1997KTa (18791) 123
For mono-hydrate: Kso = 8.65(37 C)
For dihydrate: Kso = 8.17

Fe+++ cal NaNO3 25°C 0.5M U K1=7.53 B2=13.64 2000KPb (19015) 342
K3=4.85
DH1=+3.43; DH2=-0.1; DH3=-3.07 kJ/mol

REFERENCES
2005SCb H Sari,A Covington; J.Chem.Eng.Data,50,1620 (2005)
2000KPb E Kozlovskii,D Pyreu; Zh.Neorg.Khim.45,2108 (2000)
1997KTa E Konigsberger,L-C Tran-Ho; Curr.Topics Soln.Chem.,2,183 (1997)

Ácido tartárico

C4H6O6 H2L L-Tartaric acid CAS 87-69-4 (92) PF = 150,1
L-Tartaric acid, L-2,3-Dihydroxybutanedioic acid; HOOC.CH(OH).CH(OH).COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C K1=3.788 2000DDb (31627) 88
B(AlH-1L)=1.165
B(Al2H-1L2)=7.976
B(Al2H-2L2)=5.347
B(Al2H-3L2)=1.009
B(Al2H-4L2)=-5.101

REFERENCES
2000DDb S Desroches,S Dayde,G Berthon; J.Inorg.Biochem.,81,301 (2000)

D-Glucosamina

C6H13NO5 L D-Glucosamine CAS 3416-24-8 (565)) PF = 179.17
2-Amino-2-deoxyglucose;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

H+ gl NaCl 37°C 0.15M U K1=7.27 1985AIb (51272) 4

Cu++ gl NaCl 37°C 0.15M U M K1=3.54 1986AIc (51278) 3
K(Cu+L+OH)=11.56
B(Cu(OH)2L2)=20.96
K(Cu+L+2OH)=18.50

Ni++ gl NaNO3 25°C 0.10M U I K1=2.65 B2=5.61 1984GMa (51286) 11

Co++ gl NaNO3 25°C 0.10M U I K1=1.71 B2=4.76 1984GMa (51289) 14

Fe++ gl NaNO3 25°C 0.05M C K1=8.01 2004FSa (51290) 15
B(FeHL)=9.02

B(FeH-1L)=3.21

Fe+++ gl NaCl 37°C 0.15M U 1987IAa (51291) 16
B(Fe(OH)L)=19.15
B(Fe(OH)2L)=30.05

Fe+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U I K1=8.47 B2=15.10 1984GMa (51292) 17

REFERENCES
2004FSa E Ferrari,M Saladini; J.Inorg.Biochem.,98,1002 (2004)
1987IAa E Isaeva,A Agranovich et al; Izv.Akad.Nauk(USSR),4,937 (1987)
1986AIc A Agranovich,E Isayeva et al; Zh.Neorg.Khim.,31,409 (1986)
1985AIb A Agranovich,E Isayeva et al; Vestnik Moskov Univ.,26(6)571 (1985)
1984GMa M Genchev,S Manolov,S Zekov; Koord.Khim.,10,168 (1984)

Histamina

C5H9N3 L Histamine CAS 51-45-6 (103) PF = 111,15
4(5)-(2'-Aminoethyl)imidazole; C3H3N2.CH2.CH2.NH2

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Ni++ gl NaClO4 37°C 0.15M C M K1=6.36 B2=11.22 1993NAa (40071) 68
B(NiHL)=11.85
B(NiHL2)=17.86

Ca++ gl NaNO3 25°C 0.10M U K1=5.5 B2= 9.80 1993GAa (40112) 109

Mg++ gl NaNO3 25°C 0.10M U K1=5.15 B2= 9.50 1993GAa (40135) 132

REFERENCES
1993GAa M Ghandour,E Aboul-Kasim,A Amrallah; J.Indian Chem.Soc.,70,615 (1993)
1993NAa M Nair,P Arasu,M Pillai et al; J.Chem.Soc.,Dalton Trans.,917 (1993)

Ácido glucurónico

C6H10O7 HL Glucuronic acid CAS 6556-12-3 (599) PF = 194,14
D-Glucuronic acid;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
H+ gl R4N.X 25°C 0 M I K1=3.22 1996GMb (49161) 2
In Et4NCl: K1=3.05 (I=0.11 M), 3.04(0.48 M), 3.35(1.85 M).

Cu++ gl NaClO4 25°C 0.74M U K1=1.01 B2= 4.10 1982PMb (49167) 2

Ni++ gl NaCl 25°C 0.15M C K1=7.98 B2=13.83 2005CMa (49170) 5
K(Ni+L+2OH)=16.78

Zn++ gl R4N.X 25°C 0 M I K1=1.80 B2=3.3 1996GMb (49172) 7
At I=0.16 M: K1=1.43, B2=2.8

Ca++ gl R4N.X 25°C 0 M I K1=1.17 1996GMb (49173) 8
At I=0.16 M: K1=0.78

Cd++ gl R4N.X 25°C 0 M I K1=2.52 B2=4.2 1996GMb (49176) 11
At I=0.16 M: K1=2.16, B2=3.7

Co++ gl NaNO3 20°C 0.10M C 1994ESa (49178) 13
B(CoH-2L)=-15.0

Mg++ gl R4N.X 25°C 0 M I K1=1.03 1996GMb (49179) 14
At I=0.16 M: K1=0.65

Na+ gl R4N.X 25°C 0 M I K1=-0.09 1996GMb (49185) 20
At I=0.16 M: K1=-0.25

REFERENCES
2005CMa I Cukrowski,D Mogano,J Rijn Zeevaart; J.Inorg.Biochem.,99,2308 (2005)
1996GMb A Gianguzza,F Maggio,S Sammartano; Chem.Speciation and Bioavail.,8,17 (1996)
1994ESa G Escandar,L Sala,M Sierra; Polyhedron,13,143 (1994)
1982PMb R Payne,R Magee; Proc.Indian Acad.Sci.,91,31 (1982)

Glicina

C2H5NO2 HL Glycine CAS 56-40-6 (85) PF = 75,07
2-Aminoethanoic acid; H2N.CH2.COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Al+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=5.92 B2=10.27 2004KFa (21678) 556

Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C 2002DCa (21679) 557
B(Al2H-2L)=0.361

Al+++ gl KCl 25°C 0.20M C K1=5.91 1997KSa (21680) 558
B(AlH-1L)=1.08
B(Al2H-1L)=4.35

REFERENCES
2004KFa M Khalil,A Fazary; Monatsh.Chem.,135,1455 (2004)
2002DCa S Dayde,D Champmartin,G Berthon; Inorg.Chim.Acta,339,513 (2002)
1997KSa T Kiss,I Sovago,I Toth; J.Chem.Soc.,Dalton Trans.,1967 (1997)

Ácido glutámico

C5H9NO4 H2L Glutamic acid CAS 56-86-0 (22) PF = 147,13
2-Aminopentanedioic acid; H2N.CH(CH2.CH2.COOH)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Ni++ gl NaCl 25°C 0.15M C M 1999SMa (39548) 51
B(NiH-1L)=-3.21
B(NiH2L2)=24.58
B(NiH4L2)=33.51
B(NiH4L3)=42.33.

Co++ gl KCl 30°C 0.16M U I K1=4.62 B2= 8.06 2001BRa (39628) 131

Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C 2003DBa (39655) 158
B(AlH2L)=15.015
B(Al2H-1L)=6.680
B(AlHL2)=18.850
B(AlH2L2)=23.425
B(Al3H-4L2)=3.810, B(Al3H-4L3)=11.220.

Fe+++ gl NaNO3 25°C 0.50M C K1=11.82 B2=19.80 1997DJb (39677) 180
B(FeHL)=15.38
B(FeH-1L)=8.58
B(Fe2H-2L)=10.51

REFERENCES
2003DBa S Dayde,V Brumas,D Champmartin,G Berthon; J.Inorg.Biochem.,97,104 (2003)
2001BRa M Babu,G Rao,K Ramana,M Rao; Indian J.Chem.,40A,1334 (2001)
1999SMa N Shuaib,H Marafie,O Al-Fulaij; J.Chem.Eng.Data,44,1348 (1999)
1997DJb P Djurdjevic,R Jelic; Transition Met.Chem.,22,284 (1997)

Ácido aspártico

C4H7NO4 H2L Aspartic acid CAS 56-84-8 (21) PF = 133,10
Aminobutanedioic acid; H2N.CH(CH2.COOH).COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo
---
Ni++ gl NaNO3 25°C 0.10M C 2000MSa (32128) 58
B(NiH-1L)=-1.77

Co++ gl NaNO3 25°C 0.10M C 2000MSa (32232) 162
B(CoH-1L)=-3.33

Al+++ gl KCl 25°C 0.20M C 1997KSa (32257) 187
B(AlH-1L)=3.30
B(AlH-2L)=-2.32

Ba++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M K1=3.75 2000KAb (32263) 193

Sr++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M K1=3.93 2000KAb (32393) 323

REFERENCES

2000KAb M Khalil,A Attia; J.Chem.Eng.Data,45,1108 (2000)
2000MSa G Mukherjee,H Sahu; J.Indian Chem.Soc.,77,209 (2000)
1997KSa T Kiss,I Sovago,I Toth; J.Chem.Soc.,Dalton Trans.,1967 (1997)

Serina

C3H7NO3 HL Serine CAS 56-45-1 (49) PF = 105,09
2-Amino-3-hydroxypropanoic acid; H2N.CH(CH2.OH)COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

Cu++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M 2004SSa (27274) 4
B(CuH-1L)=1.08
B(CuH-2L)=-9.31

Al+++ gl NaNO3 25°C 0.10M U M K1=5.67 B2= 9.31 2004KFa (27443) 173

Al+++ gl NaCl 37°C 0.15M C 2002DCa (27444) 174
B(Al2H-2L)=0.198

Fe+++ gl NaNO3 25°C 0.50M C 1997DJb (27464) 194
B(FeHL)=10.80
B(FeH-1L)=5.20
B(FeH-1L2)=12.87
B(FeH-2L)=2.76
B(Fe2H-2L2)=14.50.

REFERENCES

2004KFa M Khalil,A Fazary; Monatsh.Chem.,135,1455 (2004)
2004SSa M Shehata,M Shoukry,M Bakarat; J.Coord.Chem.,57,1369 (2004)
2002DCa S Dayde,D Champmartin,G Berthon; Inorg.Chim.Acta,339,513 (2002)
1997DJb P Djurdjevic,R Jelic; Transition Met.Chem.,22,284 (1997)

Prolina

C5H9NO2 HL Proline CAS 147-85-3 (44) PF = 115,13
Pyrrolidine-2-carboxylic acid; C4H8N.COOH

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

Cu++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M 2004SSa (39116) 3
B(CuH-2L)=-10.35

Cd++ gl KNO3 35°C 0.10M C 1998ZWa (39172) 59
B(CdH-1L2)=-1.56

REFERENCES
2004SSa M Shehata,M Shoukry,M Bakarat; J.Coord.Chem.,57,1369 (2004)
1998ZWa Y-S Zhang,Z-M Wang,H-K Lin,S-R Zhu; Chem.J.of Chin.Univ.,19,1992 (1998)

Ácido N-acetilneuramínico

C11H19NO9 HL CAS 131-48-6 (8730) PF = 309,27
5-Amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulosic acid;

Metal Mtd Medium Temp Conc Cal Flags Lg K values Reference ExptNo

---

H+ gl NaNO3 25°C 0.10M C K1=2.70 2002SMc (81089) 1

Cu++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M K1=3.57 B2= 6.70 2002SMc (81090) 1
B(CuH-1L2)=-1.6

Cd++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M K1=3.60 B2= 6.67 2002SMc (81091) 2
B(CdH-1L2)=-2.31

Co++ gl NaNO3 25°C 0.10M C M K1=3.84 B2= 6.70 2002SMc (81092) 3
B(CoH-1L2)=-1.3

REFERENCES
2002SMc M Saladini,L Menabue,E Ferrari; J.Inorg.Biochem.,88,61 (2002)

5. Concentraciones de los componentes en cada compartimento

Se partió de los siguientes datos de entrada:

V_{ing} volumen de ingesta total en mL

m_i masa ingerida del alimento *i* en g

Se utilizaron, asimismo, los siguientes parámetros ajustables:

t_{boca} tiempo de estadía en la boca en minutos

t_{est} tiempo de estadía en el estómago en minutos

t_{duo} tiempo de estadía en el duodeno en minutos

S_{sal} velocidad de secreción de saliva en mL/min

S_{gas} velocidad de secreción de jugo gástrico en mL/min

S_{pan} velocidad de secreción de jugo pancreático en mL/min

V_{ay} volumen inicial en el estómago en mL

V_{bil} volumen de bilis vesicular en mL

y se hizo uso de los siguientes datos recabados:

$[X]_{sal}$ concentración en mM del componente X en la saliva

$[X]_{gas}$ concentración en mM del componente X en el jugo gástrico

$[X]_{pan}$ concentración en mM del componente X en el jugo pancreático

$[X]_{bil}$ concentración en mM del componente X en la bilis vesicular

$[X]_i$ concentración en mg/100 g del componente X en el alimento *i*

PF_X peso fórmula del componente X

$[P]_i$ concentración en µmol/100 g de Ins*P* en el alimento *i*

Se estimaron entonces las concentraciones en mM de cada componente del sistema en el estómago y el duodeno. Para X, cualquier componente excepto inositol fosfato, y P, cualquier inositol fosfato presente en los alimentos, se tiene:

$$[X]_{est} = \frac{\{[X]_{sal}(t_{boca})(S_{sal}) + [X]_{gas}[(t_{est})(S_{gas}) + V_{ay}]\}(1x10^{-3}) + \sum_i \frac{[X]_i(m_i)}{(PF_X)(100)}}{[V_{ing} + (t_{boca})(S_{sal}) + (t_{est})(S_{gas}) + V_{ay}](1x10^{-3})}$$

$$[X]_{duo} = \frac{\{[X]_{sal}(t_{boca})(S_{sal}) + [X]_{gas}[(t_{est})(S_{gas}) + V_{ay}] + [[X]_{pan}(t_{duo})(S_{pan}) + [X]_{bil}(V_{bil})]\}(1x10^{-3}) + \sum_i \frac{[X]_i(m_i)}{(PF_X)(100)}}{[V_{ing} + (t_{boca})(S_{sal}) + (t_{est})(S_{gas}) + V_{ay} + (t_{duo})(S_{pan}) + V_{bil}](1x10^{-3})}$$

$$[P]_{est} = \frac{\sum_i \frac{[P]_i(m_i)}{(1x10^5)}}{[V_{ing} + (t_{boca})(S_{sal}) + (t_{est})(S_{gas}) + V_{ay}](1x10^{-3})}$$

$$[P]_{duo} = \frac{\sum_i \frac{[P]_i(m_i)}{(1x10^5)}}{[V_{ing} + (t_{boca})(S_{sal}) + (t_{est})(S_{gas}) + V_{ay} + (t_{duo})(S_{pan}) + V_{bil}](1x10^{-3})}$$

en donde,

$[X]_{est}$ concentración en mM del componente X en el estómago

$[X]_{duo}$ concentración en mM del componente X en el duodeno

$[P]_{est}$ concentración en mM del inositol fosfato P en el estómago

$[P]_{duo}$ concentración en mM del inositol fosfato P en el duodeno

Las concentraciones totales en estómago y duodeno, para una ingesta constituida por 50 g de cereal y 200 g de leche entera, son las que se detallan en la tabla E4.

Tabla E4. Concentraciones totales en mM de los componentes del sistema en estómago y duodeno, para ingestas conteniendo 50 g de cereal y 200 g de leche entera.

Componente	Cereal de Maíz		Cereal de salvado	
	Estómago	Duodeno	Estómago	Duodeno
Na	68,07	91,06	90,05	108,0
K	26,36	22,11	43,59	35,38
Mg	2,55	2,04	15,54	12,05
Ca	12,03	10,74	13,27	11,70
Mn	0,001	0,0008	0,0002	0,0001
Fe	0,035	0,030	0,193	0,152

Co	0,0002	0,0002		0,0002	0,0002
Cu	0,0065	0,0050		0,0098	0,0076
Zn	0,0256	0,0218		0,135	0,106
NH_4^+	3,23	2,49		3,23	2,49
HCO_3^-	1,50	15,79		1,50	15,79
SO_4^{2-}	0,80	1,10		0,80	1,10
SCN^-	0,40	0,31		0,40	0,31
P	9,32	7,30		8,84	6,94
F	0,018	0,015		0,018	0,015
Cl	112,3	99,02		127,1	110,4
Br	0,035	0,027		0,035	0,027
I	0,0003	0,0002		0,0002	0,0002
Se	0,00003	0,00003		0	0
Urea	1,02	1,48		1,02	1,48
Ácido úrico	0,120	0,094		0,120	0,094
Histamina	0,0160	0,0123		0,0160	0,0123
Ácido glucurónico	4,33	3,33		4,33	3,33
D-glucosamina	0,682	0,526		0,682	0,526
Vit D	0,000001	0		0,00001	0,00001
Vit B1	0,0006	0,0005		0,0033	0,0026
Vit B2	0,0018	0,0014		0,0052	0,0040
Nicotinamida	0,0128	0,0098		0,1190	0,0915
Ácido pantoténico	0,0063	0,0049		0,0125	0,0097
Vit B6	0,0013	0,0010		0,0104	0,0080
Biotina	0,00006	0,00005		0,00015	0,00012
Ácido fólico	0,00008	0,00007		0,00057	0,00044
Vit C	0,063	0,049		0,063	0,049
Ala	5,05	3,90		3,82	2,95
Gly	2,98	2,30		4,87	3,76
Arg	2,68	2,06		4,26	3,28
His	2,44	1,88		2,85	2,20
Ile	5,57	4,29		6,33	4,88
Leu	12,53	9,65		11,38	8,77

Lys	5,22	4,02		6,29	4,84
Met	2,12	1,64		2,35	1,81
Phe	4,21	3,24		5,11	3,94
Thr	4,88	3,76		5,46	4,21
Trp	0,703	0,541		1,13	0,87
Tyr	3,28	2,53		3,89	2,99
Val	7,22	5,56		8,36	6,44
Glu	7,64	5,89		18,82	14,51
Cys	0,815	0,628		1,94	1,50
Asp	2,84	2,19		3,45	2,66
Ser	2,87	2,21		4,11	3,16
Pro	4,62	3,56		8,00	6,17
Glucosa	1,64	1,53		6,07	4,94
Fructosa	0	0		3,44	2,65
Lactosa	47,12	36,32		47,13	36,32
Ácido cítrico	3,89	3,00		3,89	3,00
Ácido láctico	0,205	0,426		0,205	0,426
Ácido N-acetilneuramínico	0,071	0,055		0,071	0,055
Bilirrubina	0	0,088		0	0,088
InsP_3	0,0088	0,0068		0,0709	0,0546
InsP_4	0,014	0,011		0,346	0,266
InsP_5	0,035	0,027		1,019	0,786
InsP_6	0,164	0,126		2,003	1,544

6. Referencias bibliográficas

1. *Tablas de composición de alimentos. El pequeño "Souci-Fachmann-Kraut";* segunda ed.; Acribia S.A.: Zaragoza, España, 1999.
2. Holland, B.; Unwin, I. D.; Buss, D. H. *Cereals and Cereal Products. Third Supplement to McCance and Widdowson's "The Composition of Foods";* 4th ed.; The Royal Society of Chemistry: Nottingham, UK, 1988.
3. Página web de Kellogg's. *http://www2 kelloggs.com/* **2010**.
4. Página web de Quaker. *http://www.quakeroats.com/home.aspx* **2010**.
5. Página web de General Mills. *http://www.generalmills.com/* **2010**.
6. Página web de Health Valley. *http://www healthvalley com/* **2010**.
7. Página web de Post Cereals. *http://www.postcereals.com/* **2010**.

8. Lookhart, G. L. Cereal Proteins: composition of their major fractions and methods for identification. En *Handbook of Cereal Science and Technology*, Lorenz, K. J., Kulp, K., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, 1991; pp 441-468.
9. Harland, B. F.; Smikle-Williams, S.; Oberleas, D. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004,** *17*, 227-233.
10. Harland, B. F.; Narula, G. *Nutrition Research* **1999,** *19*, 947-961.
11. Harland, B. F.; Morris, E. R. *Nutrition Research* **1995,** *15*, 733-754.
12. Diem, K.; Lentner, C. *Tablas Científicas Documenta Geigy;* séptima ed.; Ciba-Geigy: Barcelona, España, 1975.
13. Dean, J. R.; Ma, R. *Chemosphere* **2007,** *68*, 1399-1407.
14. Jones, P. W.; Taylor, D. M.; Webb, L. M.; Williams, D. R. *Applied Radiation and Isotopes* **2002,** *57*, 159-165.
15. *The IUPAC Stability Constants Database, SC-Database,* version 5.83; Academic Software: Sourby Old Farm, Timble, Otley, Yorks, LS21 2PW, UK, 2005