



UNR Universidad
Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

*Estudios de oxidación de
hidratos de carbono con
cromo hipervalente*

Presentada por María Florencia Mangiameli

Rosario, Argentina

2013

*Estudios de oxidación de hidratos de carbono con
cromo hipervalente*

María Florencia Mangiameli

Bioquímica

Licenciada en Biotecnología

Títulos otorgados por la Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área de Química General, Departamento Química – Física, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, y el Instituto de Química de Rosario (IQUIR) Conicet-UNR, durante el período comprendido entre el 25 de marzo de 2009 y el 13 de diciembre de 2013, bajo la dirección del Dr. Luis Federico Sala y la codirección del Dr. Juan Carlos González.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas:

Al Doctor Luis Sala, por invitarme a formar parte de su grupo de investigación y por confiar en mi trabajo, invitándome a realizar este trabajo de tesis bajo su dirección.

A Juan Carlos, mi codirector, por su constante ayuda y guía en el trabajo experimental y la escritura de esta tesis.

A ambos, pensar en mí a la hora de enviar a alguien para formarse en el exterior, permitiendo que realizara varios viajes formativos.

A mis compañeras de trabajo, por estar ahí a toda hora. Especialmente, Silviay María Inés, que me ayudaron cubriéndome en algunas clases para que pudiera llegar al final de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, que me aguantaron tantas veces malhumorada porque las cosas no salían como esperaba, y con quienes compartimos tantos días de trabajo, mate de por medio. A ellos que también me dieron ideas y me ayudaron.

A mis auxiliares de investigación, Agostina, Fernando y Bárbara, quienes colaboraron desinteresadamente en la realización de algunas experiencias.

A mis amigos, que a pesar de vernos menos, me siguen apoyando y dando aliento.

A mis padres, gracias a quienes pude estudiar y estar hoy en este lugar.

A mi familia, sin quienes no podría estar hoy aquí.

A Luciano, mi cable a tierra, que me sostiene a pesar de la locura, personal y adquirida durante el desarrollo de esta tesis. Quien, a pesar del malhumor, los apuros, los días interminables en el laboratorio y tantas cosas más, me espera en casa todos los días con un abrazo y un beso.

A Vicente, mi hijo. Que me dio la paz interior que me faltaba y con quién aprendí mucho más de lo que he volcado en estas páginas. Que me despierta todos los días sonriente y con un beso, y me recibe a la vuelta con sus bracitos abiertos y al grito de "mami, mami", haciendo que cualquier otra cosa, incluyendo este trabajo, ya no sea importante.

Especialmente a ellos, que llenan mi vida de risas y sueños, y que me llenan de amor y felicidad.

A todos, gracias.

El presente trabajo de Tesis se realizó con la subvención económica que se detalla a continuación

 **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.**

PIT 00075 (2009-2011): *Bioinorgánica del Cromo. Estudios de Remediación.*

 **Universidad Nacional de Rosario. Secretaria de Ciencia y Técnica.**

(a) *Radicación del proyecto:* PIT 00075 (2009-2011): *Bioinorgánica del Cromo. Estudios de Remediación*, otorgado por Conicet. Código de Universidad: BIO 145. Unidad ejecutora: Facultad de Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional de Rosario.

(b) *Acreditación del proyecto:* PIT: BIO 259. *Estudios de biosorción de cromo y vanadio.*

 **Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Provincia de Santa Fe.**

(a) *Biosorción: remediación de aguas contaminadas con metales pesados, de origen industrial. Conservación de recursos hídricos.* Proyecto Anual: 21127-2010.

(b) *Estudios en columna de procesos de biosorción de metales pesados presentes en aguas servidas. Conservación de Recursos Hídricos.* Proyecto Anual: 2010-082-2011.

(c) *Estudios de purificación de aguas servidas provenientes de curtiembres, empleando columnas de flujo continuo, mediante procesos de biosorción.* Proyecto Anual: 2010-043-2012.

Pasantías realizadas en el extranjero

🇺🇦 Miembro integrante del Convenio Bilateral MinCyT: Argentina – FWO - Bélgica: FWO9/96 (2009/2011). Universidad de Amberes, Bélgica.

En el marco de este Convenio Bilateral, del 1 al 30 de setiembre del año **2010**, realicé una estadía en el Departamento de Física de la *Universidad de Amberes*, Bélgica, para realizar *mediciones de Resonancia Paramagnética Electrónica de banda continua, pulso y Endor*, cuyos resultados se exponen en el presente trabajo de Tesis, bajo la supervisión de la Profesora Sabine Vandoorslaer.

🇺🇦 Pasantía de capacitación otorgada por la Profesora Dra. Ana M. Atria de la *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*, Universidad de Chile, Santiago, Chile, para realizar estudios de *identificación y caracterización de especies paramagnéticas oxo-complejos de Cr^{VI} en solución* mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE).

Instituto de Química de Rosario- CONICET-UNR

🍷 Se agradece al Dr. Teodoro Kaufman, Director del Instituto de Química de Rosario-CONICET-UNR, por permitirme actuar como doctorando adherente al mencionado Instituto.

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes conferencias y/o ponencias presentadas en actas de reuniones científicas nacionales e internacionales

Año 2009

🍷 *Interacción de acuo Cr^V con ligandos de interés biológico.* Mangiameli, Ma. F.; Gonzalez, J.C.; García, S.; Bellú, S.; Sala, L.F. y Signorella, S. *XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica.* Salta, Argentina. 18 al 21 de Mayo 2009.

🍷 *EPR Spectroscopic characterization of oxo- Cr^V complexes with aldaric, aldonic and uronic acids.* Gonzalez, J. C.; Mangiameli, Ma. F.; García, S.; Bellú, S.; Sala, L. F.; Rubin de Celis, E.; Piehl, L.; Carreti, I.; Vinck, E. y Van Doorslaer, S. *7th European Federation of EPR Groups Meeting and Colsing Meeting of COST P15.* Antwerp, Bélgica. 6 - 11 de Septiembre 2009.

🍷 *Cr^{IV} , an exciting intermediate on the chromium oxidation of natural products.* Sala, L. F.; Mangiameli, Ma. F.; Gonzalez, J.C.; García, S.I.; Bellú, S. *10º Conferencia Latinoamericana de Físico – Química Orgánica.* 11 al 16 de octubre de 2009. Florianopolis, Brasil.

2010

🍷 *Caracterización de compuestos de coordinación: oxo-Cr^V-L, L=sustratos de interés biológico, por resonancia paramagnética electrónica (RPE).* Sala, L. F.; González, J. C.; Mangiameli, Ma. F.; García, S. I.; Frascaroli, Ma. I.; Blanes, P.; Rubin de Celis, E.; Piehl, L.; Vinck, E.; Van Doorslaer, S.; Atria, A. Ma. *Asociación Química Argentina – Universidad Nacional de Lanús* – 13 al 16 de septiembre 2010.

🍷 *Oxidación por Cr^{IV} de D-glucoheptono-1,4-lactona (GHL).* Mangiameli, Ma. F.; González, J. C.; García, S.; Frascaroli, Ma. I.; Sala, L. F. *XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de Asociación de Universidades del Grupo Montevideo.* Santa Fe, Argentina. 19 al 21 de octubre de 2010. Santa Fe, Argentina.

🍷 *Estudio cinético de la oxidación de ácido D-galacturónico por Cr^{IV}.* Mangiameli, Ma. F.; Crotta Asis, A.; B. Crotta Asis, B.; Bordoni, Ma. E.; Bedoya, F.; Frascaroli, Ma. I.; García, S. I.; Gonzalez, J. C.; Sala, L. F. *IV Jornadas de Ciencia y Técnica. Divulgación de la producción científica y tecnológica de la UNR.* UNR, Santa Fe, Argentina – 16 de noviembre 2010.

🍷 *Cinética de la oxidación de ácido D-galacturónico por Cr^{IV}.* Crotta Asis, A.; Mangiameli, Ma. F.; Crotta Asis, B.; Bordoni, Ma. E.; Bedoya, F.; Frascaroli, Ma. I.; García, S. I.; Gonzalez, J. C.; Sala, L. F. *XII Congreso y*

XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina – 2 al 3 de diciembre 2010.

2011

🌸 *Kinetics, CW and Pulse EPR characterization of Cr^V saccharide complexes*. Sala, L. F.; González, J. C.; Mangiameli, Ma. F.; García, S. I.; Frascaroli, Ma. I. *EICC - 1: First EuChemS Inorganic Chemistry Conference*. 11 - 14 de abril, 2011. Manchester, UK.

🌸 *Oxidación por Cr^{IV}/Cr^V de ácidos urónicos. Determinación de las especies oxo-Cr^V por EPR en banda X de pulso y continua*. González, J. C.; Mangiameli, Ma. F.; Sala, L. F.; García, S.; Frascaroli, Ma. I.; Van Doorslaer, S.; Salas-Peregrin, J. M.; Atria, A. Ma. *XVII Congreso Argentino de Físico Química y Química Inorgánica*. 3 - 6 de mayo de 2011. Córdoba. Argentina.

🌸 *Cr^{IV}/Cr^V interaction with saccharide: kinetics studies and oxo-Cr^V saccharide complexes characterization by CW and pulse EPR spectroscopy*. González, J. C.; Sala, L. F.; Mangiameli, Ma. F.; García, S.; Frascaroli, Ma. I.; Van Doorslaer, S.; Salas-Peregrin, J. M.; Atria, A. Ma.; Crotta Asís, A.; Crotta Asís, B.; Bedoya, F. *3rd Latinoamerican Symposium on Coordination and Organometallic Chemistry (SiLQCOM)*, 26 - 29 de julio, La Serena. Chile.

2012

🍷 *Estudio cinético de la reacción Cr^{IV} /sacáridos de interés biológico.* Bertone, F.; González, J. C.; Mangiameli, Ma. F.; Crotta Asis, A.; García, S.; Frascaroli, Ma. I.; García, J.; Sala, L. F. *VI Jornadas de Ciencia y Técnica. Divulgación de la producción científica y tecnológica de la UNR.* UNR, 14 de noviembre de 2012, Sede de Gobierno de la Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

2013

🍷 *Estudio cinético de la reacción Cr^{IV} con sacáridos de interés biológico.* González, J. C.; Mangiameli, Ma. F.; Crotta Asis, A.; Sala, L. F. *XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica*, 9 al 12 de abril de 2013, Salón Metropolitano, Rosario, Santa Fe.

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones

✿ Mangiameli, M. F., González, J. C., García, S., Bellú, S., Santoro, M., Caffaratti, E., Frascaroli, M. I., Salas Peregrín, J. M., Atria, A. M. y Sala, L. F., **2010**, *Redox, kinetics and complexation chemistry of the Cr^{VI}/Cr^V/Cr^{IV} -D-glycero-D-gulo-heptono-1,4-lactone system*, J. Phys. Org. Chem., **23**, 960-971.

✿ Mangiameli, M. F., González, J. C., García, S., Frascaroli, M. I., Van Doorslaer, S., Salas Peregrin, J. M. y Sala, L. F., **2011**, *New insights on the mechanism of oxidation of D-galacturonic acid by hipervalent chromium*, Dalton Trans., **40**, 7033- 7045.

✿ González, J. C., Mangiameli, M. F., Crotta Asis, A., Bellú, S. y Sala, L. F., **2013**, *Oxidation of carbohydrates of biological importance by the aquachromium(IV) ion*, Polyhedron, **49**, 84–92.

Publicaciones en colaboración sobre la temática Bioinorgánica del Cromo

✿ M. I. Frascaroli, S. Signorella, J. C. González, M. F. Mangiameli, S. García, E. Rubin de Celis, L. Piehl, L. F. Sala, A. M. Atria. *Oxidation of 2-amino-2-deoxy-D-glucofuranose by hypervalent chromium: Kinetics and mechanism*, **2011**, Polyhedron, **30**, 1914–1921.

✿ L. F. Sala, S. I. García, J. C. González, Ma. I. Frascaroli, S. Bellú, F. Mangiameli, P. Blanes, Ma. H. Mogetta, V. Andreu, A. Ma. Atria, J. M. Salas Peregrin, *Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho*, **2010**, Real Sociedad Española de Química, Anales de Química. 2010, **106** (2), 114–120.

Índice

Abreviaturas	20
Capítulo 1 – Introducción	21
1.1. Generalidades de las propiedades químicas y toxicológicas del elemento cromo	22
1.2. Sobre los mecanismos generales de reacción para la reducción de Cr ^{VI} por sustratos orgánicos	41
Objetivos del trabajo de Tesis	46
Capítulo 2 - Materiales y métodos	47
2.1. Materiales	48
2.2. Instrumental	50
2.2.1 Identificación del producto de oxidación de la reacción Cr ^{IV} /sacárido	53
2.3. Métodos	54
2.3.1. Preparación de soluciones	54
2.3.2. Síntesis de D-glucarato ácido de potasio	55
2.3.3. Estudios cinéticos Cr ^{IV} /sacáridos	59
2.3.3.1. Síntesis de Cr ^{II}	59
2.3.3.2. Determinación de la concentración de Cr ^{II}	61
2.3.3.3. Generación y cuantificación de Cr ^{IV}	62

2.3.3.4. Determinación y caracterización de superoxo-Cr ^{III} , CrO ₂ ²⁺	65
2.3.3.5. Influencia de la temperatura, la concentración de protones, la fuerza iónica y la concentración de sacárido en la estabilidad del CrO ₂ ²⁺	68
2.3.3.6. Reacciones competitivas del Cr ^{IV} : Oxidación vs desproporción	73
2.3.3.7. Oxidación de sacáridos por Cr ^{IV} : condiciones experimentales para el estudio cinético	76
2.3.3.8. Determinación de las constantes de velocidad de oxidación experimentales, k_{4exp} , para la reacción Cr ^{IV} /sacárido	78
2.3.3.9. Análisis del producto de la reacción Cr ^{IV} /sacárido	79
2.3.3.10. Determinación de los parámetros termodinámicos de la reacción Cr ^{IV} /sacárido	80
2.3.4. Estudio para la reacción Cr ^{VI} /sacárido	81
2.3.4.1. Evolución en el tiempo de mezclas de reacción Cr ^{VI} /sacárido	81
2.3.4.2. Detección de los intermediarios de reacción Cr ^{IV} /Cr ^{II} en mezclas de reacción Cr ^{VI} /sacárido	82
2.3.4.3. Estudios cinéticos Cr ^{VI} /sacárido	83
2.3.4.3.1. Estudios cinéticos Galur/Cr ^{VI} y GHL/Cr ^{VI}	83
2.3.4.3.2. Estudios cinéticos para sacáridos poco solubles en agua: sistema Cr ^{VI} /Glucar	84

2.3.4.3.3. Determinación del orden de reacción con respecto a Cr^{VI}	89
2.3.4.3.4. Influencia de la I sobre el estudio de oxidación de sacáridos con Cr^{VI}	89
2.3.4.3.5. Estudios cinéticos para evaluar la velocidad de aparición de especies de Cr^{III} en sistemas Cr^{VI} /sacáridos	90
2.3.5. Estudios de caracterización y cinéticos de especies Cr^{V} - sacárido	91
2.3.5.1. Detección y caracterización de especies oxo- Cr^{V} -sacárido por RPE	91
2.3.5.2. Estudios cinéticos de especies oxo- Cr^{V} -sacárido por RPE	93
2.3.5.3. Estudios cinéticos de especies oxo- Cr^{V} -sacárido espectroscopia UV-vis	96
2.3.6. Análisis de los productos de oxidación de la reacción Cr^{VI} /sacárido	97
2.3.7. Estudio de lactonización de Glucar	99
2.3.8. Detección de ésteres de Cr^{VI}	100
2.3.9. Detección de radicales libres	101
2.3.9.1. Detección de radicales libres empleando acrilonitrilo.	101
2.3.9.2. Detección de radicales libres empleando acrilamida.	101
2.3.10. Determinación de los valores de coeficientes de absortividad molar de las especies oxo- Cr^{V} /sacárido	102

2.3.11. Síntesis complejo $K_3[Cr^V(O)(LH_2)_2]$	103
2.3.12. Determinación de la especie reactiva de Cr en la reacción de oxidación Cr^{VI} /sacárido	104
Capítulo 3 - Estudios cinéticos de la oxidación de sacáridos por Cr^{IV}	112
3.1. Consideraciones generales al estudio cinético de la oxidación de sacáridos por Cr^{IV}	113
3.2. Determinación de la constante de velocidad de oxidación, k_{4exp}	119
3.3. Parámetros de activación	128
3.4. Oxidación de sacáridos ácidos por Cr^{IV}	143
Capítulo 4 - Estudios de caracterización de Complejos Cr^V -sacáridos por RPE	150
4.1. Caracterización de especies sacárido- Cr^V por espectroscopia RPE	151
4.2. Detección y caracterización de especies de oxo- Cr^V -sacárido	163
4.2.1. Detección de especies de oxo- Cr^V -GHL	163
4.2.2. Detección y caracterización de especies oxo- Cr^V -Galur	170
4.2.3. Detección y caracterización de especies oxo- Cr^V -Glucar	183
Capítulo 5 - Estudios de la oxidación de sacáridos por $Cr^{VI/IV}$	206
5.1. Estudio de la reacción de oxidación de sacáridos por Cr^{VI} en medio ácido	207
5.1.1. Evolución en el tiempo de la reacción Cr^{VI} /sacárido	207

5.1.2. Detección de ésteres de Cr ^{VI}	213
5.1.3. Detección de radicales en mezclas Cr ^{VI} /sacárido	214
5.1.4. Detección de los intermediarios de reacción Cr ^{II} /Cr ^{IV} en mezclas de reacción Cr ^{VI} /sacárido	216
5.2. Estudios cinéticos de la oxidación de GHL y Galur por Cr ^{IV}	226
5.2.1. Sistema Cr ^{IV} /GHL	230
5.2.2. Sistema Cr ^{IV} /Galur	232
5.3. Estudio de la reacción global de oxidación Cr ^{VI} /sacárido	241
5.3.1. Estudio de la reacción de oxidación Cr ^{VI} /GHL	241
5.3.2. Estudio de la reacción de oxidación Cr ^{VI} /Galur	253
5.3.3. Estudio de la reacción de oxidación Cr ^{VI} /Glucar	265
Capítulo 6: Mecanismos de oxidación de sacáridos por Cr hipervalente	282
6.1. Consideraciones generales	283
6.2. Mecanismo de reacción para la oxidación de GHL por cromo hipervalente	292
6.3. Mecanismo de reacción para la oxidación de Galur por cromo hipervalente	300
6.4. Mecanismo de reacción para la oxidación de Glucar por Cr hipervalente	309
Conclusión	315

Resumen	320
Figuras suplementarias	325
Anexo 1 – Deducción de ecuaciones	341
Anexo 2 – Mecanismos propuestos para la reacción Cr ^{IV} /sacarido	373
Bibliografía	381

Abreviaturas y símbolos

- ✓ Cr – cromo
- ✓ ε - Absortividad molar
- ✓ CrO_2^{2+} - superoxo Cr^{III}
- ✓ S – Sustrato orgánico
- ✓ S_{ox} – Sustrato orgánico oxidado
- ✓ μ - Fuerza iónica
- ✓ T – temperatura
- ✓ DFC – 1,5 - difenilcarbazida
- ✓ DFCO - difenilcarbazona
- ✓ HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución
- ✓ DHL – D-glicero-D-gulo-heptono-1,4-lactona
- ✓ Galur – Ácido D-galacturónico
- ✓ Glucar – Ácido D-glucárico
- ✓ RMN – Resonancia Magnética Nuclear
- ✓ RPE – Resonancia Paramagnética Electrónica

Capítulo 1

Introducción

1.1. Generalidades de las propiedades químicas y toxicológicas del elemento cromo

El elemento cromo es un metal de transición que tiene la posibilidad de presentar múltiples estados de oxidación, los más comunes son: 0, +II, +III, +IV, +V y +VI; por ello se lo suele denominar, *cromo hipervalente*. El cromo ocupa el vigésimo primer lugar en abundancia de la corteza terrestre [1]. Se extrae principalmente de la *cromita* (FeCr_2O_4), otras fuentes de menor abundancia son la *crocoíta* (PbCrO_4) y el *ocre de cromo* (Cr_2O_3) [2].

En el medio ambiente se lo puede encontrar en estado elemental (Cr^0), o formando compuestos de Cr^{III} y Cr^{VI} , sus estados de oxidación más estables. Es importante destacar que, si bien este elemento se encuentra en pequeñas proporciones en una gran variedad de ambientes naturales, lo que afecta principalmente a los seres vivos es la mayor concentración resultante de la actividad industrial. De allí, que los estudios toxicológicos en individuos que han estado en contacto con fuentes industriales contaminadas; sea la fuente de información más significativa sobre los distintos efectos nocivos asociados a este elemento y sus compuestos [3].

Los compuestos derivados del cromo, considerados contaminantes ambientales importantes, son altamente tóxicos y reconocidos agentes carcinogénicos debido a su alto grado mutagenicidad [4].

La capacidad de actuar como agente oxidante por parte de la especie Cr^{VI} sobre biomoléculas con la formación de complejos de Cr^{III} , es la responsable de la mutagenicidad y carcinogenicidad del Cr^{VI} .

La especie Cr^{VI} , en su forma de oxoanión, no produce daño en el ADN *in vitro*, en ausencia de agentes reductores, por ende se cree que la especie mutagénica sería alguno de los intermediarios reactivos producidos durante la reducción del Cr^{VI} a Cr^{III} . Cuando se considera la importancia bioquímica del cromo y su actividad mutagénica, *el factor más importante es el estado de oxidación en el que se encuentra* [5-7].

Los compuestos químicos que contienen Cr^{III} son muy empleados en la fabricación de ladrillos refractarios para hornos industriales, el curtido de pieles y la fabricación de pigmentos. El Cr^{III} es una especie relativamente estable y generalmente considerada no tóxica para los organismos vivos, debido fundamentalmente a dos razones:

- a) presenta poca movilidad en el ambiente natural, ya que tiende a precipitar como $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$ o Cr_2O_3 a valores de pH cercanos a la neutralidad
- b) los compuestos de Cr^{III} de carácter hidrofílico, tales como el $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, no pueden cruzar las membranas celulares, de carácter lipídico.

Sin embargo, si el Cr^{III} forma complejos de coordinación con ligandos orgánicos es capaz de permanecer en solución en el rango de pH 7 - 8 por lo

que deja de ser "inmóvil" y también adquiere la capacidad de atravesar las membranas plasmáticas [8,9].

Si bien se sigue sugiriendo en la comunidad científica, la importancia del Cr^{III} como elemento esencial a nivel de traza, dado que actuaría en el factor de tolerancia a la glucosa [10]; los compuestos dietéticos de venta libre tales como el picolinato de cromo (III) (Figura 1.1) se consideran en la actualidad extremadamente tóxicos [11].

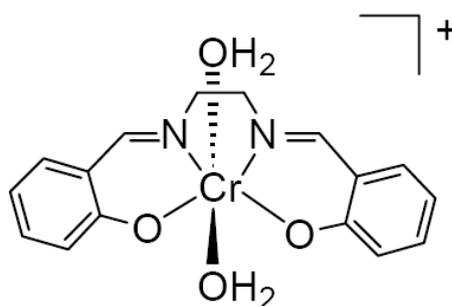


Figura 1.1. Estructura del picolinato de Cr^{III} .

Otro de los argumentos a favor de catalogar al Cr^{III} como un *contaminante de baja peligrosidad es que no se oxida con facilidad*. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales fuertemente oxidantes, como puede darse en incendios forestales o de basurales contaminados (desarrollo de altas temperaturas), es oxidado a Cr^{VI} . Se ha demostrado que aquellos suelos con alto contenido en MnO_2 pueden oxidar el Cr^{III} a Cr^{VI} [8].

Nguyen A. *et al.* han informado que la ingesta de picolinato de cromo (III), se relaciona con la formación de especies de Cr^{V} y Cr^{VI} a nivel celular, mediante reacciones con oxidantes biológicos, como el agua oxigenada: H_2O_2 , generada en los procesos metabólicos [11]. En los resultados informados en el trabajo de Nguyen *et al.*, se puede apreciar la formación de especies de Cr^{II} , las cuales pueden luego reaccionar con oxígeno para generar especies radicalarias de oxígeno (ROS) [11,12]. Los resultados de Nguyen A. *et al.*, reforzaron los estudios previos realizados por Dean *et al.*, quienes habían informado que los complejos de Cr^{III} pueden ser oxidados a Cr^{VI} por el H_2O_2 generada en los procesos intracelulares de óxido – reducción y de respuesta inmune. Este proceso oxidativo, sobre complejos de Cr^{III} llevaría a la generación y estabilización de intermediarios genotóxicos de Cr^{V} [13]. Se ha sugerido como especie reactiva, generada durante los procesos redox del cromo, el radical OH^{\cdot} , pero su participación aún permanece en discusión en el ambiente científico. En su lugar, se consideran actualmente, a las especies intermediarias de Cr^{V} y Cr^{IV} como los más genotóxicas [14]. Finalmente, es importante advertir, que la especie Cr^{III} tiene la capacidad de formar complejos con distintas biomoléculas, como proteínas y ADN, alterando sus funciones celulares y favoreciendo el desarrollo de mutaciones que derivan en cáncer [15].

El Cr^{VI} es la segunda forma más estable de este elemento bajo la forma de compuestos oxo, los cuales son empleados fundamentalmente en [16,17]:

- a) la industria química del cromado
- b) la fabricación de pigmentos y colorantes
- c) la conservación de la madera
- d) el tratamiento del agua utilizada en las torres de enfriamiento
- e) en las máquinas de copiado con toner.

Estos compuestos de Cr^{VI} son tóxicos y mutagénicos por lo que las personas que los manipulan habitualmente deben respetar los requisitos de seguridad [18,19].

Los estudios biológicos *in vivo* e *in vitro* que involucran compuestos de oxo- Cr^{VI} , demuestran que su genotoxicidad es debida a la formación de intermediarios reactivos generados durante su reducción a Cr^{III} , más que por su interacción directa con el contenido celular [20]. Otro punto importante a considerar, es que si bien muchos de los compuestos de Cr^{VI} son poco solubles en agua, como el cromato de bario, BaCrO_4 (2,6 mg/L a 20 °C); otros compuestos de cromo como por ejemplo el cromato de sodio, Na_2CrO_4 (873 g/L a 30 °C), y el cromato de potasio, K_2CrO_4 (629 g/L a 20 °C), son extremadamente solubles en medio acuoso [21]. El Cr^{VI} bajo la forma de ión

CrO_4^{2-} , puede ser transportado al interior celular mediante el canal aniónico empleado por los iones HPO_4^{2-} y SO_4^{2-} debido a su semejanza estructural [19]. Una vez que el ión cromato, ha logrado entrar en el citoplasma celular, el Cr^{VI} no reacciona con el ADN, pero en condiciones fisiológicas puede ser metabolizado y reducido a Cr^{III} , generando complejos Cr^{III} -biomoléculas como así también otros intermediarios reactivos [22]. Este *proceso de reducción intracelular no involucra pasos enzimáticos, sino que ocurre mediante la transferencia directa de electrones desde compuestos celulares* como el ácido ascórbico (I) y los tioles no proteicos: glutatión (II) y cisteína (III), Figura 1.2.

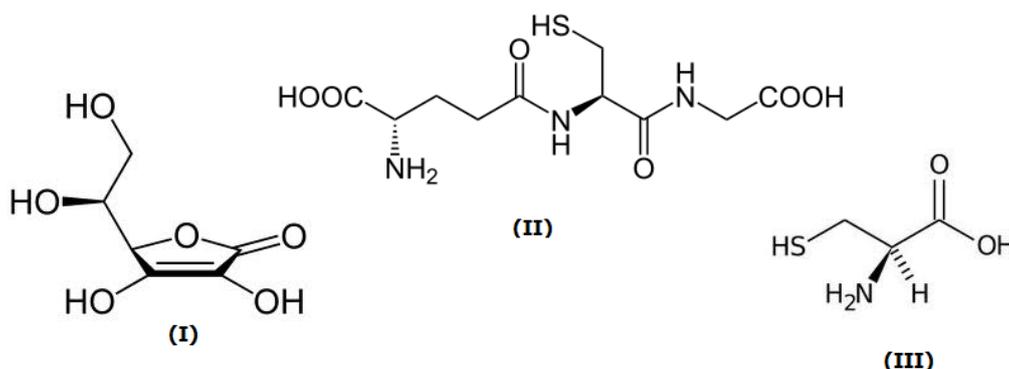


Figura 1.2. Estructura de los compuestos celulares: (I) Ácido Ascórbico, (II) Glutathion, (III) Cisteína

La reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} requiere tres electrones, pero los reductores orgánicos conocidos solo actúan por transferencia de 1 o 2 electrones, lo que implica que deben generarse, necesariamente, intermediarios: $\text{Cr}^{\text{V/IV}}$ y/o

radicales orgánicos [23]. La formación de especies intermediarias de Cr^{V} ha podido ser observada en varias ocasiones durante la reducción biológica del Cr^{VI} en organelas celulares de plantas y animales vivos, mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (técnica sensible y selectiva para la detección de especies de Cr^{V} , dada su configuración electrónica d^1) [24].

Los agentes reductores intracelulares impactan de forma diferente, sobre la naturaleza y tipo de daño producido por el cromo sobre el ADN. Por ejemplo, el anión ascorbato, producto de la disociación del ácido ascórbico (Figura 1.2), el cual se encuentra en concentraciones milimolares en tejidos humanos, parecería ser el agente reductor intracelular más importante bajo condiciones fisiológicas, produciendo cerca del 90 % de las reacciones de reducción de Cr^{VI} *in vivo* [25]. Por el contrario, en los medios de cultivo celular se encuentra solo a concentraciones micromolares, permitiendo que otras especies, como los tioles, actúen como reductores [26]. Es interesante notar el hecho de que cuando el ascorbato es el agente reductor, se transfieren dos electrones, generándose Cr^{IV} como primer intermediario; mientras que en el caso de la reducción por los tioles, se transfiere un electrón, formándose predominantemente, Cr^{V} [23]. Estas dos especies intermediarias de cromo continúan su reducción y en ambos casos, el

producto final es Cr^{III} . Finalmente, el Cr^{III} reacciona con el ADN produciendo sobre el mismo diferentes tipos de lesiones [27].

La interacción del Cr^{VI} con sustancias naturales puede ser responsable de la formación y acumulación de especies solubles de Cr^{V} suficientemente estables como para producir efectos tóxicos; por ello, es importante poder estudiar e identificar estas especies, para contribuir a entender su rol potencial en los procesos de carcinogénesis. Los primeros estudios realizados han demostrado que las especies complejas de Cr^{V} producen daño en el ADN celular [28]. Cod *et al.*, pudieron observar especies Cr^{V} -glicoproteínas, de vida media relativamente larga, formadas por reducción de Cr^{VI} en la superficie celular o en los fluidos extracelulares del sistema respiratorio [29]. Además, se ha demostrado que los complejos de Cr^{V} presentan actividad nucleasa *per se* [30], paralela a su capacidad de reaccionar con moléculas biológicas importantes [31]. Al mismo tiempo, se sabe que las moléculas ricas en oxígeno reducen rápidamente al Cr^{V} en medio ácido; no obstante, en solución acuosa neutra son muy eficaces para estabilizar especies oxo- Cr^{V} [32].

Los hidratos de carbono, que poseen grupos *vic* diolato, junto con sus derivados ácidos, que además poseen grupos 2-hidroxicarboxilatos, son bases duras que coordinan fuertemente con el ácido duro Cr^{V} (*Teoría Ácido - Base del Principio de Dureza y Blandura de Pearsson*). Dada la variedad y abundancia de estos compuestos en el medio extra e intra celular, estos

complejos de Cr^{V} podrían formarse con gran facilidad durante los procesos redox del cromo (Figura 1.3).

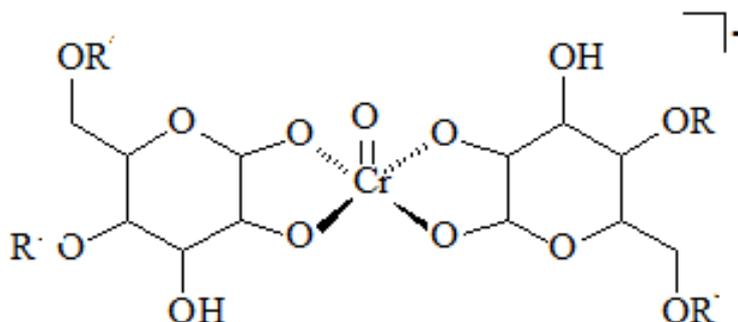


Figura 1.3. Estructura general de un complejo oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-(\text{L})_2$ *vic* diolato. L = hidrato de carbono.

Aunque se supone que el glutatión (Figura 1.2) es el primer agente reductor intracelular del Cr^{VI} dando lugar a un compuesto de coordinación $\text{Cr}^{\text{V}}-\text{GSH}$ [33]; al considerarse al átomo de S una base blanda, este sufre un rápido intercambio de ligando con las bases duras representada por los átomos de oxígeno del hidrato de carbono. De esta manera se generan complejos relativamente estables oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-\text{L}$, donde L es cualquier hidrato de carbono natural, como D-Glucosa (I), D-galactosa (II), ácido D-glucónico (III) y ácido D-glucurónico (IV) (Figura 1.4); presentes en los organismo superiores (plantas, animales, seres humanos) [34].

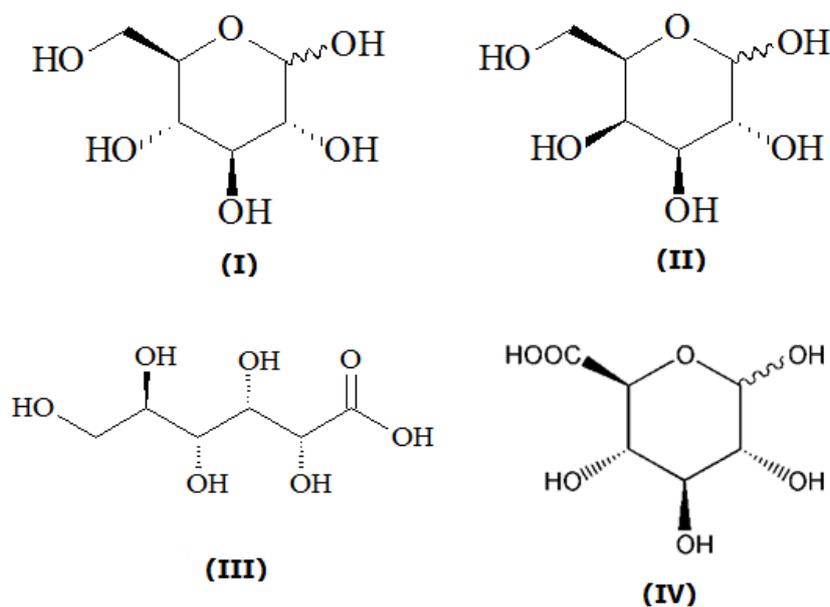


Figura 1.4. Estructura de: (I) D-Glucosa, (II) D-galactosa, (III) ácido D-glucónico y (IV) ácido D-glucurónico.

En cualquiera de los casos, se generarían finalmente complejos oxo-Cr^V-L que estabilizarían al cromo en este estado de oxidación, en el citoplasma celular. De este modo, los complejos de oxo-Cr^V-L podrían ser transportados e introducidos en el núcleo celular, L = hidratos de carbono comúnmente presentes en el sistema celular [34].

La oxidación de sacáridos por Cr^{VI} puede ocurrir tanto en el citosol (pH fisiológico) como en vacuolas de detoxificación (pH 1 – 5); por ello es importante estudiar la formación, estabilidad y reactividad de los posibles complejos intermediarios, Cr^V-L (L = hidrato de carbono).

Como se estableció anteriormente, el Cr^{V} (d^1) es una especie paramagnética, por ello, la técnica de RPE es ideal para estudiar los complejos oxo- Cr^{V} -L tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que permite identificarlos y caracterizarlos con gran precisión y rigurosidad [12]. Los estudios de RPE de complejos oxo- Cr^{V} -L sintetizados *in vitro* proveen información estructural sobre la naturaleza de las especies más factibles de ser estabilizadas *in vivo*; con lo cual es posible desarrollar una *biblioteca digital* que permita caracterizar las especies de Cr^{V} generados en sistemas biológicos, por contaminación con cromo.

En el año 1997, Barr *et al.*, a través de estudios empíricos, proveyeron información espectroscópica de parámetros de g_{iso} y A_{iso} de diferentes complejos de coordinación de Cr^{V} , con lo cual es posible correlacionar parámetros de RPE, para determinar la estructura molecular de complejos oxo- Cr^{V} -L detectados *in vivo* o sintetizados *in vitro* [35].

Los resultados obtenidos y publicados en el ámbito científico sobre esta temática, permiten apreciar que hay información estructural de complejos oxo- Cr^{V} -L, sin embargo, esta información se limita a los complejos oxo- Cr^{V} formados por la interacción de 2-hidroxiácidos del tipo ácido 2-etil-2-hidroxi-butanoico (abreviado con las siglas ehba) con el Cr^{V} (Figura 1.5). Estos complejos han sido completamente caracterizados [22] pero *sus espectros no poseen estructura superhiperfina ya que no existen protones carbinólicos que puedan acoplar con el espín electrónico del Cr^{V} .*

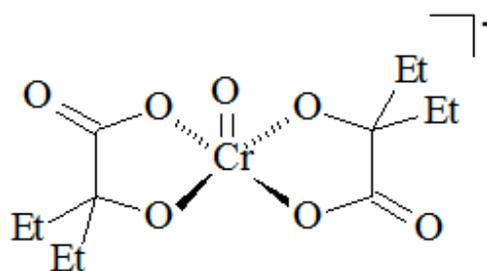


Figura 1.4. Estructura del complejo oxo-Cr^V-L. L = 2-etil-2-hidroxibutano, Et = CH₃CH₂⁻.

La determinación de los patrones de desdoblamiento hiperfino de la señal de RPE de los quelatos formados por los grupos *vic* diolato presentes en los hidratos de carbono, permiten diferenciar los complejos oxo-Cr^V-L con estructura de anillos furanósicos de los que poseen anillos piranósicos o de los compuestos acíclicos. Los parámetros espectroscópicos de RPE (A_{iso} , g_{iso} , $^1H a_{iso}$) junto con la multiplicidad de la señal permiten identificar fácilmente cuáles son los grupos que se encuentran unidos al Cr^V en complejos formados en sistemas biológicos con ligandos que posean más de un sitio de unión [36].

En las oxidaciones de compuestos orgánicos con cromo hipervalente se presentan otras dos especies reactivas: Cr^{II} y Cr^{IV}. Estas dos especies pueden generarse durante el proceso de óxido - reducción tanto *in vitro* como *in vivo*. La dificultad para identificar a estas especies intermediarias, radica en su misma reactividad y en sus características espectrales, ya que no pueden ser detectadas en forma directa mediante técnicas espectroscópicas clásicas,

como la espectroscopia UV-vis o por RPE. A pesar de ello, la presencia de las especies reactivas de cromo mencionadas anteriormente, puede ser demostrada, por la aparición de la especie superoxo cromo(III), $(\text{H}_2\text{O})_5\text{CrO}_2^{2+}$, al reaccionar el Cr^{II} con oxígeno molecular [37-39]. La detección de Cr^{II} implica que el Cr^{IV} se encuentra involucrado en el proceso redox [37].

Durante mucho tiempo, las especies reactivas Cr^{II} o Cr^{IV} no fueron consideradas en los estudios fisicoquímicos como intermediarios químicamente relevantes en la reducción del Cr^{VI} a Cr^{III} . En los últimos años se ha podido comprobar que el Cr^{II} se encuentra presente cuando ciertos compuestos orgánicos tales como metanol [39], isopropanol [39], glutatión (II - Figura 1.2) [40], DL-penicilamina (I - Figura 1.5) [40], L-cisteína (III- Figura 1.2) [40], DL-homoserina (II - Figura 1.5) [41], 10-Metil-9,10-dihidroacridina (III - Figura 1.5) [42] y ácido D-lactobiónico (IV - Figura 1.5) [43], reaccionan con Cr^{VI} en solución acuosa ácida.

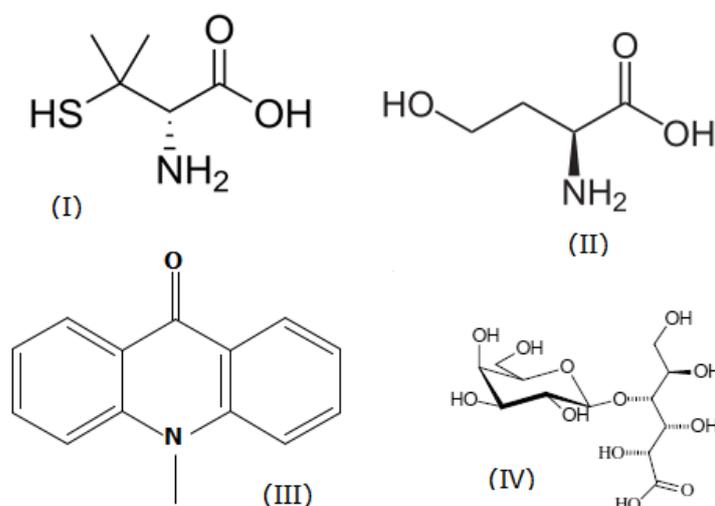


Figura 1.5. Estructura de: (I) DL-penicilamina, (II) DL-homoserina, (III) 10-Metil-9,10-dihidroacridina y (IV) ácido D-lactobiónico.

También se ha comprobado la presencia de $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Cr}^{\text{II}}$, como intermediarios redox durante las oxidaciones con Cr^{VI} de diversos sustratos, tales como sacáridos ácidos y neutros [44].

Durante muchos años y debido a la inestabilidad del Cr^{IV} en solución acuosa, se consideró que su participación en la genotoxicidad inducida por el elemento cromo no se manifestaba o era poco importante. Es una hipótesis que se basaba en el hecho de que el Cr^{IV} no formaría complejos estables con los grupos 1,2-dioles de los compuestos polihidroxilados neutros presentes en el medio celular a pH 7,0. No obstante, el Cr^{IV} forma complejos relativamente estables en solución acuosa con ligandos ácidos tales como ehba, ácido oxálico, ácido málico y ácido picolínico, entre otros [45]. En los últimos años,

diversos autores han demostrado que esta especie puede ser estabilizada por numerosos sustratos orgánicos en medio acuoso a pH 2,0 – 4,0 [23]. Estas condiciones ácidas pueden ser encontradas en ciertas vacuolas celulares, como lisosomas y fagosomas, en los que los compuestos de Cr^{VI} insolubles son solubilizados para su incorporación al medio celular. En las organelas celulares puede ocurrir la reducción del Cr^{VI} , generando estados de oxidación intermediarios, que cumplen un rol importante en la genotoxicidad del elemento cromo [23].

Se sabe, que la vida media de los complejos de Cr^{IV} es más corta que la de los complejos de Cr^{V} [45] y que presentan una mayor capacidad oxidante, debido a su mayor potencial redox [46]. Si bien la concentración intracelular de los complejos de Cr^{IV} [47] es menor comparada con la de los complejos de Cr^{V} , los complejos bisquelatos Cr^{IV} -2-hidroxicarboxilato tienen mayor capacidad que los análogos de Cr^{V} , de perder una molécula de ligando [45]. Esto significa que los complejos de Cr^{IV} pueden verse favorecidos en una reacción con el ADN celular. Estas propiedades químicas del Cr^{IV} y sus complejos en solución acuosa lo vuelve, un candidato probable como especie activa dentro del proceso de genotoxicidad inducida por cromo.

La detección de los intermediarios Cr^{V} , Cr^{IV} y Cr^{III} en la reacción de *oxidación crómica* de biomoléculas, sugiere que ésta ocurre por vías mono y bielectrónicas. De la misma manera, la detección de esteres de Cr^{VI} y

radicales libres, indicaría que estas especies también estarían implicadas en el proceso de oxidación crómica [30].

Distintos reductores intracelulares del Cr^{VI} podrían dar lugar a la generación de varios tipos de especies reactivas, cada una mediando de una forma particular en el daño que ocasionan a nivel celular. Varios agentes reductores celulares de Cr^{VI} han sido identificados: ácido ascórbico, cisteína y glutatión (I, II y III, respectivamente, en Figura 1.2), glutatión reductasa, enzimas microsomales de rata y otros [4,48,49]. Es importante estudiar los tipos de especies reactivas generadas en sistemas modelos apropiados. Los hidratos de carbono presentes en el medio celular, en forma de monómeros como D-glucosa (I - Figura 1.4), D-ribosa (I), D-fructosa (II) o combinados con NAD(P)H (III), Figura 1.6, podrían intervenir en forma directa en los procesos de reducción de Cr^{VI} , empleando sistemas enzimáticos reductores [30].

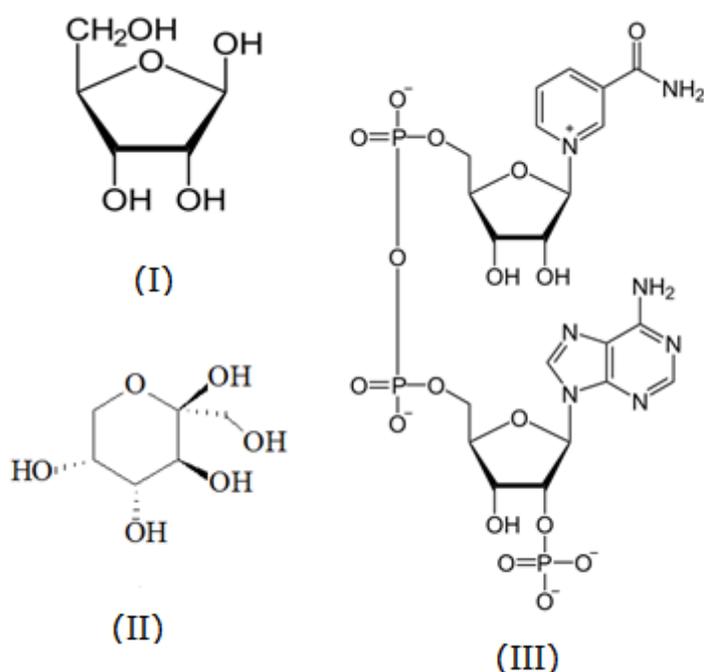


Figura 1.6. Estructura de: (I) D-ribosa, (II) D-fructosa y (III) NAD(P)H.

Teniendo en cuenta todas estas posibles especies intermediarias, numerosos autores han postulado que la reducción de Cr^{VI} ocurre mediante un mecanismo complejo. Para probarlo, se requieren evidencias experimentales directas o indirectas de la presencia de los intermediarios involucrados postulados en la reacción y el estudio cinético completo se debe llevar a cabo, bajo un amplio rango de condiciones experimentales.

Debido a la complejidad de la composición del sistema celular, el estudio de su interacción con cromo hipervalente hace necesario definir un sistema de estudio más reducido, pero que contenga al menos, las biomoléculas más factibles de reaccionar con el cromo, ya sea por:

a) su capacidad redox tales como: glutatión (Figura 1.2), ascorbato (Figura 1.2), tioles RSH, NAD(P)H (Figura 1.6)

b) su habilidad de coordinarse con el Cr^{VI} o sus intermediarios redox, aumentando su estabilidad y permanencia de los complejos en el interior celular: hidratos de carbono y sus derivados. Estos últimos aumentarían la probabilidad de que se produzca daño celular [30].

En este sentido, el grupo de investigación del Área Química General, dirigido por el Doctor Luis Federico Sala, se encuentra avocado al estudio de la interacción del cromo hipervalente con diferentes hidratos de carbono de interés biológicos. El objetivo es obtener datos cinéticos y realizar interpretaciones mecanísticas que permitan esclarecer el complejo proceso de oxidación crómica de los compuestos polihidroxilados, haciéndolo extensiva la interpretación del proceso oxidativo a sistemas vivos [34,36,43,44,50-62].

En particular, son de mayor interés los hidratos de carbono o sus derivados presentes en el medio celular vegetal y/o animal, tales como D-ribosa (I - Figura 1.6), D-galactosa, D-glucosa y ácido D-glucurónico (I, II y IV, respectivamente, en Figura 1.4), que podrían interaccionar directamente con el Cr^{VI} , luego de su ingreso al citoplasma, estabilizándolo mediante la formación de complejos y/o actuando como agentes reductores, generando en el proceso redox, especies reactivas que produzcan daño celular.

Para que un sistema modelo *in vitro* cumpla con su objetivo y tenga relevancia, debe ser capaz de predecir con certeza los cambios observados en sistemas celulares o en organismos vivos.

Entonces, para postular un mecanismo plausible de daño oxidativo de ADN por cromo hipervalente, se deben identificar y caracterizar tanto los productos como los intermediarios del proceso, que prueben la factibilidad de la hipótesis planteada. Sin embargo, la mayor dificultad con los estudios mecánicos de genotoxicidad causada por cromo reside en la, frecuentemente, baja concentración de/los intermediario/s en el medio de reacción. Por ello, deben implementarse estrategias experimentales y aplicarse técnicas que permitan, no solo la detección de estos intermediarios, así como su caracterización.

En el presente trabajo de tesis, se abordaron dos grandes temas:

(a) El estudio de la oxidación de tres hidratos de carbono por Cr^{VI} , D-glicero-D-gulo-1,4-heptonolactona (D-glucoheptono-1,4-lactona) (I), ácido D-galacturónico (II) y ácido D-glucárico (III), Figura 1.7, para completar el mapa de lo que se conoce sobre la oxidación crómica de hidratos de carbono realizado por nuestro grupo de investigación.

(b) Un estudio exhaustivo de oxidación de diferentes tipos de sacáridos con Cr^{IV} .

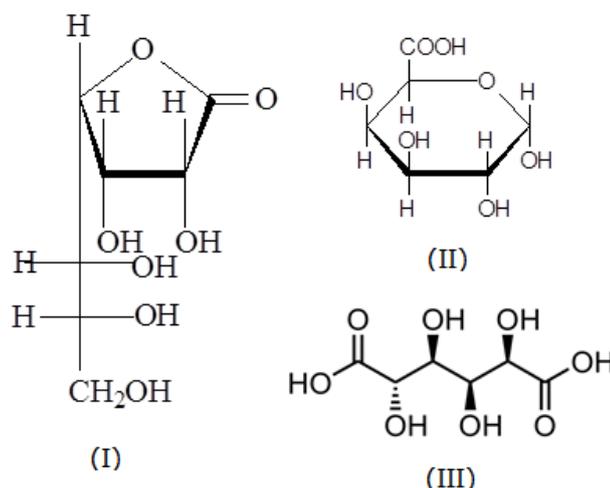
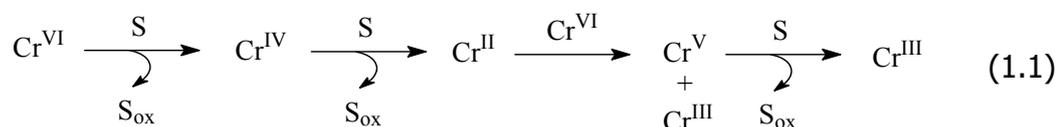


Figura 1.7. Estructura de: (I) D-glicero-D-gulo-1,4-heptonolactona, (II) Ácido-D-Galacturónico y (III) Ácido D-glucárico.

1.2. Sobre los mecanismos generales de reacción para la reducción de Cr^{VI} por sustratos orgánicos

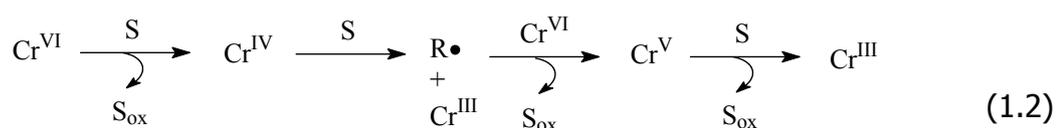
El primer mecanismo de reducción de Cr^{VI} por sustratos orgánicos oxigenados, fue propuesto por Westheimer [63] en los años 40 (ec. 1.1). En este mecanismo el sustrato orgánico se comporta como un agente reductor por dos electrones a lo largo de toda la secuencia, formándose el Cr^V en una etapa rápida por comproporción de Cr^{II} y Cr^{VI}.



En la década del 70, del siglo pasado, Rocek [64] propuso otro mecanismo, en el cual el sustrato orgánico se comporta como:

- un reductor por dos electrones frente a Cr^{VI} y Cr^{V}
- como un reductor por un electrón frente al Cr^{IV} , con formación de radicales orgánicos (ec. 1.2).

En este último caso, el Cr^{V} se forma en una etapa rápida, al reaccionar el radical orgánico con el agente oxidante, Cr^{VI} [64].



En ambos mecanismos se produce como primer intermediario, Cr^{IV} y sustrato oxidado, luego Cr^{V} –por diferentes vías de transferencia electrónica- para terminar generando la especie Cr^{III} como producto final de reacción del agente oxidante Cr^{VI} .

Durante las décadas del 70 al 90 del siglo XX, se avanzó significativamente en el estudio del mecanismo de reducción de Cr^{VI} por distintos sustratos orgánicos, como alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos realizándose significativos avances en el conocimiento de los posibles intermediarios de reacción, al obtenerse evidencias que indicaban que la primera etapa en el proceso involucraba la reducción de Cr^{VI} a Cr^{IV} [37-42]. Sin embargo, nada

pudo comprobarse sobre el número de electrones involucrados en las siguientes etapas redox [65]. La observación en estas reacciones de la presencia de la especie superoxocromo(III), CrO_2^{2+} (la cual sólo puede formarse a partir de Cr^{II} [38]), llevó a proponer un mecanismo en el cual el sustrato orgánico actúa como reductor tanto sobre el Cr^{VI} como sobre el Cr^{IV} , en dos etapas bielectrónicas, tal como se plantea en la ec. 1.1, y que puede esquematizarse en la secuencia: $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{II}}$. Al mismo tiempo, la observación de radicales libres en las reacciones de Cr^{VI} con un gran número de sustratos orgánicos polioxigenados [66], puso de manifiesto la necesidad de incorporar al mecanismo etapas redox monoelectrónicas para explicar los resultados observados.

Las evidencias experimentales obtenidas en estos casos (cinéticas y espectroscópicas) permitieron formular el mecanismo de la ec. 1.2, esquematizado en la secuencia: $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{III}}$. Teniendo en cuenta los datos experimentales observados, se podía postular una hipótesis en la que la reducción del Cr^{IV} ocurriría a través de etapas bi o monoelectrónicas dependiendo de la naturaleza del compuesto oxigenado reductor. No obstante, dos estudios realizados por diferentes grupos de investigación demostraron que no era posible sostener esta hipótesis.

Estudios cinéticos de la oxidación del alcohol isopropílico con Cr^{VI} realizados por Rocek *et al.* [64], detectaron radicales libres, hecho que había permitido

proponer el mecanismo de la ec. 1.2, el cual incluye etapas monoelectrónicas. Scott *et al.* estudiaron esta misma reacción en condiciones ligeramente diferentes (más ácidas), pudieron detectar la formación de CrO_2^{2+} con un 100% de rendimiento, concluyendo que la reacción transcurría solo a través de la secuencia: $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{II}}$, correspondiente a la ec. 1.1 [38]. Para la *oxidación crómica del mismo sustrato, alcohol isopropílico, los resultados obtenidos, resultaban contradictorios.*

La oxidación de ácido D-lactobiónico por cromo hipervalente, fue el primer estudio en el cual pudieron detectarse en forma simultánea radicales libres y CrO_2^{2+} [43]. Tomando estos resultados como punto de referencia, se propone que las dos secuencias operarían en forma simultánea, pues no se podía postular un mecanismo que operara exclusivamente por una de las secuencias indicadas, en las ec. 1.1 o 1.2.

Estudios posteriores demostraron que la reducción de Cr^{VI} por sustratos oxigenados puede describirse mediante un mecanismo que combina las dos secuencias: $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{II}}$ y $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{III}}$ [44], dependiendo de la acidez del medio de reacción.

Sala *et al.* han realizado un profundo estudio de la química redox de azúcares, como aldosas, desoxialdosas, ácidos aldónicos, ácidos urónicos y polisacáridos, con cromo hipervalente [51-62]. Comparando todos los resultados obtenidos, se pudo demostrar que *los sacáridos no reaccionan o lo*

hacen muy lentamente con Cr^{VI} en medio neutro, pero son reductores eficientes en medio ácido. La reacción redox entre estos sustratos polifuncionales y Cr^{VI}, fue altamente selectiva, cuando se emplearon relaciones sustrato/Cr^{VI} mayores que 30/1, detectándose siempre, un solo producto de oxidación.

Asimismo se pudo establecer, que en la reacción de los sustratos mencionados con cromo hipervalente, *una de las etapas limitantes de la velocidad de reacción es la reducción del Cr^{VI}.* Conjuntamente, se observó la formación de especies de Cr^V cuya velocidad de decaimiento dependía de la estructura del sacárido en estudio. Para ciertos sustratos, la velocidad de oxidación por Cr^{VI} resultó comparable a la de decaimiento del Cr^V [50].

A partir de estos estudios, se pudo determinar la reactividad relativa de los grupos funcionales presentes en estas biomoléculas, como potenciales sitios de oxidación, resultando para los sacáridos neutros, el siguiente orden de reacción: **-(H)COH_{hemiacetalico} > -H₂COH_{primario} >> -(H)COH_{secundario}, ~ - (H)COR_{glicosidico}** [50].

En el caso particular de los ácidos aldónicos, se demostró que la oxidación se produce en forma específica sobre el extremo ácido de la molécula, y la reactividad del fragmento, fue la siguiente: **α-CH(OH)-CO₂⁻ > - (H)COR_{glicosidico} y -H₂COH_{primario}** [36].

Objetivos del trabajo de Tesis

Objetivos generales

Estudiar el proceso de transferencia electrónica entre el Cr hipervalente y los diferentes grupos funcionales presentes en hidratos de carbono de importancia biológica. Analizar la reactividad a partir de los diferentes estados de oxidación del Cromo ($\text{Cr}^{\text{VI/V/IV/III}}$) e integrar los resultados obtenidos, en la interpretación del proceso redox: Cromo hipervalente - hidrato de carbono.

Objetivos particulares

- ✓ Estudiar la oxidación con cromo hipervalente de los siguientes sustratos: D-glucoheptono-1,4-lacton (**GHL**) (I) a, ácido D-galacturónico (**Galur**) (II) y ácido D-glucárico (**Glucar**) (III) (Figura 1.7).
- ✓ Comparar los resultados obtenidos con los sustratos empleados en estudios anteriores [51-61] para lograr una interpretación más profunda del mecanismo de reacción redox.
- ✓ Estudiar la reactividad del Cr^{IV} frente a los diferentes hidratos de carbono (neutros y ácidos) para determinar si el proceso oxidativo por esta especie, se encuentra o no, involucrado en etapas rápidas de reacción.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Materiales

Reactivos

α -D-glucopiranososa (Sigma, 99,0 %), 1-metil- α -D-glucopiranososa (Sigma, 99,0 %), 2-desoxi- α -D-glucopiranososa (Sigma, 99,0 %), D-glucitol (Sigma, 99,0 %), 3-O-metil- α -D-glucopiranososa (Sigma, 99,0 %), α -D-galactopiranososa (Sigma, 99,0 %), 1-metil- α -D-galactopiranososa (Sigma, 99,0 %), 6-desoxi- α -L-galactopiranososa (Sigma, 99,0 %), ácido D-galacturónico (**Galur**) (Sigma, 99,0 %), ácido D-glucónico (Sigma, 99,0 %), D-gluconato de sodio (Sigma, 99,0 %), D-glucono-1,5-lactona (Sigma, 99,0 %), D-glicero-D-gulo-heptono-1,4-lactona (**GHL**) (Sigma, 99,0 %), D-glucaro-1,4-lactona (Sigma, 99,0 %), D-glucaro-6,3-lactona (Sigma, 98 %), ácido 2-etil-2-hidroxi-butanoico (**ehba**: 2-ethyl-2-hydroxi-butanoic acid, por sus siglas en inglés) (Sigma, 98 %), perclorato de sodio monohidratado (Fluka, 98,0 %), oxígeno (99,99 %), ácido perclórico (ACS Baker reagent > 96 %), hidróxido de sodio (Cicarelli, PA), hidróxido de potasio (Cicarelli, PA), ácido clorhídrico (Cicarelli, PA), Zn (Cicarelli, PA), HgCl₂ (Cicarelli, PA), ácido sulfúrico (Cicarelli, PA), ácido nítrico (Cicarelli, PA), Cr(ClO₄)₃·6H₂O (Sigma-Aldrich, 98 %), D₂O (Sigma, 99,99 %), glutatión reducido (**GSH**) (Sigma, 98,0 %), ácido D-glucoheptónico (Sigma, 99,0 %), ácido fórmico (Sigma - ACS reagent > 96 %), bicarbonato de sodio (Sigma, 99,0 %), dicromato de potasio (Mallinckrodt, PA), acrilonitrilo (Aldrich, 99,0 %), acrilamida (Sigma, 99,0%), metanol (Cicarelli, PA),

difenilpicrilhidrazilo (**dpph**) (Aldrich, PA), difenilcarbazida (**DFC**) (Sigma-Aldrich, PA), peróxido de hidrógeno 100 vol (Cicarelli, PA), [Fe(NH₄)₂](SO₄)₂ (Cicarelli, PA), Ar (99,99 %), ácido 4-(2-Hidroxi-etil)-1-piperazine-etanosulfónico (**Hepes**) (Sigma ultra, 99,5 %), NaH₂PO₄ (Anedra, 99,0 %), NaNO₂ (Mallinckrodt, 99,0 %), etanol (Cicarelli, PA), alcohol isopropílico (Anedra, PA), resina de intercambio iónico Dowex 50W, forma H (Sigma), KBr (Sigma-Aldrich, grado FT-IR, ≥99%), Pb(CH₃COO)₂ (Aldrich, 99,0 %).

Los siguientes compuestos se sintetizaron de acuerdo a los métodos descritos en la literatura: [Co^{III}(NH₃)₅Cl]Cl₂ [67], Na[Cr^{VO}(ehba)₂].H₂O [68] y [Cr^{IV}O(ehbaH₂)₂] [45].

En los experimentos cinéticos realizados a fuerza iónica (**I**) constante y diferentes concentraciones de protones, se utilizaron mezclas de perclorato de sodio y ácido perclórico, para lograr los valores de fuerza iónica (**I**) deseados.

La concentración de la solución stock de ácido perclórico se determinó por titulación, empleando métodos analíticos estándar [69].

Para ajustar el valor del pH de las soluciones de trabajo en el rango 1,0 - 4,0, se utilizó HClO₄ mientras que para los experimentos realizados a pH = 7,0 y 3,0 se utilizaron buffers Hepes y ehba, respectivamente.

Precaución: *el dpph, los compuestos de Hg y de Cr son tóxicos y carcinogénicos para el ser humano [70]. Debe evitarse el contacto con la piel y su inhalación. El acrilonitrilo y la acrilamida son carcinógenos y deben ser manejados con cuidado y en campana [71].*

2.2. Instrumental

Las mediciones espectrofotométricas para el seguimiento del consumo de Cr^{VI} en las oxidaciones crómica de los sustratos orgánicos solubles en agua se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-550 con celda de cuarzo termostatzada y controlador electrónico de temperatura PSC-498 T.

Las determinaciones cinéticas de la reacción Cr^{VI} con ácido D-glucárico se realizaron en un espectrofotómetro WAYERS 6000.

Las mediciones de pH se efectuaron con un peachímetro Chemcadet 5986-62 (Cole-Parmer).

La determinación de potasio para el glucarato ácido de potasio se realizó con un equipo Hitachi COBAS C311.

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (**RPE**) de onda continua en banda X (frecuencias 9,0 – 10,0 GHz) y temperatura ambiente se obtuvieron empleando dos tipos de equipos de RPE: (a) espectrómetro Bruker EMX0, generación de microondas Bruker 04 ER, y mediciones de las

señales de RPE, frecuencímetro Bruker EMX 048T, y (b) espectrómetro Bruker EleXsys 500, generación de microondas klystron ER041MR.

Los espectros de RPE se registraron como la primera derivada de la intensidad de la señal y con una resolución de 1024 o 2048 puntos. La temperatura. La modulación de amplitud empleada en estos experimentos está indicada en el texto. Potencia utilizada a temperatura ambiente: 10 mW. En el caso de los estudios de RPE a baja temperatura la potencia utilizada no superó el valor de 1,0 mW. La modulación de frecuencia utilizada fue de 100 kHz.

Los espectros de RPE de onda continua, en banda X, a baja temperatura y los experimentos de pulso ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) se obtuvieron con un espectrómetro Bruker E580 EleXsys (frecuencia 9,76 GHz) equipado con un criostato con He líquido, de Oxford, Inc. Todos los experimentos de pulso ENDOR fueron realizados usando una velocidad de repetición de 1 kHz. Se usó un amplificador de radiofrecuencia (**rf**) ENI-3100L (potencia 0 dB). El campo magnético se midió con un Gaussímetro Bruker ER 035 NMR.

Los experimentos Davies-ENDOR [72] fueron realizados usando una secuencia de pulsos de microondas π -T- $\pi/2$ - τ - π - τ -echo con $t_{\pi/2} = 100$ ns, $t_{\pi} = 200$ ns, T = 36,5 μ s, y $\tau = 300$ ns. Durante el tiempo T se aplicó un pulso de

rf de frecuencia variable y longitud 35 μ s. El incremento de la rf se ajustó en 100 kHz.

Los valores de g_{iso} se determinaron por referencia al estándar dp⁹h ($g_{iso} = 2,0036$). La velocidad y el número de barridos se fijaron en cada caso, de manera de lograr reducir el tiempo de barrido usado en cada medición.

Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos por RPE para el ligando **Galur**, se realizaron cálculos computacionales en el marco de la "teoría del funcional de la densidad" (**DFT**, Density Functional Theory, por sus siglas en inglés). Los cálculos fueron realizados sin restricción de espín sobre cinco complejos diferentes Cr^V-Galur utilizando el programa ORCA (versión 2.7) [73-76]. Se usó un modelo de solvente implícito utilizando la constante dieléctrica del agua de acuerdo al modelo COSMO [77]. Para la optimización geométrica, se utilizó el funcional de densidad Becke-Perdew (BP86) (http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_dft.htm) [78-80], junto con la resolución del método de identidad [81,82].

Se utilizó el set de bases de Ahlrichs (SV (P)) para todos los átomos, excepto con el átomo de cromo, con el que se usó una base más polarizada de valencia triple (TZVPP) [83,84]. La energía se convirtió a 1×10^{-8} hartree (Eh), y la tolerancia de convergencia en la optimización geométrica fue 3×10^{-4} Eh/bohr para el gradiente y 5×10^{-6} Eh/bohr para la energía total.

No se impusieron restricciones simétricas durante la optimización geométrica. Las coordenadas de las estructuras optimizadas se detallan en el material suplementario (Figura S1).

2.2.1 Identificación del producto de oxidación de la reacción Cr^{IV}/sacárido y Cr^{VI}/sacárido

Identificación del producto de oxidación del sustrato orgánico por la especie Cr^{IV} empleando cromatografía líquida de alta eficiencia.

Se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (**HPLC** por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography). Los cromatogramas fueron obtenidos en un cromatógrafo Variant Polaris 200 provisto con una bomba cc Star 9000 HPLC. La separación se llevó a cabo con una columna de intercambio aniónico Spherisorb S Sax HPLC (250 x 4,6 mm) usando 20 mM NaH₂PO₄ con 5 % de etanol como eluyente y una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹, a 44 °C (calentador de columna Zeltec). El eluido de la columna se monitoreó a 220 nm con un detector UV-vis, Pro Star 325.

Identificación del producto de oxidación del sustrato orgánico por la especie Cr^{VI} empleando cromatografía líquida de alta eficiencia.

A guisa de ejemplo:

La determinación del producto de oxidación de la reacción Cr^{VI}/GHL, se realizó empleando un cromatógrafo Varian Pro Star provisto de una bomba 212-LC. La separación se llevó a cabo con una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories) usando H₂SO₄ 4,0 x 10⁻³ M, como solvente de elución y un flujo de 0,6 mL.min⁻¹, a 25 °C. El eluido se monitoreó a 220 nm con un detector UV-vis, Pro Star 325. Todas las muestras se filtraron con una membrana de 0,2 μm previo a la inyección en el sistema cromatográfico.

Identificación del producto de oxidación del sustrato orgánico por cromo hipervalente empleando resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

Las mediciones de Resonancia Magnética Nuclear (**RMN**) se realizaron con un espectrómetro Bruker Ultrashield Avance 300, con transformada de Fourier (FT), sonda pabbo 5 mm, frecuencia de 300,13 MHz para ¹H y 75,47 MHz para ¹³C, a 25 °C.

2.3. Métodos

2.3.1. Preparación de soluciones

En la preparación de todas las soluciones que se detallan a continuación se empleó agua miliQ (18 MΩ x cm = 5,55 x 10⁻⁵ mS/cm).

- Las soluciones de ácido perclórico, fueron preparadas a partir del ácido comercial y estandarizadas con soluciones patrones.
- Las soluciones de Cr^{VI} se prepararon empleando dicromato de potasio, K₂Cr₂O_{7(s)}, como patrón primario previamente calentado en mufla a 150 - 180 °C [85] y enfriado en un desecador hasta pesada constante.
- Las soluciones de Na[Cr^{VO}(ehba)₂]_(ac) se prepararon en buffer ehba (0,10 – 0,20) M a pH = 3,0.
- Todas las soluciones que requirieron fuerza iónica controlada, se ajustaron al valor deseado, con solución de NaClO_{4(ac)}.
- Las soluciones de perclorato de sodio, se prepararon mediante disolución de la sal, NaClO_{4(s)}, en cantidad apropiada de agua destilada, para obtener una solución madre 7,12 M.

2.3.2. Síntesis de D-glucarato ácido de potasio

La síntesis del D-glucarato ácido de potasio (**Glucar**) se realizó según el método de Whistler *et al.* [86], bajo campana con extractor, debido a la gran cantidad de vapores tóxicos de NO_{2(g)} que se liberan en el proceso. En un balón de 500 mL, con tres bocas y juntas esmeriladas, se colocaron 64 mL de HNO₃ concentrado (63 % p/p). El equipo de síntesis fue completado con: agitador sellado, termómetro y condensador de reflujo (Figura 2. 1.a). La solución de HNO₃ se calentó a 60 °C, con agitación constante,

adicionándosele 0,1 g de NaNO_{2(s)}. Se introdujeron gradualmente 50 g de α-D-glucosa, en un lapso de tiempo no menor a 20 minutos. Debido a que la reacción es exotérmica, se controló la temperatura entre 55 – 60 °C, por enfriamiento externo del sistema con baño de agua fría.

Se dejó reaccionar durante una hora y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Con el fin de obtener una solución final de pH ~ 9,0 se adicionó solución de KOH (45 % p/p), con agitación constante y manteniendo la temperatura en el rango de 60 - 80 °C.

Posteriormente se enfrió hasta 20 °C y el pH de la solución se ajustó con HNO₃ (63 % p/p), a un valor de 3,4 unidades de pH, produciéndose la precipitación del Glucar. La mezcla se dejó toda la noche a temperatura ambiente y el precipitado se separó luego por filtración a presión reducida (Figura 2.1.b).

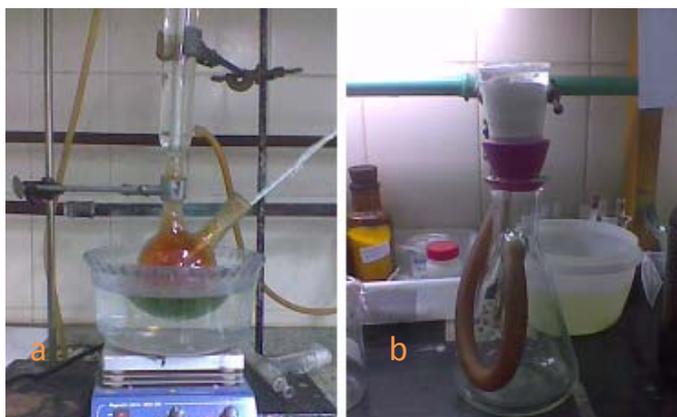


Figura 2.1. (a) Equipo para la síntesis de D-glucarato ácido de potasio. (b) Sistema de filtrado a presión reducida.

El sólido blanco obtenido se lavó con etanol frío al 25 %, para eliminar las aguas madres y se secó en estufa a 50 °C hasta pesada constante. El producto obtenido se disolvió en agua destilada y se recristalizó mediante el agregado de KOH (45 % p/p), con agitación, hasta obtener un valor de pH \approx 9. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a un valor de 3,4 con HNO₃ (63% p/p). Se obtuvieron 30 g de **Glucar**, con un rendimiento de 43 %.

La pureza del producto sintetizado fue verificada por:

(a) Análisis de RMN de ¹H y ¹³C en D₂O, Figura 2.2 y 2.3; los espectros obtenidos resultaron comparables a los de la literatura [87,88].

(b) Análisis elemental de C, H y K, los resultados concuerdan con los esperados para la fórmula KC₆H₉O₈.

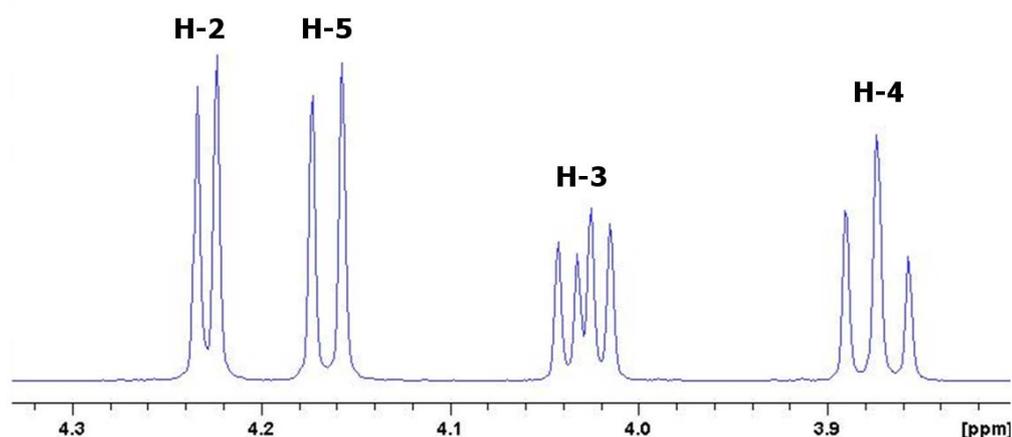


Figura 2.2. Espectro de RMN de ¹H del sustrato Glucar sintetizado. Condiciones: [Glucar] = 0,04 M, solvente agua deuterada, 300 MHz a 25 °C.

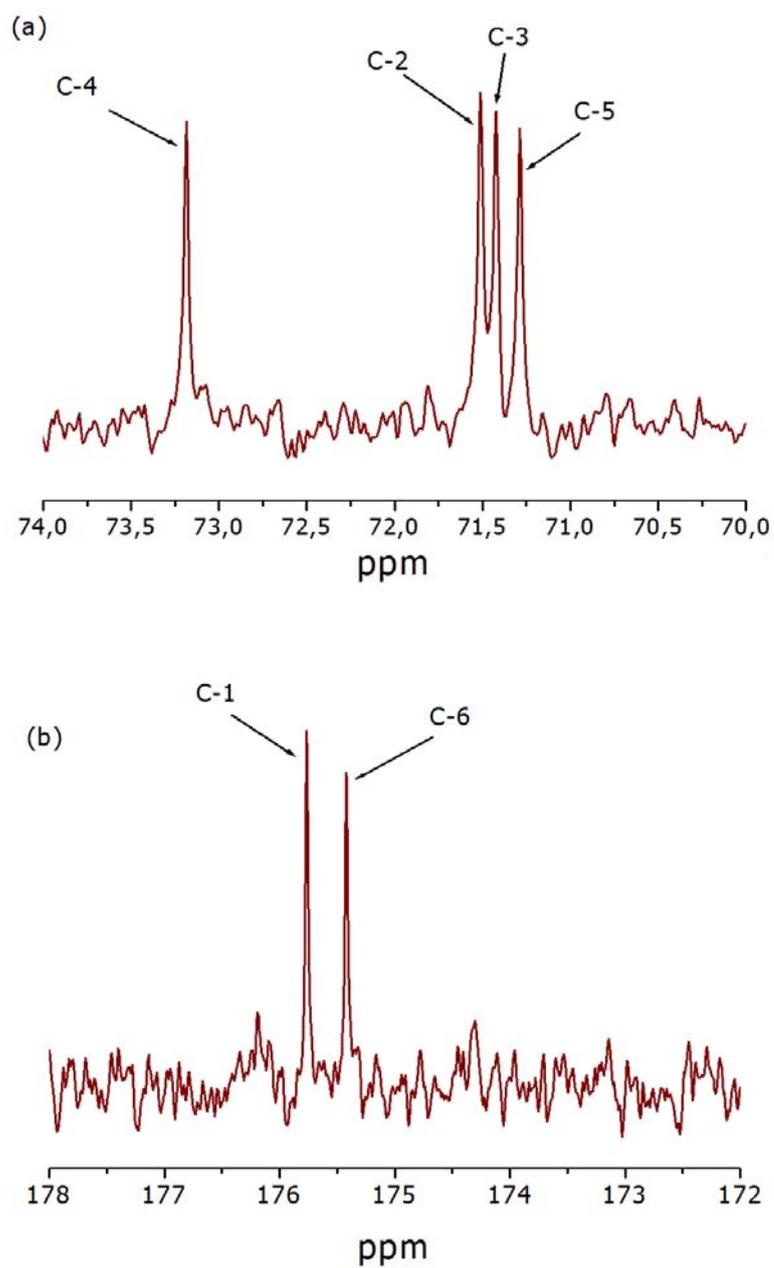


Figura 2.3. Espectro de RMN de ¹³C de Glucar sintetizado. (a) Campo alto, (b) Campo bajo. Condiciones: [Glucar] = 0,04 M, solvente agua deuterada, 300 MHz a 25 °C.

2.3.3. Estudios cinéticos Cr^{IV}/sacáridos

2.3.3.1. Síntesis de Cr^{II}

El Cr^{II} es la especie de partida para obtener el Cr^{IV} utilizado en los estudios cinéticos. La síntesis de Cr^{II} se realizó mediante la reducción de una solución 0,10 M de Cr(ClO₄)₃ con amalgama de Zn (Zn/Hg) en atmósfera de H₂, en medio HClO₄ 0,1 M [62] a temperatura ambiente.

Preparación de la amalgama (Zn/Hg)

10,0 g de Zn (en granallas) se trataron con HCl_(ac) 3,0 M durante 5 minutos para eliminar la capa de ZnO_(s) depositada sobre la superficie del metal. Luego de eliminar el exceso de ácido por lavado con agua destilada, se introdujo el Zn_(s) limpio en un balón de 50,0 mL y se agregaron 20,0 mL de HgCl₂ 0,10 M (disuelto en HCl 0,10 M). Se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se eliminó el exceso de HgCl_{2(ac)}. La amalgama obtenida se lavó tres veces con una solución de ácido HCl_(ac) 3,0 M y finalmente con agua destilada.

Se colocaron en el balón las cantidades necesarias de HClO_{4(ac)} y agua destilada para obtener un volumen final de 35,0 mL y pH = 1,0. El balón se cerró con un septum y se generó una atmósfera reductora utilizando una corriente de hidrógeno durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se agregaron 2,0 mL de solución de Cr(ClO₄)_{3(ac)} 0,10 M, manteniendo la

agitación y la corriente de hidrógeno durante 30 minutos para asegurar la ausencia de O_2 , Figura 2.4.

La reducción cuantitativa de Cr^{III} a Cr^{II} se produjo en un lapso de 12 h a temperatura ambiente, con agitación permanente.

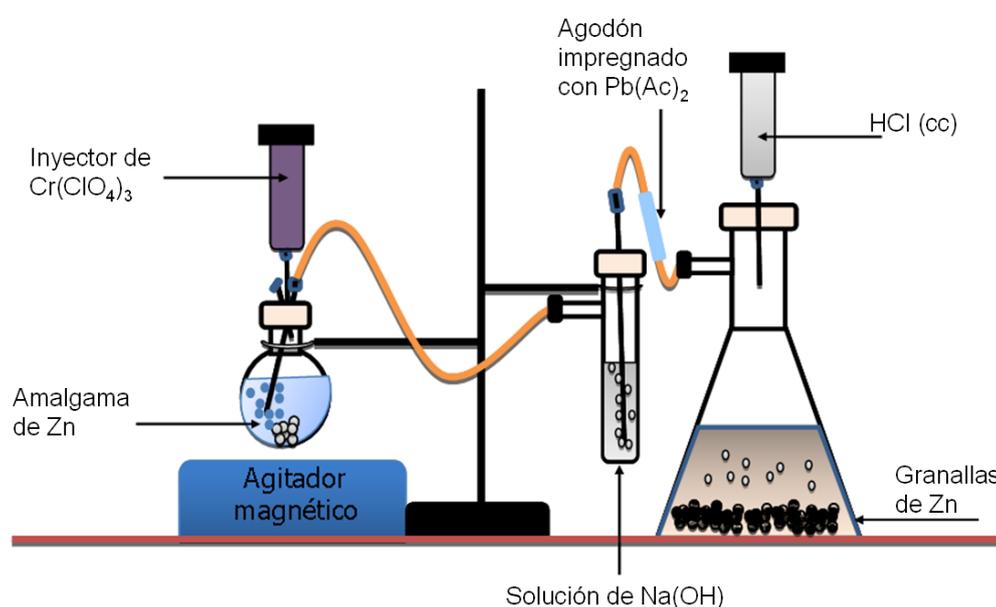


Figura 2.4. Esquema del sistema generador de Cr^{II} .

Nota: El $\text{Zn}_{(\text{s})}$ utilizado para generar la corriente de hidrógeno puede contener impurezas como sulfuros. En este caso, se genera sulfuro de hidrógeno que es arrastrado por la corriente de hidrógeno. Para evitar esto, se colocó un algodón impregnado en $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ en la salida del recipiente generador de $\text{H}_{2(\text{g})}$, que permite atrapar el $\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})}$ como $\text{PbS}_{(\text{s})}$. A continuación, se colocó un

intermediario conteniendo NaOH_(ac), para neutralizar el cloruro de hidrogeno que pudiera también ser arrastrado por la corriente de hidrogeno.

2.3.3.2. Determinación de la concentración de Cr^{II}

Para determinar la concentración de la especie: Cr^{II} generado, se utilizó la técnica de reducción del complejo [Co^{III}(NH₃)₅Cl]Cl_{2(ac)} a [CoCl₄]²⁻_(ac) en medio ácido (HCl_(ac)) y atmósfera anaerobia [67].

Un volumen de 4,0 mL de solución de [Co^{III}(NH₃)₅Cl]Cl_{2(ac)} 2,1 mM (reactivo en exceso) fue desoxigenado con una corriente de Ar_(g) durante 10 minutos y mezclado con 0,5 mL de solución de Cr^{II}, siempre en atmósfera de Ar_(g). Una alícuota de 0,5 mL de la mezcla se transfirió a una cubeta de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico conteniendo 2,0 mL de HCl_(ac) concentrado, sellada con septum, y se realizó un espectro en la zona UV-vis. En condiciones anaeróbicas, la especie Cr^{II} reduce el complejo de Co^{III} a Co^{II} según la ec. 2.1:



El espectro observado está en concordancia con el reportado en la literatura para el CoCl₄²⁻_(ac) [89]. La Figura 2.5 muestra los espectros correspondientes a ambas especies de cobalto. De acuerdo al valor de absorbancia observado, la concentración de Cr^{II} obtenida fue 6,0 mM, demostrando la reducción

cuantitativa de $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_3(\text{ac})$ en las condiciones experimentales antes descriptas.

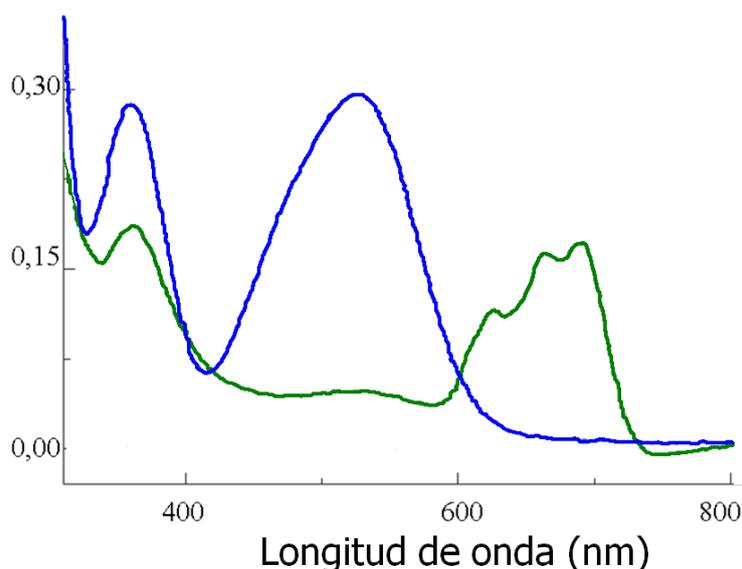


Figura 2.5. Espectros comparativos de las especies de cobalto II y III, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_{2(\text{ac})}$ (---); $\text{CoCl}_4^{2-}(\text{ac})$ (---), $\epsilon_{690} = 524 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.3.3. Generación y cuantificación de Cr^{IV}

El Cr^{IV} puede ser generado rápidamente por reacción del Cr^{II} con el oxígeno presente en la mezcla de reacción. En todos los casos las soluciones de trabajo fueron saturadas con $\text{O}_{2(\text{ac})}$ (1,26 mM). Si la relación $\text{Cr}^{\text{II}}/\text{O}_2$ se encuentra dentro del rango 0,16 - 0,20, entonces se produce una mezcla de superoxo- Cr^{III} (CrO_2^{2+}), (15 - 20 %), Cr^{IV} (máximo 30,0 %) y especies de Cr^{III} ; mientras que al utilizar bajas relaciones $\text{Cr}^{\text{II}}/\text{O}_2$ ($< 0,05$), solamente se forma la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ [38].

Para *lograr una relación Cr^{II}/O₂ apropiada para la obtención de Cr^{IV}*, en todos los casos, se mezclaron rápidamente (en cubeta de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico y termostalizada a 15 °C), 100 µL de solución de Cr^{II} 6,0 mM con 2,3 mL de solución (previamente saturada de oxígeno), conteniendo el sustrato orgánico, *ácido perclórico* y *perclorato de sodio* en cantidades apropiadas para alcanzar un valor de fuerza iónica igual a 1,0 M y una concentración de HClO_{4(ac)} en el rango 0,1 - 0,6 M. La concentración del sustrato orgánico fue variada como se detallará más adelante.

Determinación de la concentración de Cr^{IV}

A 2,3 mL de solución de buffer ehba 0,10 M, saturada con O_{2(ac)} (1,26 mM) a 15 °C, I = 1,0 M (NaClO₄) y pH= 3,0; se le inyectaron 100,0 µL de Cr^{II} 6,0 mM y se realizaron espectros secuenciales, Figura 2.6.

En estas condiciones experimentales el Cr^{IV} generado reacciona con el ehba para producir el complejo [Cr^{IV}O(ehbaH₂)₂]. Este complejo presenta su máxima estabilidad a pH 3,0 y posee una banda de absorción a 512 nm con un coeficiente de absortividad molar de 2380 M⁻¹ cm⁻¹ [45].

Sobre una mezcla de reacción en iguales condiciones, se realizó un seguimiento cinético de la absorbancia a 512 nm en función del tiempo, a partir del cual se calculó el porcentaje de Cr^{IV} generado, Figura 2.7. Bajo

estas condiciones experimentales, la reacción entre Cr^{II} y O_2 produjo 0,05 – 0,07 mM Cr^{IV} (25 % promedio, basado en la $[\text{Cr}^{\text{II}}]_{\text{total}}$).

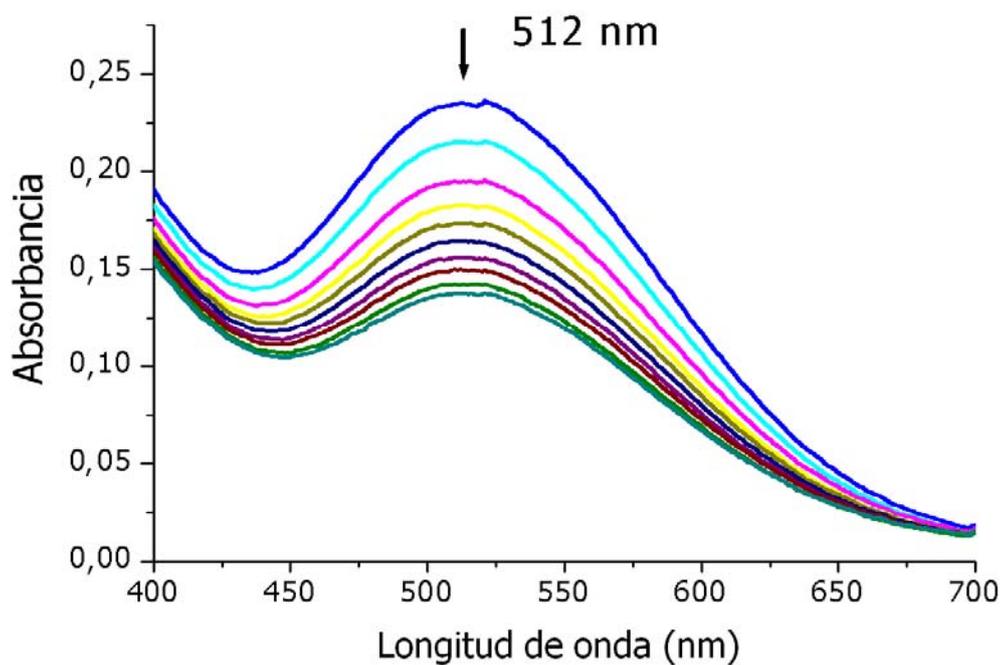


Figura 2.6. Evolución en el tiempo del espectro del complejo $[\text{Cr}^{\text{IV}}\text{O}(\text{ehba})_2]$ a pH 3,0. Condiciones: $[\text{ehba}] = 0,10 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{II}}] = 0,25 \text{ mM}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, espectros secuenciales cada 60 segundos.

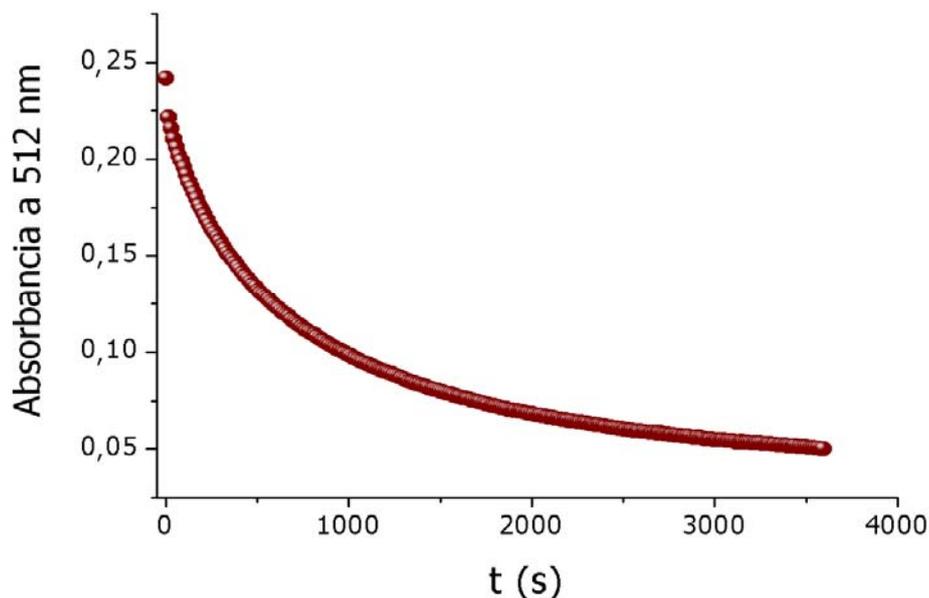


Figura 2.7. Cuantificación del complejo $[\text{Cr}^{\text{IV}}(\text{O})(\text{ehba})_2]$. Condiciones: $[\text{ehba}] = 0,10 \text{ M}$, $\text{pH} = 3,0$, $[\text{Cr}^{\text{II}}] = 0,25 \text{ mM}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 512 \text{ nm}$, datos de absorbancia cada 2,0 segundos.

2.3.3.4. Determinación y caracterización de superoxo-Cr^{III}, CrO₂²⁺

El Cr^{IV} generado (*in situ*) como se describió en la sección anterior (2.3.3.3) reacciona con el sacárido para dar Cr^{II}. Este último se transforma rápidamente en la especie CrO₂²⁺_(ac) debido a su reacción con el oxígeno presente en la solución. La velocidad de aparición del producto CrO₂²⁺_(ac) se relaciona directamente con la velocidad de reacción del Cr^{IV} con el sacárido en estudio. Esta sección y las que siguen a continuación (2.3.3.6 y 2.3.3.7) se dedican a explicar la *detección*, *caracterización* y *propiedades* de la especie CrO₂²⁺_(ac)

mientras que en el capítulo de **Resultados y discusión** se detalla la reactividad del Cr^{IV} con los diferentes sacáridos estudiados.

La detección y la caracterización de la especie CrO₂²⁺_(ac) fueron efectuadas de dos formas diferentes:

a) El primer método consistió en realizar espectros secuenciales, en el rango de 200 – 800 nm, sobre las mezclas de reacción Cr^{IV}/sacárido. La especie: CrO₂²⁺_(ac) posee un espectro característico, con dos intensas bandas de absorción a 290 nm ($\epsilon = 3.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 245 nm ($\epsilon = 7.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), las cuales mantienen una relación de intensidad típica, $\text{Abs}_{245}/\text{Abs}_{290} = 2,2$ [39,90,91]. Para cada reacción Cr^{IV}/sustrato, se realizaron espectros secuenciales en los que se observaron las bandas características del compuesto CrO₂²⁺_(ac). La relación de bandas $-\text{Abs}_{245}/\text{Abs}_{290}$ se mantuvo constante en el tiempo, en un valor de $\sim 2,2$; mientras se producía la lenta descomposición de la especie CrO₂²⁺_(ac) en especies de Cr^{III}, Figura 2.8.

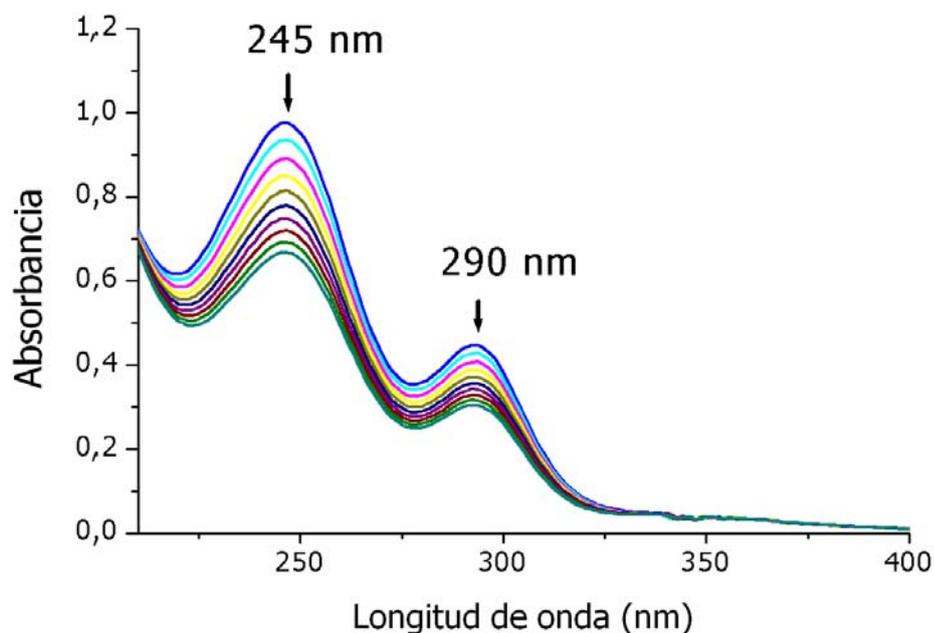
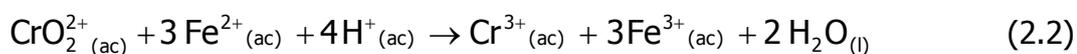


Figura 2.8. Espectros secuenciales del CrO₂²⁺ generado en una mezcla de reacción Cr^{IV}/D-glucopiranososa. Condiciones: [D-glucopiranososa] = 3,0 mM, [O₂] = 1,26 mM, [Cr^{II}] = 0,25 mM, [H⁺] = 0,30 M, I = 1,0 M, T = 15 °C, espectros secuenciales cada 2 minutos.

b) La segunda técnica utilizada para identificar la especie CrO₂²⁺ fue la reacción específica de este compuesto con Fe^{II}, ec. 2.2 [42]:



Al finalizar la reacción redox de la mezcla Cr^{IV}/sacárido, se le adicionó un exceso de solución de Fe^{II} (0,8 mM) y se realizaron espectros secuenciales cada 2 minutos. A cada espectro se le restó el anterior al agregado de Fe^{II}.

Luego de una corrección debido al efecto de dilución, el cual es muy bajo, el espectro diferencial mostró una absorbancia negativa alrededor 290 nm, indicando que en la mezcla de reacción había CrO_2^{2+} [92], Figura 2.9.

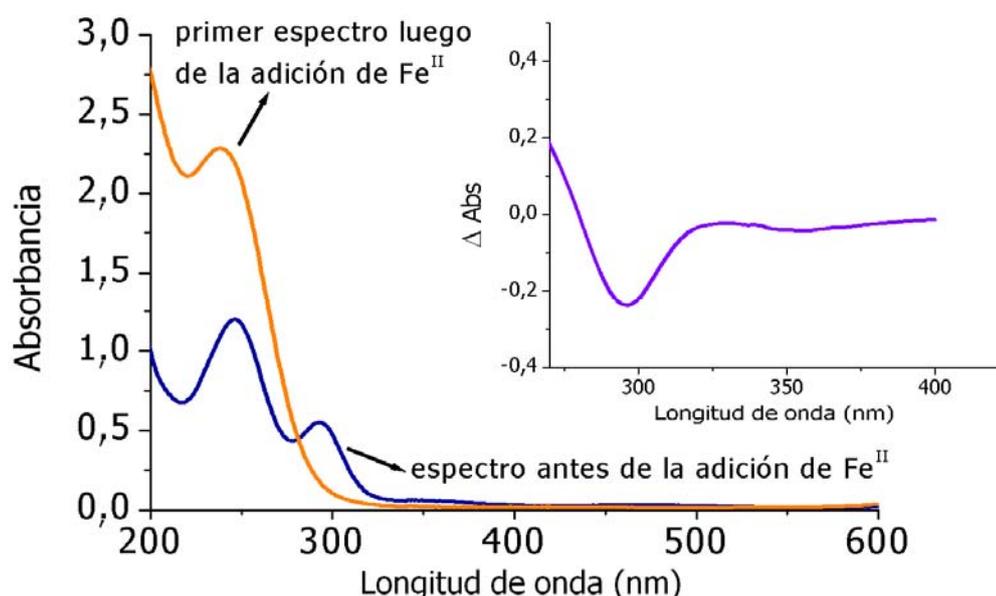


Figura 2.9. Espectro diferencial del CrO_2^{2+} antes y después de la reacción con Fe^{II} . Condiciones: $[\text{D-glucitol}] = 1,0 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] = 0,30 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $[\text{Cr}^{\text{II}}]_0 = 0,25 \text{ mM}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Fe}^{\text{II}}]_0 = 0,80 \text{ mM}$. Inserto: Espectro diferencial.

2.3.3.5. Influencia de la temperatura, la concentración de protones, la fuerza iónica y la concentración de sacárido en la estabilidad del CrO_2^{2+}

Como se mencionó previamente, la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ producida en la mezcla Cr^{IV} /sacárido se descompone lentamente en especies de Cr^{III} . Sin embargo, en la escala de tiempo de nuestras mediciones cinéticas la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$

es suficientemente estable como para poder ser considerado producto final de la reacción redox entre el Cr^{IV} y el sacárido en estudio. Para verificar la estabilidad de la especie CrO₂²⁺ frente a la temperatura, concentración de protones, fuerza iónica y concentración de sacárido; se trabajó en las condiciones experimentales de los estudios cinéticos. Los resultados experimentales indicaron que:

- a) La velocidad de decaimiento del CrO₂²⁺ es mayor a temperaturas altas. Por ello se decidió trabajar a 15 °C, Figura 2.10.
- b) Cuando se usaron dos [H⁺] diferentes para realizar la misma reacción a temperatura y fuerza iónica constante, no se observaron cambios en la velocidad de decaimiento de la especie CrO₂²⁺_(ac). Esto implica que la [H⁺] no altera su estabilidad, al menos durante los tiempos de la reacción redox, Figura 2.11.
- c) A [H⁺] y temperatura constantes, se evaluó la estabilidad de la especie CrO₂²⁺_(ac) para dos valores de fuerza iónica (0,2 y 1,0 M). Los perfiles cinéticos indicaron que el decaimiento no se ve significativamente afectado, incluso empleando valores de fuerza iónica cinco veces mayores. Se trabajó a valores de fuerza iónica 1,0 M, para poder comparar los resultados con estudios previos relacionados con la interacción de Cr/sacáridos, Figura 2.12.

d) Se observó que la variación de la concentración de sustrato no afectó la estabilidad de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$. De esta forma es posible descartar cualquier posible reacción entre la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ y los sacáridos presentes en exceso en la mezcla de reacción. En otras palabras, los resultados mostraron que la velocidad de decaimiento de la especie CrO_2^{2+} , *permaneció inalterada* al variar la concentración de sustrato utilizada, Figura 2.13.

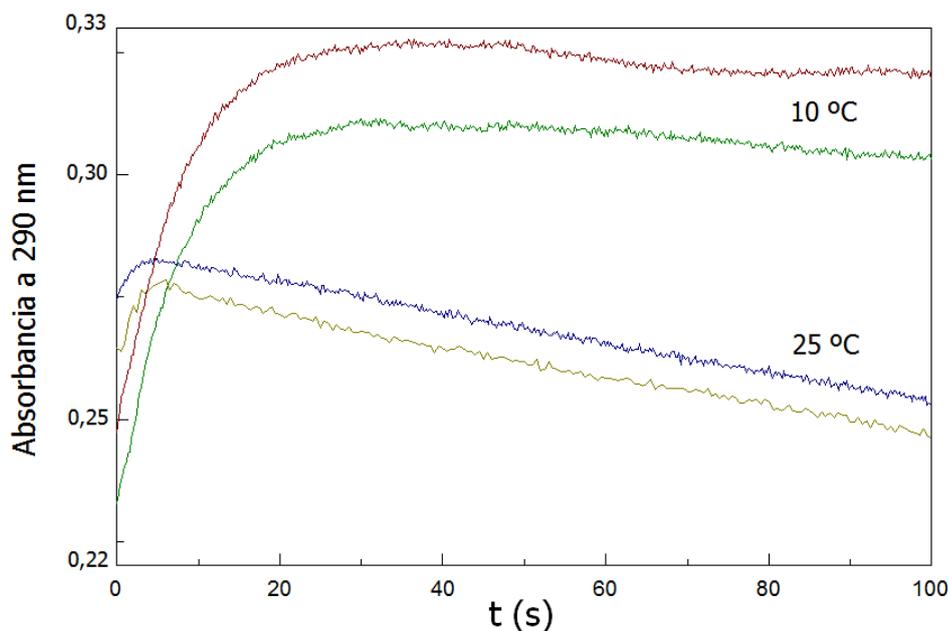


Figura 2.10. Influencia de la temperatura en la estabilidad de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$. Condiciones: [D-glucosa] = 3,0 mM, I = 1,0 M, $[\text{O}_2]$ = 1,26 mM, $[\text{H}^+]$ = 0,30 M.

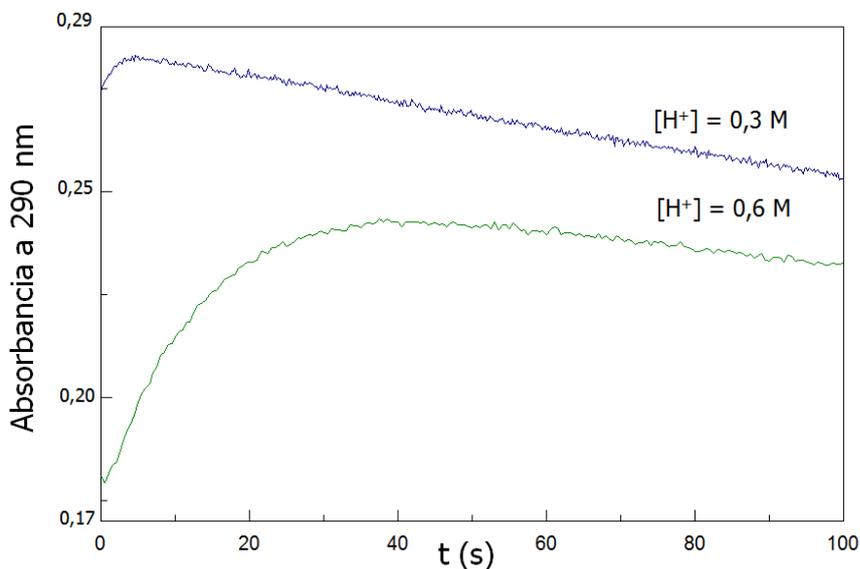


Figura 2.11. Efecto de la concentración de protones sobre la estabilidad de la especie CrO₂²⁺(ac). Condiciones: [D-glucosa] = 3,0 mM, I = 1,0 M, [O₂] = 1,26 mM, T = 15 °C.

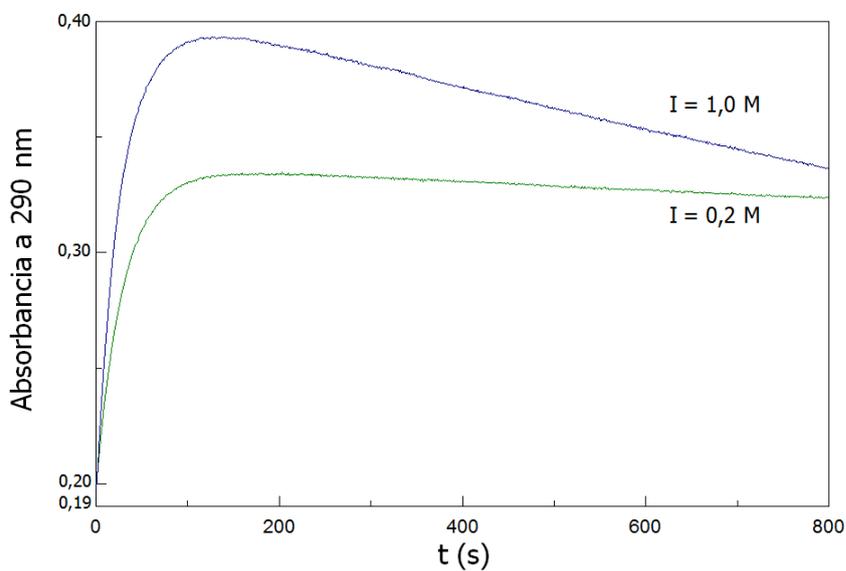


Figura 2.12. Efecto de la I sobre la estabilidad de la especie: CrO₂²⁺(ac). Condiciones: [D-glucosa] = 3,0 mM, [O₂] = 1,26 mM, T = 15 °C, [H⁺] = 0,20 M.

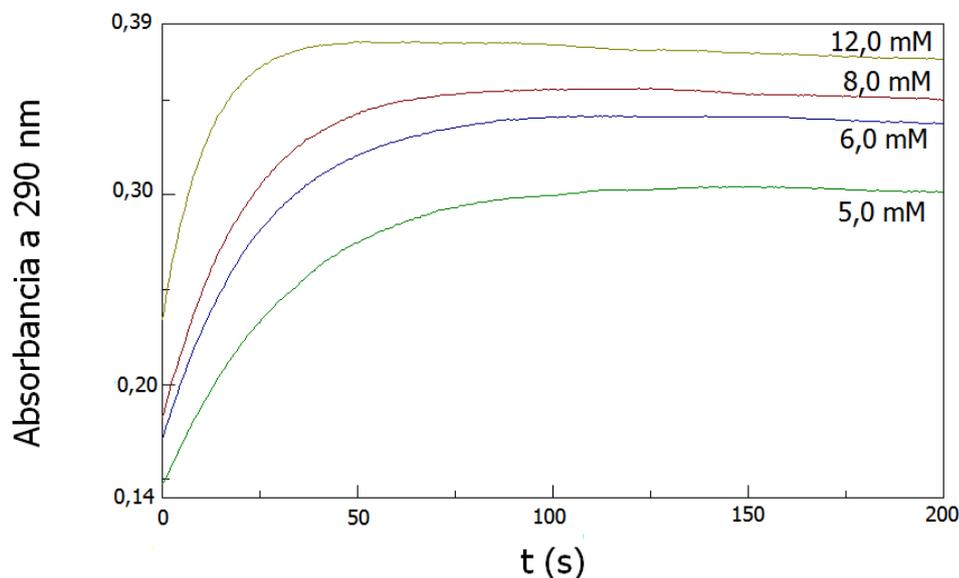


Figura 2.13. Efecto de la concentración de sustrato sobre la estabilidad de la especie: $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$. Condiciones: [1-metil α -D-glupiranósido] = 5,0 - 12,0 mM, $[\text{H}^+] = 0,30 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $T = 15^\circ\text{C}$, $I = 1,0 \text{ M}$.

Una solución de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ fue preparada, empleando un método diferente [93]: se mezclaron 0,30 mL de solución de Cr^{VI} 7,5 mM con 2,7 mL de $\text{H}_2\text{O}_{2(\text{ac})}$ 7,6 mM. La concentración final de $\text{HClO}_{4(\text{ac})}$ fue de 0,1 M. La mezcla de reacción se tornó azul en forma inmediata debido a la formación del oxo-diperoxo- Cr^{VI} , $\text{CrO}(\text{O}_2)_2(\text{ac})$ [42]. A los pocos minutos la mezcla se decoloró para dar una solución de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$. Esta solución fue saturada con oxígeno y enfriada a 15 °C para evitar la descomposición de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$. La velocidad de decaimiento de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$

generado por este método coincidió (dentro del error experimental) con la observada en las mezclas de reacción Cr^{IV}/sacárido.

2.3.3.6. Reacciones competitivas del Cr^{IV}: Oxidación vs desproporción

El Cr^{IV} es una especie inestable [38,39] con una vida media de 30 segundos en HClO₄ 1,0 M [39]. Esta especie de cromo participa en dos tipos de reacciones diferentes:

a) la oxidación de sustratos orgánicos, que representa la reacción que estamos estudiando

b) la desproporción en Cr^{VI} y Cr^{III} vía Cr^V, de acuerdo a las ec. 2.3, 2.4 y 2.5



Dado que el Cr^{VI} también absorbe a 290 nm, longitud de onda donde se realizan las mediciones cinéticas de la reacción Cr^{IV}/sacárido, es importante verificar que el proceso de desproporción no ocurra. Por esta razón, es necesario determinar las condiciones experimentales en las que la oxidación del sustrato por el Cr^{IV} está favorecida sobre la desproporción del Cr^{IV}.

La Figura 2.14 muestra una comparación de los espectros correspondientes a las especies CrO₂²⁺_(ac) y Cr^{VI}_(ac). Como puede apreciarse, existe una región en la que ambos espectros se superponen (200 - 330 nm), pero la absorbancia a 350 nm es solo debida al Cr^{VI}. De esta manera, la desproporción, en el caso de ocurrir, puede ser observada a 350 nm debido a la formación de Cr^{VI}. Para evitar la generación de Cr^{VI} vía desproporción, se requiere una mínima concentración de sustrato en las mezclas de reacción Cr^{IV}/sacárido. Dicha concentración mínima depende de la velocidad de la reacción redox del Cr^{IV} con cada sacárido y fue determinada para cada sustrato orgánico.

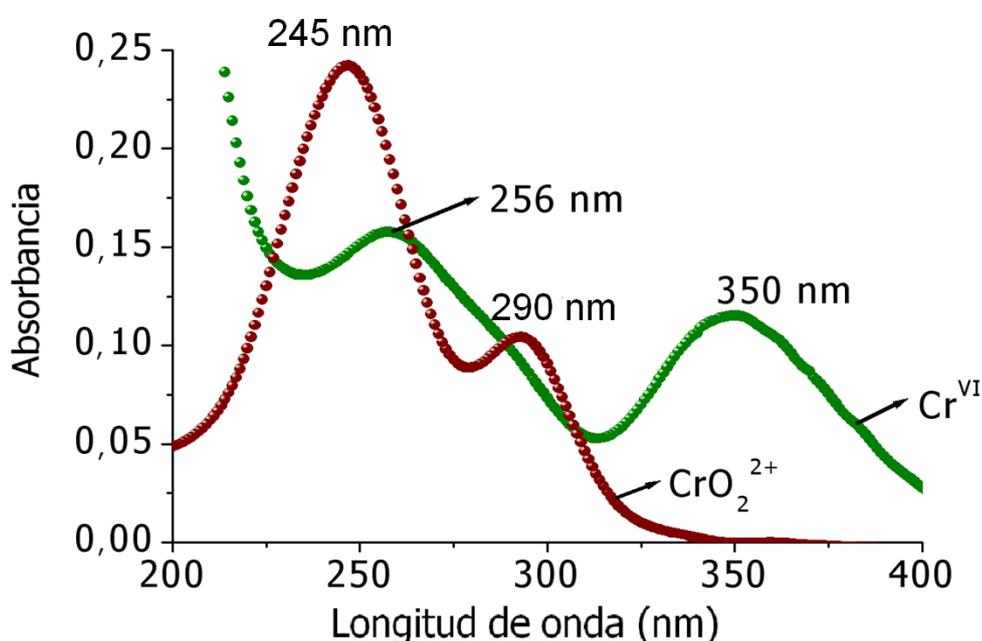
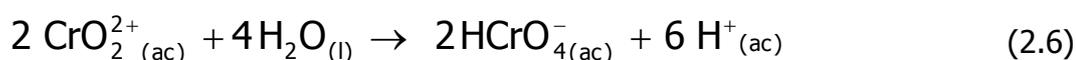


Figura 2.14. Comparación entre los espectros de CrO₂²⁺ y Cr^{VI}. Condiciones: [CrO₂²⁺] = 0,032 mM (rojo), [Cr^{VI}] = 0,080 mM (verde), [O₂] = 1,26 mM, [H⁺] = 0,30 M, I = 1,0 M, T = 15 °C.

La otra posible vía de generación de Cr^{VI}, la descomposición bimolecular de la especie CrO₂²⁺_(ac), ec. 2.6, no se encuentra favorecida en nuestras condiciones experimentales, sino a temperaturas por debajo de 15 °C y altas presiones de oxígeno [37]:



Los resultados experimentales indicaron que la desproporción de Cr^{IV} fue siempre despreciable comparada con su capacidad de oxidar sustratos orgánicos. Solo a muy bajas concentraciones de sustrato o en su ausencia, se puede observar un importante aumento en la absorbancia a 350 nm debida a la formación de Cr^{VI}.

La desproporción total del Cr^{IV}, en ausencia de sustrato, ec. 2.5, puede ser empleada para cuantificar esta especie. Considerando la estequiometría de esta reacción, la concentración inicial de Cr^{IV} se calculó a partir del valor de absorbancia a 350 nm; obteniéndose un valor de [Cr^{IV}]₀ = 0,071 mM; el cual representa el 28 % del cromo total, en acuerdo con la cuantificación por formación de [Cr^{IV}(O)(ehba)₂] a pH= 3,0 (sección 2.3.3.3).

En las condiciones experimentales elegidas para realizar las mediciones cinéticas, se realizaron barridos espectrales entre 200 - 800 nm de las mezclas de reacción, en las que se generó Cr^{IV}, en presencia del sustrato a

estudiar y saturadas con oxígeno. En este trabajo, *solo se consideraron aquellos estudios cinéticos que no mostraron la aparición significativa de Cr^{VI}, asegurando de esta forma, que se trabajó en condiciones experimentales en donde la velocidad desproporción del Cr^{IV} fuese despreciable respecto de la reacción redox Cr^{IV}/sacárido.*

2.3.3.7. Oxidación de sacáridos por Cr^{IV}: condiciones experimentales para el estudio cinético

De acuerdo a lo desarrollado en los puntos anteriores, las condiciones experimentales para el estudio cinético deben ser cuidadosamente elegidas para garantizar que:

- a) la reacción de desproporción del Cr^{IV} sea despreciable respecto de su capacidad de oxidar el sustrato orgánico
- b) el CrO₂²⁺ sea suficientemente estable como para poder ser considerado producto final de la reacción redox Cr^{IV}/sacárido
- c) la velocidad de oxidación sea lo suficientemente lenta como para poder ser medida en un espectrofotómetro convencional.

Teniendo en cuenta todas estas premisas y los resultados experimentales previamente expuestos, *las condiciones experimentales, para todos los*

sustratos orgánicos estudiados por reacción directa Cr^{IV}/sacárido, fueron las siguientes:

Sacáridos neutros

- a) D-glucopiranososa, b) 1-metil- α -D-glucopiranososa, c) D-glucitol,
d) 2-desoxi-D-glucopiranososa, e) 3-O-metil-D-glucopiranososa,
f) 6-desoxi-L-galactopiranososa, g) D-galactopiranososa,
h) 1-metil- α -D-galactopiranososa, i) D-glicero-D-gulo-heptono-1,4-lactona.

[Cr^{II}] = 0,25 mM, [Cr^{IV}] = 0,05 - 0,07 mM, I = 1,0 M, [O₂] = 1,26 mM,

[S] = 0,50 - 10,0 mM, [H⁺] = 0,10 - 0,60 M, T = 15 °C.

Sacáridos ácidos

- a) ácido D-galacturónico, b) ácido D-glucónico.

[Cr^{II}] = 0,25 mM, [Cr^{IV}] = 0,05 - 0,07 mM, I = 1,0 M, [O₂] = 1,26 mM,

[S] = 0,50 - 4,0 mM, [H⁺] = 0,10 - 0,30 M, T = 15 °C.

En todos los casos, las soluciones de sustrato se prepararon a partir de una solución madre 0,20 M. Antes de realizar las experiencias cinéticas, se verificó que los sustratos no absorbieran a 290 nm.

Para todas las mediciones se utilizaron cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, cerradas con septum de goma, en las que el Cr^{IV} se generó *in situ*, de

acuerdo a la técnica anteriormente descrita (2.3.3.3 - 2.3.3.7). La reacción fue monitoreada a 290 nm durante 200 segundos, para registrar el incremento en la absorbancia debido a la aparición de la especie CrO₂²⁺_(ac). Todas las mediciones se realizaron al menos, por cuatuplicado, con una diferencia no mayor a ± 10 %.

La dependencia de primer orden de la velocidad de oxidación respecto de [Cr^{IV}] fue determinada en una serie de experimentos donde se varió la [Cr^{IV}] entre (3,0 - 6,0) x 10⁻⁵ M, manteniéndose constantes la temperatura, [S], y fuerza iónica.

2.3.3.8. Determinación de las constantes de velocidad de oxidación experimentales, k_{4exp} , para la reacción Cr^{IV}/sacárido

Con los datos espectrofotométricos obtenidos, se realizaron los correspondientes gráficos de absorbancia a 290 nm vs tiempo, observándose en todos los casos, un comportamiento bifásico (Figuras 2.8 - 2.12):

- (a) la primera parte de las gráficas de absorbancia vs tiempo mostró un rápido crecimiento exponencial simple y se corresponde con la formación de la especie CrO₂²⁺_(ac),
- (b) la segunda parte de la curva, mucho más lenta, corresponde al decaimiento de la especie CrO₂²⁺_(ac) a especies de Cr^{III}.

2.3.3.9. Análisis del producto de la reacción Cr^{IV}/sacárido

El producto de oxidación de la reacción redox Cr^{IV}/sacárido fue determinado por HPLC. *A modo de ejemplo*, se considera el sistema Cr^{IV}/D-glucopiranososa. Para este sistema, la concentración de H⁺ de la mezcla de reacción se ajustó a 0,2 M por adición de HClO_{4(ac)}. La muestra fue filtrada con una membrana de 0,2 mm previo a la inyección en el sistema cromatográfico. Se prepararon soluciones estándar de ácido D-glucónico, D-glucono-1,5-lactona y D-glucopiranososa, y se determinaron sus valores de R_t cromatográficos separadamente.

La mezcla de reacción Cr^{IV}/D-glucopiranososa mostró dos señales, con R_{t1} = 6,24 min y R_{t2} = 7,16 min (Tabla 2.1). Sabiendo que el medio ácido favorece el proceso de lactonización [94] y considerando que solo se observó la señal de la lactona (R_{t1}) en el cromatograma, la segunda señal (R_{t2}) se asignó a la especie CrO₂²⁺_(ac) remanente en la mezcla de reacción. Esto fue confirmado luego, usando un estándar de este compuesto, CrO₂²⁺_(ac), preparado a partir de H₂O_{2(ac)} y Cr^{VI}_(ac) [93].

Adicionalmente, se realizó una co-cromatografía, mostrando el incremento en la señal de la D-glucono-1,5-lactona a 6,23 min.

Tabla 2.1. Detección por HPLC del producto de oxidación orgánico de mezclas de reacción Cr^{IV}/D-glucopiranosa

<i>Sacárido</i>	<i>Tiempo de retención, R_t (min)</i>
ácido D-glucónico	10,76
D-glucono-1,5-lactona	6,23
CrO ₂ ²⁺	7,16
mezcla de reacción	6,23 y 7,16

2.3.3.10. Determinación de los parámetros termodinámicos de la reacción Cr^{IV}/sacárido

Para poder determinar los parámetros de activación correspondientes a la reacción Cr^{IV}/sacárido, se realizaron nuevas mediciones cinéticas con los sustratos D-glucopiranosa y D-galactopiranosa, en las condiciones experimentales detalladas para el estudio cinético, pero variando la temperatura dentro del rango 10 – 30 °C. Los valores de constantes de velocidad a cada temperatura se graficaron en función de T (K), para obtener los valores de los parámetros de activación.

2.3.4. Estudio de la reacción Cr^{VI}/sacárido

2.3.4.1. Evolución en el tiempo de mezclas de reacción Cr^{VI}/sacárido

La evolución en el tiempo de la mezclas de reacción Cr^{VI}/sacárido se realizó mediante seguimiento espectrofotométrico de las mezclas de reacción en solución acuosa. Las concentraciones de sacárido y Cr^{VI} así como la acidez del medio fueron seleccionadas de acuerdo a la velocidad de la reacción redox y la solubilidad del sustrato orgánico.

Estudios cinéticos de la oxidación de sacáridos por Cr^{VI} de sacáridos solubles en medio acuoso

En un experimento típico empleado en el sistema Cr^{VI}/**Galur**, se preparó una mezcla de reacción conteniendo: [**Galur**] = 0,6 M, [HClO₄] = 0,1 M, I= 1,0 M y [Cr^{VI}] = 0,6 mM, a una temperatura de trabajo de 33 °C. A dicha mezcla se le realizaron espectros secuenciales entre 200 – 800 nm cada 5 min hasta consumo total del Cr^{VI}.

Estudios cinéticos de oxidación por Cr^{VI} de sacáridos poco solubles en medio acuoso

Glucar es, de los tres sustratos estudiados, el que presenta menor solubilidad en agua. Para este caso, la evolución en el tiempo de la mezcla de reacción Cr^{VI}/**Glucar** fue preparada como se detalla a continuación.

Se prepararon 10,0 mL de una mezcla conteniendo: [**Glucar**] = 50 mM, [HClO₄] = 0,15 M, I = 1,0 M. La mezcla fue calentada a 33 °C y rápidamente mezclada con 370 µL de una solución de Cr^{VI} 0,0540 M de manera que la concentración de Cr^{VI} en la mezcla de reacción resultó ser 2,0 mM (relación S/Cr^{VI} 25:1). Inmediatamente se realizaron espectros secuenciales, entre 200 - 800 nm, cada 5 minutos, hasta la desaparición de Cr^{VI} y aparición de las especies de Cr^{III}.

2.3.4.2. Detección de los intermediarios de reacción Cr^{IV}/Cr^{II} en mezclas de reacción Cr^{VI}/sacárido

La posible formación de Cr^{IV}/Cr^{II} en mezclas Cr^{VI}/sacárido se realizó mediante seguimiento espectrofotométrico en la región entre 200 - 500 nm. En caso de formarse Cr^{II} en estas condiciones, rápidamente es convertido por el O₂ presente en la especie CrO₂²⁺_(ac), cuyas bandas de absorción características (290 y 245 nm [39,40]) pueden ser detectadas. Las mezclas de reacción para cada sustrato se prepararon conteniendo las cantidades que se indican a continuación:

- [GHL] = 0,2 M, [HClO₄] = 0,2 M, [Cr^{VI}] = 0,03 mM, I = 1,0 M.
- [Galur] = 15,0 mM, [HClO₄] = 1,0 M, [Cr^{VI}] = 0,07 mM, I = 1,0 M.
- [Glucar] = 50,0 mM, [HClO₄] = 0,3 M, [Cr^{VI}] = 0,01 mM, I = 1,0 M.

Las mezclas fueron incubadas a 25 o 15 °C; en una cubeta de cuarzo, de 1,0 cm de paso óptico, cerradas con septum. A continuación se saturaron en oxígeno (1,26 mM) y finalmente se les inyectó solución de Cr^{VI}.

Para los sustratos **GHL** y **Galur**, cuando la [Cr^{VI}] resultó despreciable, se adicionó una solución $1,5 \times 10^{-4}$ M de Fe^{II}_(ac) para confirmar la identidad de la especie CrO₂²⁺_(ac) (ec 2.2).

2.3.4.3. Estudios cinéticos Cr^{VI}/sacárido

2.3.4.3.1. Estudios cinéticos para sacáridos solubles en agua: sistemas Galur/Cr^{VI} y GHL/Cr^{VI}

El estudio cinético de la reacción Cr^{VI}/sacárido, para los sustratos GHL y Galur, se realizó mediante seguimiento espectrofotométrico de la desaparición de la especie Cr^{VI}, a 350 nm. El monitoreo de los valores de absorbancia se realizó hasta un valor de al menos un 80 % del valor inicial. Todas las mediciones se realizaron a un valor de T= 33 °C, I = 1,0 M, [Cr^{VI}] en la mezcla de reacción, para todos los experimentos fue de $6,0 \times 10^{-4}$ M. Las concentraciones de sustrato y la [H⁺] se variaron según se detalla a continuación:

- **GHL** (0,036 – 0,15) M, HClO₄ (0,2 – 1,0) M.
- **Galur** (0,18 - 0,42) M, HClO₄ (0,2 – 0,97) M.

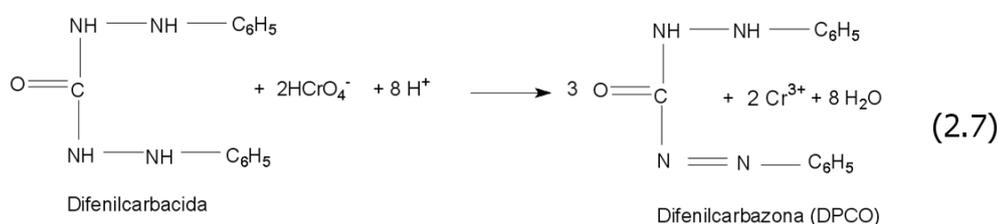
Los valores observados de constante de velocidad fueron obtenidos por ajuste no lineal de los datos de absorbancia y a partir de múltiples determinaciones, con una diferencia no mayor a $\pm 10\%$ entre cada determinación. La dependencia de primer orden de la constante de velocidad redox respecto de la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ fue determinada en una serie de experimentos donde se varió la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ entre $(3,0 - 6,0) \times 10^{-4} \text{ M}$, manteniendo constante los valores de temperatura, concentración de sustrato y fuerza iónica.

2.3.4.3.2. Estudios cinéticos para sacáridos poco solubles en agua: sistema Cr^{VI}/Glucar

Una de las mayores dificultades para llevar a cabo los estudios cinéticos de la interacción entre Cr^{VI} y Glucar es la baja solubilidad de este sustrato. A 33 °C y I igual a 1,0 M la determinación experimental de la solubilidad de este sustrato fue $\leq 50 \text{ mM}$.

El monitoreo de la evolución de la reacción por seguimiento de la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ vs tiempo utilizando espectrofometría UV-vis requiere que la concentración de Cr^{VI} en las mezclas de reacción se encuentre en el orden de $(6 - 8) \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\lambda = 350 \text{ nm}$, $\varepsilon = 1200 - 1300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [95,96]). Para trabajar en condiciones de aislamiento y evitar reacciones de sobre - oxidación del sustrato y/o del producto de oxidación orgánico obtenido de la oxidación crómica de **Glucar**, es necesario emplear relaciones **Glucar**/Cr^{VI} iguales o superiores a 50/1. Sin

embargo, debido a la baja solubilidad del sustrato, no se puede obtener esta relación. Para resolver el problema experimental planteado, se decidió emplear un método alternativo en el cuál el monitoreo en el tiempo de la [Cr^{VI}] se realizó utilizando la reacción de la **DFC** en medio ácido [97]. La reacción entre la **DFC** y el Cr^{VI} genera un compuesto coloreado y estable con una banda de absorción intensa a 540 nm ($\epsilon = 40.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a pH 1,0 (Figura 2.15) [98]. La reacción que ocurre entre el Cr^{VI} y la DFC genera difenilcarbazona (**DPCO**) y Cr^{III}, ec. 2.7. Estos dos compuestos reaccionan entre sí para dar un complejo color violeta, ec. 2.8, que absorbe a 540 nm, Figura 2.15.



Color violeta

Esta reacción es muy sensible y puede detectar Cr^{VI} inclusive cuando éste se encuentra a nivel de trazas. La sensibilidad alcanza el valor de 0,01 mg/L

[98]. Esta reacción se da en medio ácido (pH = 1,0) y se ha demostrado que a un pH superior a 4,0 no se desarrolla el color del complejo, es decir no hay reacción [98].

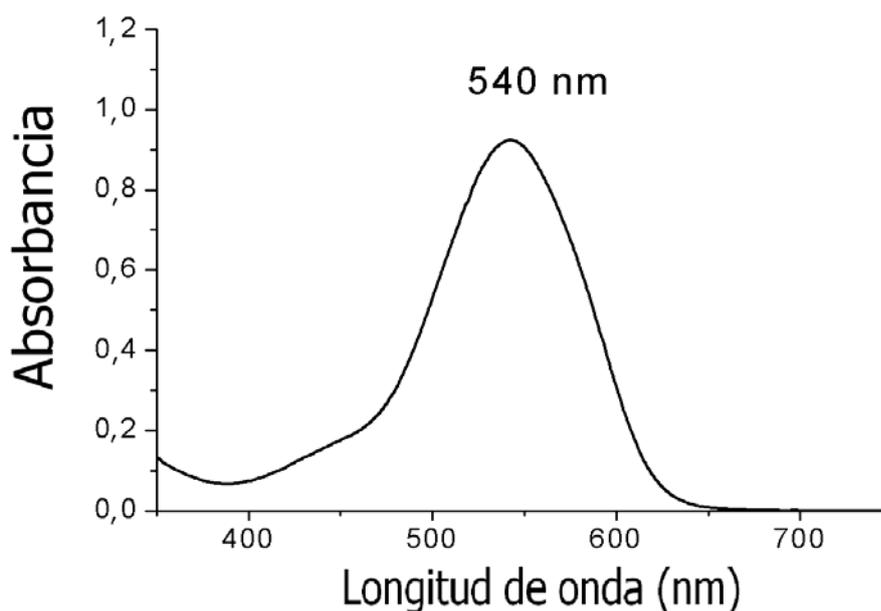


Figura 2.15. Espectro del complejo DFCO-Cr^{III} generado por reacción entre Cr^{VI} y DFC. Condiciones: [Cr^{VI}] = $1,0 \times 10^{-5}$ M, pH = 1,0, T = 25 °C, DFC = 8,2 mM.

Para la determinación del rango de linealidad entre la Absorbancia a 540 nm y la concentración de Cr^{VI} se realizó una curva de calibración por triplicado. La concentración de Cr^{VI} se varió entre ($3,0 \times 10^{-6}$ - $2,5 \times 10^{-5}$) M, el pH se mantuvo constante (pH = 1,0) y se trabajó a temperatura ambiente. A estas soluciones se les midió absorbancia a 540 nm luego de 10 minutos del agregado de **DFC**. La curva de calibración generada por la reacción Cr^{VI}/**DFC** se muestra en la Figura 2.16.

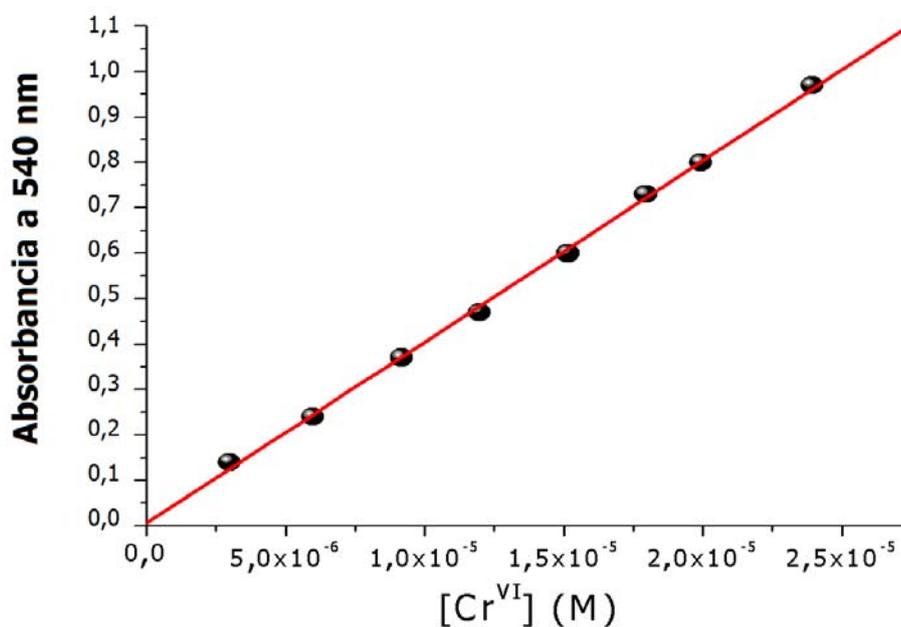


Figura 2.16. Curva de calibración para la reacción Cr^{VI}/DFC. Condiciones: pH = 1,0, T = 25 °C, DFC = 8,2 mM, λ = 540 nm.

Como se puede observar, la recta obtenida indica el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer. A partir de la pendiente de la gráfica de absorbancia a 540 nm vs concentración de Cr^{VI} se determinó el coeficiente de absorción molar de la especie Cr^{III}-**DFCO**, $\epsilon = (40.000 \pm 500) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Parámetros de validación para determinación de cromo en solución

Coefficiente de Correlación Múltiple (r)	0,9994
Coefficiente de Determinación (r ²)	0,9998
Pendiente (M ⁻¹ cm ⁻¹)	40.000 ± 500
Ordenada al origen	0,0056 ± 0,0084
Desviación estándar (σ)	0,011
Límite de detección ^[a]	8,2 x 10 ⁻⁷ M (0,037 mg/L)
Rango Lineal (M)	2,5 x 10 ⁻⁶ / 2,5 x 10 ⁻⁵

^[a] Determinado como 3 x σ/pendiente

Estudio cinético

En un experimento típico, se prepararon 50,0 mL de mezcla de reacción, conteniendo **Glucar** (5,0 – 40,0) mM, [HClO₄] (0,1 – 0,5) M y I = 1,0 M. Las mezclas de reacción se calentaron a 33 °C en baño termostatzado y se les adicionaron 93 μL de una solución de Cr^{VI} 0,0269 M, de manera de obtener una [Cr^{VI}] de 5,0 x 10⁻⁵ M en la mezcla de reacción. Se tomaron alícuotas de

1,0 mL a distintos tiempos, a las que se agregó 50 μL de **DFC** al 1% p/v. Finalmente, las soluciones se diluyeron con H_2SO_4 (ac) 0,1 M (pH 1,0) hasta un V_f de 5,0 mL. La solución de **DFC** al 1,0 % p/v se preparó a partir de la droga sólida disuelta en etanol, empleando un sonicador para favorecer su disolución. Los datos obtenidos de absorbancia a 540 nm fueron utilizados para calcular la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ en función del tiempo de reacción. Las constantes de velocidad observadas fueron calculadas a partir de las gráficas de $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ vs tiempo usando el programa Origin 8.0.

2.3.4.3.3. Determinación del orden de reacción con respecto a Cr^{VI}

Se realizaron experimentos cinéticos donde se varió la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ en el rango ($1,0 \times 10^{-4}$ - $5,0 \times 10^{-5}$) M, y el resto de las condiciones se mantuvieron constantes en: $[\text{S}] = 30$ mM, $[\text{HClO}_4] = 0,3$ M, $I = 1,0$ M, $T = 33$ °C.

2.3.4.3.4. Influencia de la I sobre el estudio de oxidación de sacáridos con Cr^{VI}

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo: $[\text{Glucar}] = 30$ mM, $[\text{HClO}_4] = 0,3$ M, I igual a 0,3 M, a un valor de T de 33 °C. Los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes al estudio cinético a la misma $[\text{H}^+]$, $[\text{S}]$ y I 1,0 M.

2.3.4.3.5. Estudios cinéticos para evaluar la velocidad de aparición de especies de Cr^{III} en sistemas Cr^{VI}/sacáridos

Con la finalidad de obtener mayor información cinética de la reacción redox entre el Cr^{VI}/sacárido se estudió la velocidad de aparición de Cr^{III} en el tiempo.

Para los sustratos **GHL** y **Galur**, se siguieron los cambios de absorbancia de la banda de absorción a **570 nm**, en donde las especies de Cr^{III} presentan un máximo de absorción. Estos experimentos fueron realizados a una [Cr^{VI}] = 6,0 mM (en la mezcla de reacción), I = 1,0 M.

Se detallan a continuación las concentraciones de sacáridos, HClO_{4(ac)} y valores de temperatura de trabajo empleadas en estos experimentos

- [GHL] = 1,4 M, [HClO₄] = 1,0 M, T = 33 °C.
- [Galur] = 0,70 M, [HClO₄] = 0,50 M, T = 33 °C.

La concentración de Cr^{VI} empleada en las mezclas de reacción fueron 10 veces superiores a aquellas utilizadas en los estudios cinéticos realizados a 350 nm; debido al bajo valor de ϵ de la especie de Cr^{III} a esta longitud de onda, $\epsilon = 17,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [99]. A partir de los datos de absorbancia a 570 nm, se calcularon las constantes de velocidad para la formación de especies de Cr^{III}.

2.3.5. Estudios cinéticos y de caracterización de especies

oxoCr^V-sacárido

2.3.5.1. Detección y caracterización de especies oxo-Cr^V-sacárido por RPE

La caracterización de las especies oxo-Cr^V-sacárido se estudió por RPE en banda X continua y de pulso ($F \approx 9,44$ GHz). Los complejos oxo-Cr^V-sacárido, fueron generados de diferentes maneras:

- a) intercambio de ligando, empleando el complejo $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]^-$
- b) reacción sacárido/Cr^{VI}/GSH [52,54,55,61,62].

Método I: se produce una reacción de intercambio entre $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]^-$ y el exceso de sacárido, en donde el primer compuesto actúa como donador de Cr^V.

Método II: el complejo oxo-Cr^V es generado mediante la mezcla sacárido/GSH/Cr^{VI}. En una reacción redox muy rápida, el GSH reduce al Cr^{VI} a Cr^V y este último puede ser coordinado por el sacárido en exceso. La mayor ventaja de este último método radica en la rápida generación de especies oxo-Cr^V-sacárido en la mezcla de reacción.

Las mezclas de reacción para generar los complejos oxo-Cr^V-sacárido con los tres sacáridos estudiados, **GHL**, **Galur** y **Glucar**, se prepararon como se indica a continuación:

- [GHL] = 0,3 M, pH 1,0, [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,48 mM, T = 293 K.
- [Galur] = 0,33 M, pH 3,0; [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,67 mM, T = 293 K.
- [Glucar] = 0,13 M, pH 1,0 – 6,0; [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 293 K.

Las muestras fueron medidas inmediatamente (RPE de onda continua a temperatura ambiente) o congeladas en nitrógeno líquido para los experimentos de RPE/ENDOR (**Galur**).

Todos los espectros de RPE se simularon usando el programa PEST WinSIM [100] o el programa EasySpin, una herramienta de Matlab, asumiendo 100 % de formas lorentzianas en las curvas. Los parámetros espectrales de cada especie oxo-Cr^V para una especie compleja en particular, fueron similares en todas las simulaciones; con una desviación máxima de $\pm 0,0001$ en el valor de g_{iso} . Los valores de $^1H_{a_{iso}}$ fueron incluidos en las simulaciones solo cuando resultaran mayores que el ancho de línea de las especies oxoCr^V.

Los parámetros de adquisición de los datos fueron:

- Modulación de amplitud = (0,2 - 2,0) G
- Ancho de barrido = (5,0 – 180,0) G
- Potencia = 1 mW o 10 mW

2.3.5.2. Estudios cinéticos de especies oxo-Cr^V-sacárido por RPE

Previo a los estudios cinéticos de las especies paramagnéticas oxo-Cr^V-sacárido es fundamental determinar el rango de potencia adecuada a utilizar en los estudios de RPE. *Valores de potencia elevados reducen la intensidad de la señal de RPE. Por el contrario, valores de potencia demasiado bajos reducen la relación señal/ruido.* Para encontrar el valor de potencia adecuado, para el estudio de estas especies, se realizaron curvas de saturación; graficando la intensidad de la señal de RPE vs la raíz cuadrada de la potencia utilizada, a temperatura ambiente (Figura 2.18) y a baja temperatura (Figura 2.19). Para realizar este tipo de experiencias, se seleccionó la especie [Cr^VO(ehba)₂]⁻ para obtener la curva de saturación a temperatura ambiente (293 K). La elección de esta especie se relaciona con su relativa estabilidad a pH =3,0 y por su estructura similar a las especies oxo-Cr^V a estudiar. En el caso de los estudios de saturación a baja temperatura (50 K) se utilizó la especie oxo-Cr^V-Glucar. La preparación de esta última especie se explica más adelante en esta misma sección.

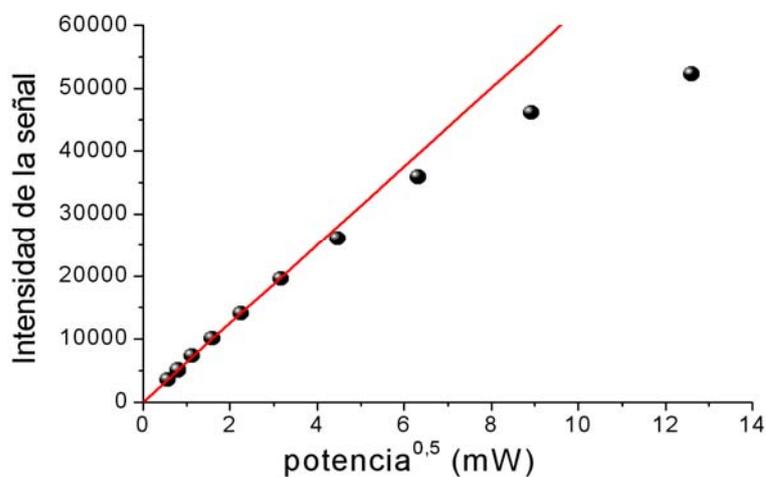


Figura 2.18. Curva de saturación para especies oxo-Cr^V a temperatura ambiente. Condiciones: [Cr^V(O)(ehba)₂]⁻ = 1,0 M, pH = 3,0, T = 293 K, F ≈ 9,44 GHz, Modulación de la amplitud = 0,5 G, ancho de barrido = 10,0 G.

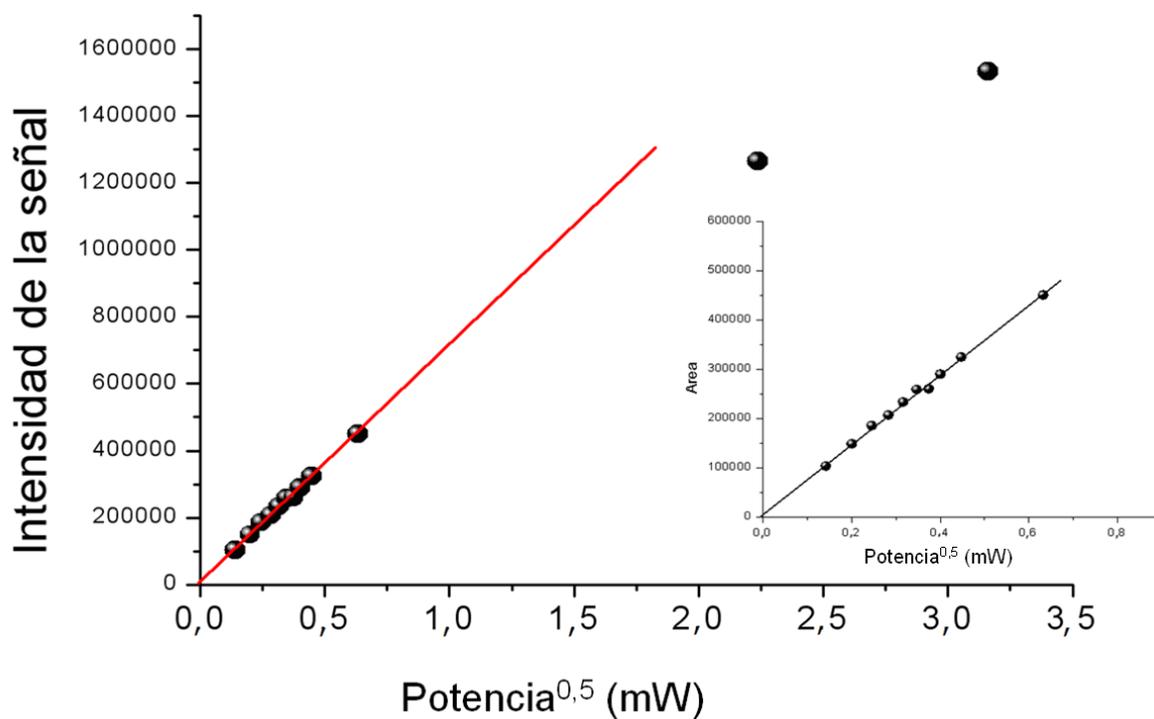


Figura 2.19. Curva de saturación para especies oxo-Cr^V- Glucar a baja temperatura. Condiciones: [Glucar] = 0,03 M, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 50 K, F ≈ 9,44 GHz, Modulación de la amplitud = 0,5 G, ancho de barrido = 10,0 G.

Los resultados obtenidos en las mediciones de RPE de mezclas Cr^{VI}/sacárido (sección 2.3.5.3) indican la presencia de especies de oxo-Cr^V-sacárido en el rango de pH 1,0 - 6,0 y también a alta $[H^+] = 0,2$ M. *Si el Cr^V se acumula en cantidades significativas debe ser incluido en la ecuación de ajuste de los datos cinéticos de la reacción Cr^{VI}/sacárido.* A fin de obtener las constantes de velocidad de formación y desaparición de estas especies se realizó un seguimiento cinético por RPE.

Las mezclas de reacción Cr^{VI}/sacárido fueron preparadas en forma similar a las mezclas utilizadas en los estudios cinéticos espectrofotométricos. Se usaron concentraciones de sustrato y de protones dentro del rango empleado en los estudios cinéticos. Las condiciones experimentales fueron:

- $[\text{sacárido}] = (0,045 - 1,0)$ M, $I = 1,0$ M, $[H^+] = (0,1 - 0,3)$ M y $[Cr^{VI}] = (4,7 - 1,0)$ mM.

Los parámetros de adquisición de los datos de RPE fueron:

- Modulación de amplitud = (1,0 - 2,0) G
- Ancho de barrido = 200 G
- Temperatura = (14 - 20) °C
- Número de barridos = 1

2.3.5.3. Estudios cinéticos de especies oxo-Cr^V-sacárido por espectroscopia UV-vis

En el caso de la reacción de Cr^{VI}/**Glucar**, la cinética de desaparición de las especies oxo-Cr^V-**Glucar** también fue monitoreada por espectrofotometría UV-vis como se detalla a continuación.

La especie Cr^V-Glucar se generó mediante el sistema de intercambio de ligandos, utilizando como especie donora de Cr^V el complejo K₃[Cr^V(O)(LH₂)₂], (LH₂ = Glutación) (síntesis detallada en la sección 2.3.8.5.). Condiciones de obtención de espectros UV-vis de especies oxo-Cr^V-sacáridos:

- [Glucar] = (30,0 – 45,0) mM, [K₃[Cr^V(O)(LH₂)₂]] = 5,67 mM, a pH 3,0, I = 1,0 M, T = 33 °C.

Los espectros de las especies oxo-Cr^V-Glucar obtenidos por intercambio, se compararon con los obtenidos a partir de mezclas de:

- Na[Cr^V(O)(ehba)₂]/Glucar:

[Glucar] = (30,0 – 45,0) mM, [Na[Cr^V(O)(ehba)₂]] = 5,5 mM

- Blanco de Na[Cr^V(O)(ehba)₂]:

[Na[Cr^V(O)(ehba)₂]] = 5,5 mM en buffer ehba 0,1 M (pH = 3,0)

Mediciones cinéticas de la desaparición de las especies de oxo-Cr^{VI}-Glucar

En una cubeta de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, se pesó una masa de 0,0135 g del complejo K₃[Cr^{VI}(O)(LH₂)₂] y se agregaron 3,0 mL de solución conteniendo **Glucar** (30,0 o 45,0 mM), [H⁺] = 0,3 M y I igual a 1,0 M, previamente incubada a 33 °C (temperaturas del estudio cinético Cr^{VI}/Glucar). Se agitó rápidamente para lograr la disolución total del complejo y se siguió espectrofotométricamente los cambios en los valores de absorbancia a 350 nm, durante 1000 segundos.

2.3.6. Análisis de los productos de oxidación de la reacción**Cr^{VI}/sacárido**

A modo de ejemplo, la detección del producto orgánico de oxidación de sacáridos por Cr^{VI}, se explica para el sistema GHL/Cr^{VI}.

Los productos de oxidación orgánicos de la reacción **GHL/ Cr^{VI}** se identificaron mediante la técnica de HPLC, usando mezclas en donde la [GHL] >> [Cr^{VI}].

Las soluciones estándar de **GHL** (2,0 mg/mL), ácido D-glucoheptónico (1,0 mg/mL), ácido D-glucónico (1,0 mg/mL) y ácido fórmico (0,02 mg/mL) se prepararon individualmente en H₂SO₄ (ac) 4,0 x 10⁻³ M, el cual fue empleado como solvente de elución.

Los tiempos de retención cromatográficos (R_t) se determinaron separadamente. El ácido D-glucoheptónico se empleó como patrón, para evaluar la posibilidad de la apertura de la **GHL**.

Se prepararon 50,0 mL de mezcla de reacción, conteniendo GHL (0,11 mmol) y Cr^{VI} (0,0051 mmol), relación Cr^{VI}/GHL 1:20, en $[\text{HClO}_4] = 0,2 \text{ M}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez completada la reacción de reducción de Cr^{VI} a Cr^{III}, el pH de la mezcla se ajustó a 3,0. El ion complejo $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ se extrajo con resina DOWEX, forma ácida. Luego de adicionar la resina, el pH cambió de 3,0 a 1,0. Cuando el pH de la solución llegó a 1,0, se agregó NaHCO₃ sólido para ajustar nuevamente el valor de pH a 3,0. Finalmente, la mezcla se concentró a un volumen de 1,0 mL a 40 °C a presión reducida en un rotavapor. Cada estándar mostró señales cromatográficas con diferentes tiempos de retención como se puede observa en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Detección por HPLC del producto de oxidación orgánico de mezclas de reacción Cr^{VI}/GHL

Compuesto	Tiempo de retención, R _t (min)
GHL	9,10
ácido D-glucónico	8,31
ácido fórmico	13,55
ácido D-glucoheptónico	7,84
mezcla de reacción	8,31 y 13,55

Como se puede observar en la Tabla 2.3, la mezcla de reacción Cr^{VI}/GHL mostró dos picos con valores de R_t de 8,31 min y 13,55 min, además del correspondiente a la **GHL** a 9,10 min. Los tiempos de retención de estas señales son coincidentes con los de las soluciones estándar ácido D-glucónico y ácido fórmico, respectivamente.

2.3.7. Estudio de lactonización de Glucar

Para cada [H⁺] estudiada se prepararon mezclas de reacción conteniendo **Glucar** (10,0 – 20,0 mM) y I igual a 1,0 M, en agua deuterada (V_f = 1,0 mL). Se realizaron espectros secuenciales de ¹H RMN y se analizó la evolución en

el tiempo de cada solución para evaluar la posible lactonización de **Glucar**. Como testigos se prepararon soluciones de igual acidez y fuerza iónica conteniendo D-glucaro-1,4-lactona (II) y D-glucaro-6,3-lactona (III) (30 mg/mL) a las que se les realizó espectros de ¹H RMN.

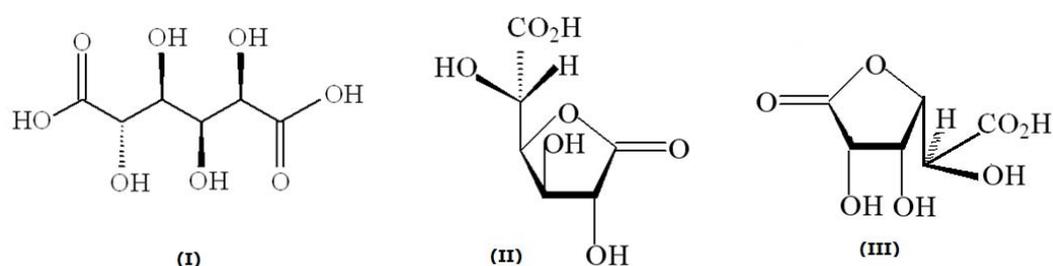


Figura 2.20. Estructuras de Glucar (I) y sus monolactonas, D-glucaro-1,4-lactona (II) y D-glucaro-6,3-lactona (III).

2.3.8. Detección de ésteres de Cr^{VI}

La posible formación de ésteres de Cr^{VI} se investigó por espectroscopia diferencial UV-vis en la región de 350 - 400 nm [101]. La reacción se llevó a cabo en el rango de valor de pH = 6,5 - 7,1. El espectrofotómetro se llevó a cero con las celdas (referencia y muestra), conteniendo solución de Cr^{VI} al pH seleccionado (I = 1,0 M y rango de T = (20 - 25) °C). Luego, la solución de la celda de medición se reemplazó por una mezcla de reacción conteniendo Cr^{VI} (6×10^{-4} M) y el sacárido ((0,03 - 0,12) M). Los espectros obtenidos

durante 30 minutos luego de mezclar, revelaron una banda de absorción a 360 – 390 nm típica de ésteres de Cr^{VI} [101].

2.3.9. Detección de radicales libres

La presencia de radicales libres en la reacción Cr^{VI}/sacárido se determinó mediante el test de polimerización empleando acrilonitrilo o acrilamida según la técnica descrita por Rocek *et al.* [102].

2.3.9.1. Detección de radicales libres empleando acrilonitrilo

Sustratos: **GHL** y **Galur**

A 0,5 mL de acrilonitrilo se adicionaron 3,0 mL de solución conteniendo 0,008 mmol de Cr^{VI} y 0,12 mmol de sacárido (**GHL** o **Galur**) en HClO_{4(ac)} 0,63 M a 40 °C. Luego de unos minutos, se observó la aparición de un precipitado blanco.

2.3.9.2. Detección de radicales libres empleando acrilamida

Sustrato: **Glucar**

A 30,0 mL de una mezcla de reacción conteniendo Glucar 40,0 mM se le agregó 1,0 g de acrilamida, en un recipiente cerrado con septum y se pasó una corriente de Ar por 10 min para eliminar el oxígeno. A continuación se inyectaron 600 µL de Cr^{VI} 0,10 M, para lograr una [Cr^{VI}] = 2,0 mM y una relación [Cr^{VI}]/[**Glucar**] = 1:20. La mezcla se dejó reaccionar hasta

conversión total del Cr^{VI} en Cr^{III} a temperatura ambiente. A continuación se tomó una alícuota de 5,0 mL y se le agregaron 20 mL de metanol frío (0 °C), observándose la aparición de un precipitado blanco.

Para todos los sustratos, los experimentos control (sin Cr^{VI} o sin agente reductor) no mostraron formación de precipitado.

Además, la posible reacción del Cr^V o el Cr^{IV} con el reactivo de revelado (acrilonitrilo o acrilamida) se evaluó empleando los compuestos de coordinación Na[Cr^VO(ehba)₂] y [Cr^{IV}O(ehbaH₂)₂]. No se observó precipitación en mezclas con los complejos de Cr^V o Cr^{IV} con acrilonitrilo/acrilamida en las mismas condiciones experimentales usadas en la reacción Cr^{VI}/sacárido.

2.3.10. Determinación de los valores de coeficientes de absorptividad molar de las especies oxo-Cr^V/sacárido

La determinación experimental de los valores de los coeficientes de absorptividad molar de las especies GHL y Galur, se realizó mediante la técnica de intercambio de ligando entre Na[Cr^VO(ehba)₂] y el correspondiente sacárido [45].

Para obtener las especies oxo-Cr^V-**GHL** se mezclaron 1,0 mL de **GHL** 1,0 M con 20,0 µL de Na[Cr^VO(ehba)₂]_(ac) 0,0250 M, T = 33 °C, pH = 3,0, I igual a 1,0 M y relación [GHL]/[Cr^V] = 40:1. Se realizaron escaneos periódicos de la

mezcla de reacción entre 200 – 800 nm cada 2,0 min. Por otra parte, se midieron los cambios de absorbancia a 350 nm vs tiempo en mezclas de reacción $\text{GHL}/\text{Na}[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{ehba})_2]$ bajo las mismas condiciones experimentales. Las condiciones empleadas para la determinación del coeficiente de absorptividad molar de las especies oxo-Cr^V-Galur fueron las siguientes: a 2,0 mL de **Galur** 1,0 M (pH = 3,0 y I = 1,0 M), se agregaron con 10 μL de $\text{Na}[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]$ 5×10^{-4} M (pH = 3,0), T = 33 °C, en una relación $[\text{Galur}]/[\text{Cr}^{\text{V}}] = 2000:1$. Los cambios de absorbancia se monitorearon a 350 nm cada 0,2 segundos, durante 800 segundos.

2.3.11. Síntesis complejo $\text{K}_3[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{LH}_2)_2]$

El complejo $\text{K}_3[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{LH}_2)_2]$ (siendo $\text{LH}_2 = \text{GSH}$, Figura 2.20), se sintetizó según la técnica descrita en la literatura [101]. A 5,0 mL **GSH** 1,0 M (pH = 7,0), se le adicionaron 5,0 mL K_2CrO_4 0,1 M, dejándose reaccionar por 150 segundos a una T = 4 °C. A continuación se agregó sobre la mezcla de reacción 60,0 mL de metanol a 0 °C; para permitir que precipite el complejo. El precipitado se filtró al vacío y se lavó con metanol a 0 °C. Finalmente, se secó al vacío y se guardó protegido de la humedad y la luz.

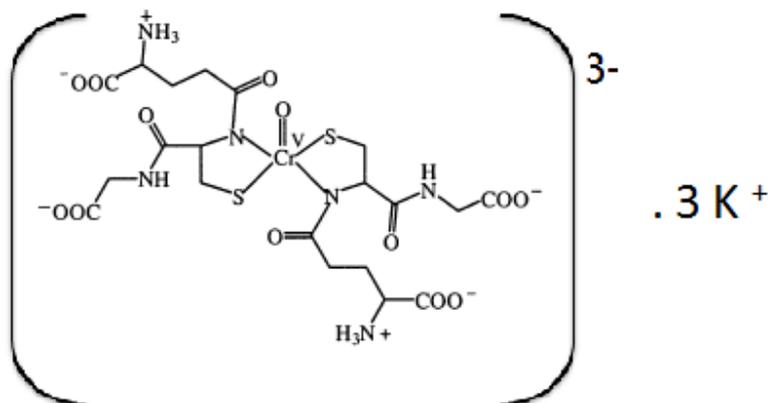


Figura 2.21. Estructura del complejo $K_3[Cr^V(O)(LH_2)_2]$.

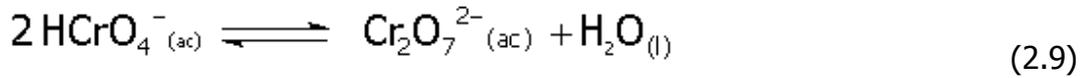
La pureza del complejo se determinó por análisis elemental y espectroscopia RPE; siendo concordante con los datos de literatura [33].

2.3.12. Determinación de la especie reactiva de Cr en la reacción de oxidación Cr^{VI}/sacárido

En el rango de concentraciones de ácido perclórico y de Cr^{VI} utilizados en los estudios cinéticos la especie predominante es el $HCrO_4^-$ [103]. Para asegurar que la especie reactiva de Cr en mezclas Cr^{VI}/sacárido coincida con la especie mayoritaria se utilizó el método desarrollado por Sen Gupta *et al.* [104].

A pH ácido el Cr^{VI} presenta el equilibrio dado por la siguiente reacción, ec.

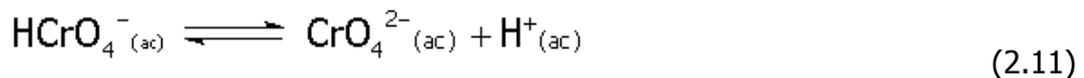
2.9:



La constante de equilibrio K_d (ec. 2.10), presenta un valor = 78 ($T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0 \text{ M}$) [105]

$$K_d = \frac{[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}]}{[\text{HCrO}_4^-]^2} = 78 \quad (2.10)$$

Por otra parte, la constante de equilibrio de disociación del HCrO_4^- (ec. 2.11), en las mismas condiciones presenta un valor = $1,0 \times 10^{-7}$ [104]:



$$K'_d = \frac{[\text{CrO}_4^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{HCrO}_4^-]} = 10^{-7} \quad (2.12)$$

Empleando las ecuaciones 2.9 y 2.10 se pueden calcular la concentración de las especies según:

$$C_i = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{Total}} \quad (2.13)$$

$$[\text{HCrO}_4^-] = 2x \quad (2.14)$$

$$[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}] = C_i - x \quad (2.15)$$

Reemplazando en K_d , y trabajando matemáticamente, resultan las ec. 2.16 y 2.17:

$$K_d = \frac{C_i - x}{(2x)^2} \quad (2.16)$$

$$4 K_d x^2 + x - C_i = 0 \quad (2.17)$$

Los valores de la k_{exp} (constante de velocidad de desaparición de Cr^{VI}) fueron corregidos para diferentes concentraciones de Cr^{VI} total teniendo en cuenta las concentraciones de HCrO₄⁻ y de Cr₂O₇²⁻ presentes en los diferentes equilibrios, ec. 2.18 y 2.19

$$k_{\text{corr1}} = k_{\text{exp}} \left(\frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{Total}}}{[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}]} \right) \quad (2.18)$$

$$k_{\text{corr2}} = k_{\text{exp}} \left(\frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{Total}}}{[\text{CrO}_4^{2-}]} \right) \quad (2.19)$$

Así, utilizando las ec. 2.10 – 2.19 se puede construir la Tabla 2.4. Los resultados de la Tabla 2.4, indican una dependencia de pseudo primer orden de la k_{corr} con la $[\text{HCrO}_4^-]$.

El decaimiento de la absorbancia en el tiempo del sistema Cr^{VI}/Glucar puede ser ajustado con la siguiente ecuación exponencial simple:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}] = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-k_{\text{exp}} t}$$

En la ecuación anterior, k_{exp} representa la constante de velocidad de desaparición de Cr^{VI} en el tiempo.

Por otra parte, los estudios cinéticos de la oxidación de **GHL** y **Galur** por Cr^{VI} muestran un perfil cinético de desaparición de Cr^{VI} completamente diferente. Como se explica más adelante (5.3.1 y 5.3.2), los ajustes de los datos de la variación de la absorbancia en función del tiempo requieren una ecuación más compleja que considera dos tipos de constantes. Para la identificación de

la especie reactiva, en los sistemas Cr^{VI}/**GHL** y Cr^{VI}/**Galur**, solo se considera la constante de velocidad relacionada con la desaparición de Cr^{VI} a la que denominaremos k_{obs} en esta sección.

Las Tablas 2.5 y 2.6 indican una dependencia de pseudo primer orden de la k_{corr} con la [HCrO₄⁻] para ambos sistemas.

Tabla 2.4. Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden con la concentración de HCrO_4^- y $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$: identificación de la especie reactiva de Cr para el sistema Glucar/ Cr^{VI} .

Relación Glucar/ Cr^{VI}	$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0$ (10^{-5} M)	$[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}]$ (10^{-6} M)	$[\text{HCrO}_4^-]$ (10^{-4} M)	k_{exp} (min^{-1})	k_{corr1} (min^{-1})	k_{corr2} (min^{-1})
600/1	6,6	1,27	1,29	$0,023 \pm 0,003$	$1,17 \pm 0,16$	$0,012 \pm 0,001$
500/1	8,0	1,86	1,56	$0,020 \pm 0,002$	$0,82 \pm 0,09$	$0,011 \pm 0,001$
400/1	10,0	2,87	1,94	$0,019 \pm 0,002$	$0,66 \pm 0,07$	$0,010 \pm 0,001$
300/1	13,4	5,05	2,58	$0,019 \pm 0,002$	$0,47 \pm 0,05$	$0,009 \pm 0,001$

^[a] [Glucar] = 40 mM, $[\text{H}^+] = 0,3$ M, I = 1,0 M, T = 33 °C, $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 = (0,0066-0,0134)$ mM.

$$k_{\text{corr1}} = k_{\text{exp}} \times [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 / [\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}], \quad k_{\text{corr2}} = k_{\text{exp}} \times [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 / [\text{HCrO}_4^-]$$

Tabla 2.5. Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden con la concentración de HCrO₄⁻ y Cr₂O₇²⁻: identificación de la especie reactiva de Cr para el sistema GHL/Cr^{VI}.

Relación GHL/Cr ^{VI}	[Cr ^{VI}] ₀ (10 ⁻⁴ M)	[Cr ₂ O ₇ ²⁻] (10 ⁻⁵ M)	[HCrO ₄ ⁻] (10 ⁻⁴ M)	k _{obs}	k _{corr1}	k _{corr2}
300/1	2,0	1,1	3,80	0,040	0,72	0,021 ± 0,0002
150/1	4,0	4,0	7,20	0,037	0,37	0,020 ± 0,0002
100/1	6,0	8,3	10,3	0,036	0,26	0,021 ± 0,0002
75/1	8,0	13,7	13,3	0,035	0,20	0,021 ± 0,0002
60/1	10,0	20,0	16,0	0,033	0,16	0,021 ± 0,0002

^[a] [GHL] = 0,06 M, [H⁺] = 0,6 M, I = 1,0 M, T = 33 °C, [Cr^{VI}]₀ = (2,0 – 10,0) × 10⁻⁴ M.

$$k_{\text{corr1}} = k_{\text{exp}} \times [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 / [\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}], \quad k_{\text{corr2}} = k_{\text{exp}} \times [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 / [\text{HCrO}_4^-]$$

Tabla 2.6. Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden con la concentración de HCrO₄⁻ y Cr₂O₇²⁻: identificación de la especie reactiva de Cr para el sistema Galur/Cr^{VI}.

Relación Galur/Cr ^{VI}	[Cr ^{VI}] ₀ (10 ⁻⁴ M)	[Cr ₂ O ₇ ²⁻] (10 ⁻⁵ M)	[HCrO ₄ ⁻] (10 ⁻⁴ M)	k _{obs} (min ⁻¹)	k _{corr1} (min ⁻¹)	k _{corr2} (min ⁻¹)
400/1	1,5	0,64	2,90	0,047	1,10	0,024 ± 0,0002
300/1	2,0	1,10	3,80	0,043	0,78	0,023 ± 0,0002
200/1	3,0	2,80	5,50	0,038	0,41	0,021 ± 0,0002
100/1	6,0	6,0	10.30	0,035	0,35	0,020 ± 0,0002

^[a] [GHL] = 0,06 M, [H⁺] = 0,6 M, I = 1,0 M, T = 33 °C, [Cr^{VI}]₀ = (2,0 – 10,0) × 10⁻⁴ M.

$$k_{\text{corr1}} = k_{\text{exp}} \times [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 / [\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}], \quad k_{\text{corr2}} = k_{\text{exp}} \times [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 / [\text{HCrO}_4^-]$$

Capítulo 3

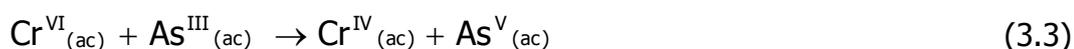
*Estudios cinéticos de la
oxidación de sacáridos
por Cr^{IV}*

3.1. Consideraciones generales al estudio cinético de la oxidación de sacáridos por Cr^{IV}

En este capítulo abordaremos el estudio de la reactividad de la especie Cr^{IV} frente a distintos sacáridos, ácidos y neutros, en medio ácido acuoso. La especie Cr^{IV} es relativamente inestable [38,39] por lo que debe ser generada *in situ*, en presencia de los sustratos elegidos. El método de generación de Cr^{IV}, se constituye entonces, en el primer punto a discutir.

Generación de Cr^{IV} por reacción directa de Cr^{VI} con As^{III} en presencia de exceso de ligando.

Una técnica, **empleada por diferentes investigadores** es la generación de Cr^{IV} a partir de la reacción redox entre Cr^{VI} y As^{III} (agente reductor de dos electrones) en medio débilmente ácido (pH 2,0 – 4,0) y en presencia de un exceso de ligando (L) [45,106,107], de acuerdo a la ec. 3.1:



Sin embargo, este método presenta una serie de inconvenientes que lo hacen poco apropiado para nuestro trabajo. Para que la reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{As}^{\text{III}}$ forme Cr^{IV} es condición indispensable la formación previa de un aducto ternario $\text{Cr}^{\text{VI}}\text{-L-As}^{\text{III}}$ estable, ec 3.1. Si el aducto es lo suficientemente estable, se produce la transferencia electrónica intramolecular y por lo tanto se genera $\text{Cr}^{\text{IV}}\text{-L}$ y As^{V} como lo muestran las ec. 3.2.

Muy pocos *ligandos orgánicos* forman aductos $\text{Cr}^{\text{VI}}\text{-L-As}^{\text{III}}$ estables que favorezcan la reducción intramolecular del Cr^{VI} a Cr^{IV} . Los ligandos que presentan esta característica son α -hidroxiácidos terciarios, tales como los ácidos: 2-hidroxi-2-etil-butanoico (ehba) (I), 2-hidroxi-2-metil-butanoico (hmba) (II) y el ácido quínico ((1R,3R,4R,5R)-1,3,4,5-tetrahidroxíciclohexanocarboxilato(2-)) (III), Figura 3.1.

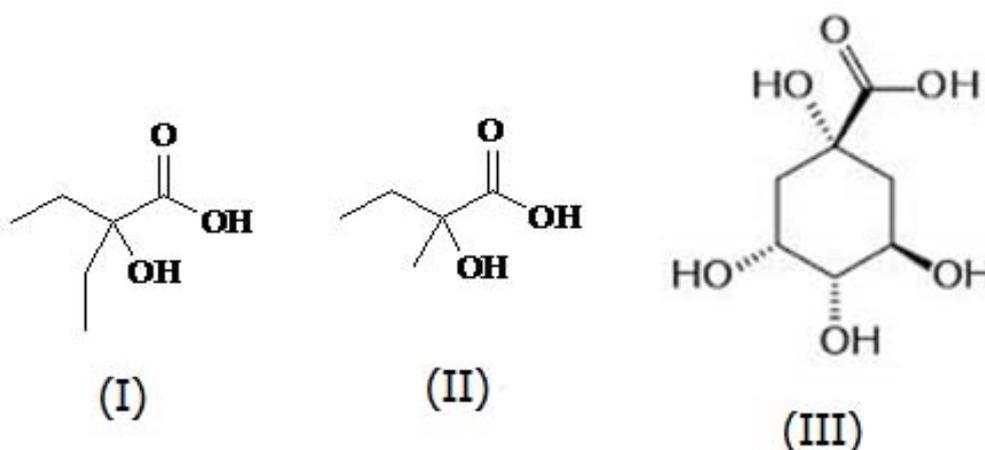


Figura 3.1. Estructuras de los compuestos α -hidroxiácidos terciarios: ácido 2-hidroxi-2-etil-butanoico (ehba) (I),; ácido 2-hidroxi-2-metil-butanoico (hmba) (II), , y ácido quínico: ((1R,3R,4R,5R)-1,3,4,5-tetrahidroxi ciclo hexano carboxilato (2-)) (III).

Obtención de complejos Cr^{IV}-L (L = sacárido) por intercambio de ligandos
[45]

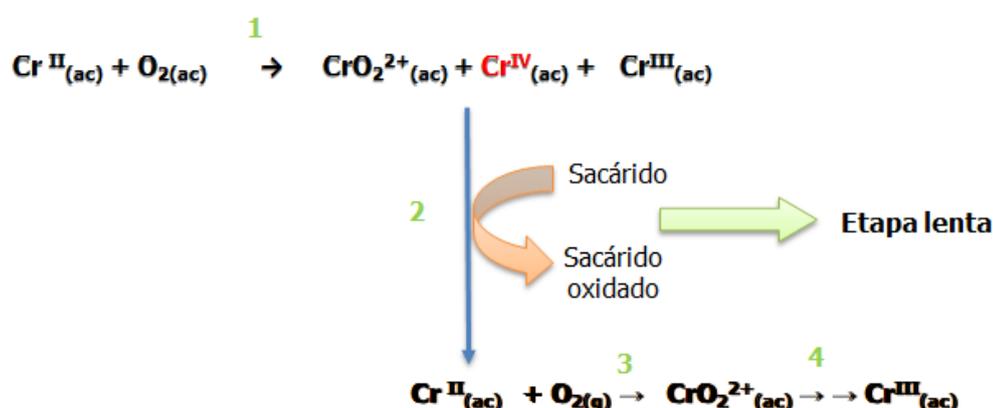
Este método de obtención de complejos Cr^{IV}-sacárido por *intercambio de ligandos* (ec. 3.4), implica trabajar a un valor de pH donde las especies donora y aceptora de Cr^{IV} sean suficientemente estables como para permitir el intercambio de ligando. En la mayoría de los casos, este valor de pH es desconocido. Por otra parte, la reacción de intercambio de ligando debe ser completa, para poder asegurar que los datos obtenidos y constantes cinéticas determinadas, correspondan realmente al sacárido bajo estudio y no a una mezcla de complejos Cr^{IV}-sacárido y Cr^{IV}-ehba.



La reacción de intercambios de ligandos indicada en la ec. 3.4 no se completa en un 100 %.

Obtención de la especie Cr^{IV} "in situ"

Esta metodología consiste en la generación *in situ* de Cr^{IV} a partir de Cr^{II} y oxígeno (en presencia del sustrato a estudiar) [39,62]. La técnica fue detallada en la sección 2.3.3.3, del capítulo 2, *Materiales y Métodos*. El Esquema 3.1 resume sus diferentes etapas.



Esquema 3.1. Reacciones que describen la generación de Cr^{IV} y la reacción Cr^{IV}/sacárido.

Las etapas 1, 2 y 3 del Esquema 3.1 son las que se relacionan con el estudio cinético de la reacción Cr^{IV}-sacárido, para generar la especie redox final CrO₂²⁺(ac).

La *etapa 1* muestra la generación de Cr^{IV} a partir de la reacción del Cr^{II} con oxígeno, una reacción rápida. Como se comentó previamente en la sección *Materiales y métodos*, el Cr^{IV} (generado *in situ*) reacciona con el sacárido en estudio para dar Cr^{II} y sacárido oxidado, *etapa 2*. El Cr^{II} generado por reducción con el sustrato orgánico, es atrapado por el oxígeno en forma rápida y eficiente, con un valor de constante de velocidad de formación de la especie CrO₂²⁺(ac) $k = 1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [90]; para producir en forma cuantitativa, CrO₂²⁺(ac) (*etapa 3*) [37-39]. La reacción de generación CrO₂²⁺(ac) ha sido ampliamente estudiada aplicando diversas técnicas como: radiólisis de pulso [91], espectrometría UV-vis [93] y espectroscopía Raman [108].

El CrO₂²⁺_(ac) generado en la *etapa 3* se descompone luego lentamente en especies de Cr^{III}_(ac), *etapa 4*. Es importante destacar que:

- a) *Las etapas 1 y 3 son rápidas mientras que la etapa 2 es lenta*. Por lo tanto, la *etapa 2* resulta ser la etapa determinante de la velocidad del proceso global de oxidación del sacárido por Cr^{IV}.
- b) Debido a que el Cr^{II} generado en la *etapa 2* se trasforma *rápida y cuantitativamente* en CrO₂²⁺_(ac), la velocidad de aparición de esta última especie se relaciona directamente con la velocidad de desaparición de Cr^{IV}.

El estudio cinético del proceso redox Cr^{IV}/sacárido consiste en medir los cambios de absorbancia en el tiempo debidos a la aparición de CrO₂²⁺_(ac). Como se mencionó previamente, *la velocidad de aparición del CrO₂²⁺_(ac) es un reflejo directo de la velocidad de reacción entre el Cr^{IV} y el sacárido*.

Otras características importantes relacionadas con la elección de ésta especie para el monitoreo de la reacción redox Cr^{IV}/sacárido y que se han comentado con detalle en el capítulo 2, *Materiales y métodos* son:

- a) Posee un espectro definido y característico en solución acuosa [38,39].
- b) Es suficientemente estable durante el tiempo requerido para realizar las mediciones cinéticas (esta especie aparece rápidamente a partir del Cr^{II}

formado (*etapa 3*) y se descompone lentamente en especies de Cr^{III} (*etapa 4*).

c) Ninguna otra especie, además del CrO₂²⁺_(ac), absorbe a 290 nm.

d) No se observaron reacciones CrO₂²⁺/sacárido.

e) La *etapa 4* (descomposición del CrO₂²⁺_(ac)) es 100 veces más lenta que la *etapa 2* (formación de CrO₂²⁺_(ac)). Por lo tanto, es válido suponer que el CrO₂²⁺ es el producto final de la reacción redox Cr^{IV}/sacárido y así obtener información cinética solo del crecimiento exponencial de la curva de absorbancia a **290 nm**.

Es importante destacar, que para cada uno de los sustratos elegidos, la identidad de la especie CrO₂²⁺_(ac) generada, durante la reacción de oxidación Cr^{IV}/sacárido, fue determinada por dos métodos:

a) Verificando en todas las mezclas de reacción Cr^{IV}/sacárido la presencia de CrO₂²⁺ mediante su espectro característico. En todos los casos se controló que la relación de Abs₂₄₅/Abs₂₉₀ presentó un valor = 2,2 [39,90,91] (*Materiales y métodos*, sección 2.3.3.4. (a)).

b) Por espectroscopía diferencial, utilizando la reacción con Fe^{II} (*Materiales y métodos*, sección 2.3.3.4. (b)).

Finalmente, el último punto a considerar, es la condición experimental necesaria para el estudio cinético de la oxidación de sacáridos por Cr^{IV}. De acuerdo con lo expuesto en el *Capítulo 2, Materiales y Métodos*, las condiciones experimentales para el estudio cinético deben ser cuidadosamente elegidas, de forma tal de garantizar que:

- a) La reacción de desproporción del Cr^{IV} sea despreciable respecto de su capacidad de oxidar el sustrato orgánico.
- b) La especie CrO₂²⁺_(ac) sea suficientemente estable como para poder ser considerado producto final de la reacción redox Cr^{IV}/sacárido.
- c) La velocidad de oxidación sea suficientemente lenta como para poder ser medida en un espectrofotómetro UV-vis convencional.

3.2. Determinación de la constante de velocidad de oxidación, k_{4exp}

Como se indicó previamente, la velocidad con la que el Cr^{IV} oxida a cada uno de los sacáridos estudiados fue monitoreada espectrofotométricamente a 290 nm, a través de la aparición de la especie CrO₂²⁺_(ac). En todos los casos, los datos obtenidos fueron representados en un gráfico de Abs₂₉₀ vs tiempo, Figura 3.2. Para todas las mezclas Cr^{IV}/sacárido las gráficas presentaron un *comportamiento bifásico*, (inserto Figura 3.2). En la primera parte de la

gráfica se observa un aumento exponencial rápido que se corresponde con la formación del $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ (*etapa 3* del Esquema 3.1). La segunda parte, más lenta, se relaciona con el decaimiento de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ en especies de $\text{Cr}^{\text{III}}(\text{ac})$ (*etapa 4* del Esquema 3.1). Las respectivas constantes de velocidad experimentales, $k_{4\text{exp}}$, fueron calculadas aplicando un ajuste no lineal, empleando el **80 %** de los datos experimentales de la zona de crecimiento exponencial, de acuerdo a la ec. 3.5 (deducción de la ec. 3.5, ver Anexo 1):

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\infty} + (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_{\alpha}) e^{-k_{4\text{exp}} t} \quad (3.5)$$

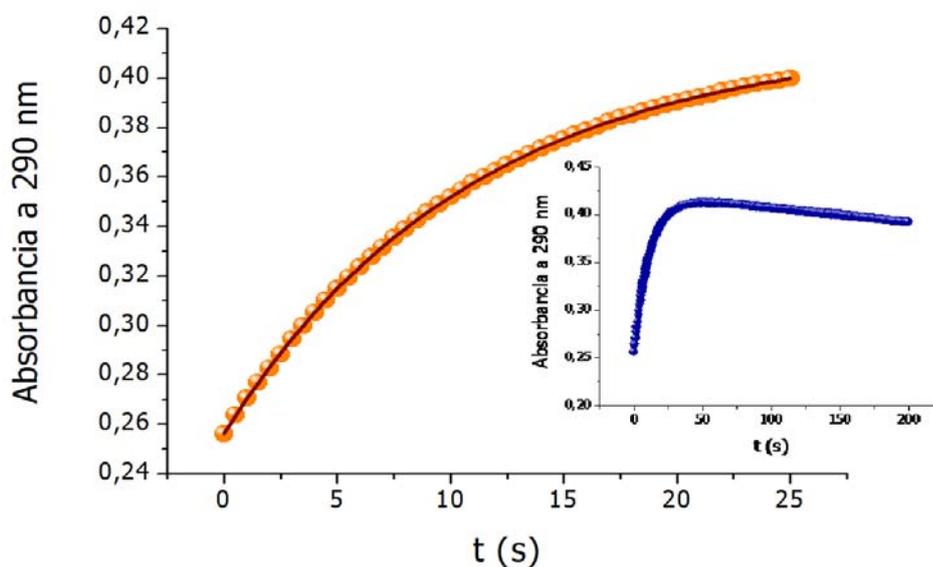


Figura 3.2. Ajuste de los datos de absorbancia vs tiempo para la reacción Cr^{IV}/D-glucosa. Condiciones: [D-glucopiranososa] = 5,0 mM, [H⁺] = 0,3 M, [Cr^{IV}] ~ 0,07 mM, [O₂] = 1,26 mM, T= 15 °C, I = 1,0 M. Inserto: Perfil cinético de la oxidación de sacáridos por Cr^{IV}. El ajuste de los datos experimentales fue realizado usando la ec. 3.5.

La Figura 3.3 nos permite apreciar el efecto de la [S] sobre k_{4exp} para los sacáridos no ácidos. Como se puede observar, para todos estos sustratos se obtiene una familia de rectas con ordenada al origen igual a cero, las pendientes de estas líneas representan las constantes bimoleculares de velocidad de la reacción Cr^{IV}/sacárido, detalladas en la Tabla 3.1. Para *ninguno de los sacáridos neutros estudiados* se observó dependencia de la constante de velocidad, k_{4exp} , con la [H⁺], en el rango (0,1 – 0,6) M. De esta forma, la ley de velocidad experimental para la reacción redox Cr^{IV}/sacárido neutro, puede expresarse como se indica en la ec. 3.6:



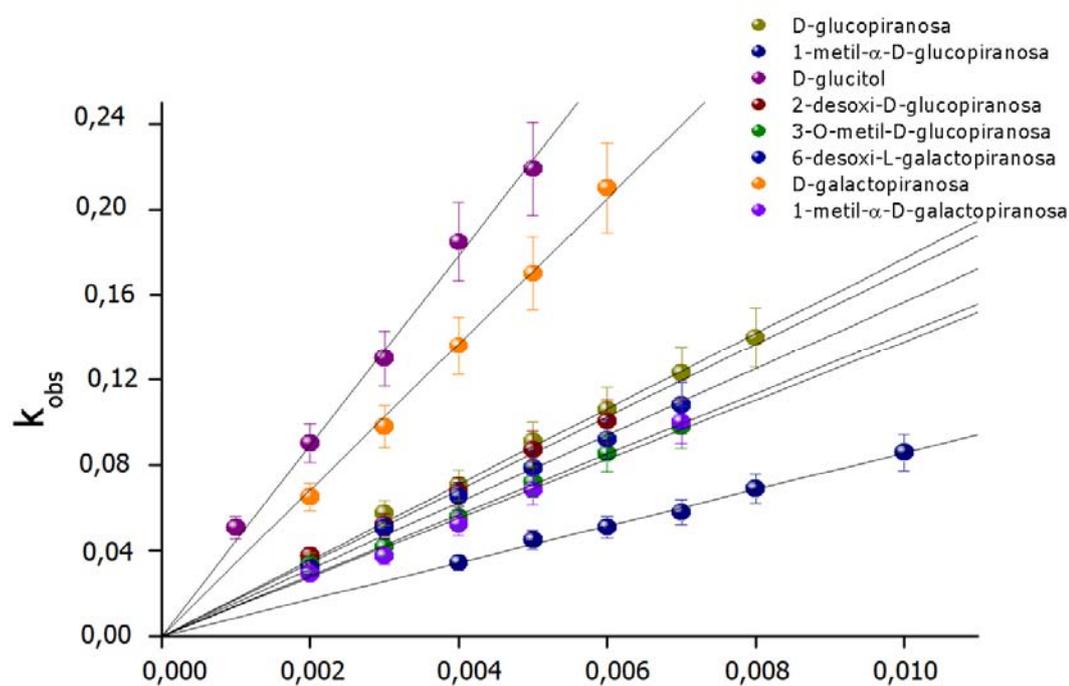
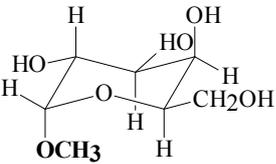
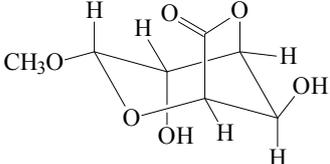
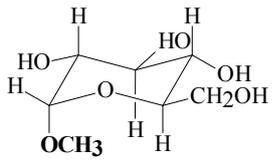
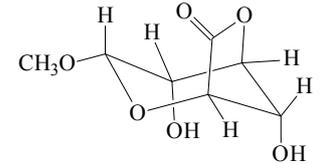


Figura 3.3. Efecto de la [sustrato] sobre $k_{4\text{exp}}$. Condiciones: $[\text{Cr}^{\text{IV}}] \sim 0,07 \text{ mM}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{H}^+] = 0,3 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$. En cada caso, el Cr^{IV} se generó por reacción del Cr^{II} con oxígeno y se monitoreó siguiendo el incremento de absorbancia a 290 nm debida a la formación de $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$.

Tabla 3.1. Constantes bimoleculares de velocidad, k_4 , para sustratos ácidos y no ácidos.

Sustrato (S)	Producto (P)	k_4 (M ⁻¹ s ⁻¹)
S1 	P1 	57 ± 6
S2 	P2 	45 ± 5
S3 	P3 	34 ± 4
S4 	P4 	18 ± 2
S5 	P5 	17 ± 2
S6 	P6 	16 ± 2
S7 	P7 	14 ± 1

<p>S8</p> 	<p>P8</p> 	<p>14 ± 1</p>
<p>S9</p> 	<p>P9</p> 	<p>9 ± 1</p>

S1) ácido D-glucónico, **P1)** ácido 2-ceto-D-glucónico, **S2)** D-glucitol, **P2)** ácido D-glucónico, **S3)** D-galactopiranos, **P3)** ácido D-galactónico, **S4)** D-glucopiranos, **P4)** ácido D-glucónico, **S5)** 2-desoxi-α-D-glucopiranos, **P5)** ácido 2-desoxi-D-glucónico, **S6)** 6-desoxi-α-L-galactopiranos, **P6)** ácido 6-desoxi-α-L-galactónico, **S7)** 3-O-metil-α-D-glucopiranos, **P7)** ácido 3-O-metil-D-glucónico, **S8)** 1-metil-α-D-galactopiranos, **P8)** 1-metil-α-D-galactofuranurono-6,3-lactona, **S9)** 1-metil-α-D-glucopiranos, **P9)** 1-metil-α-D-glucofuranurono-6,3-lactona. Condiciones: [H⁺] = (0,3 – 0,6) M, I = 1,0 M, T = 15 °C.

El orden de reactividad para los sustratos no ácidos, como se deduce de la Tabla 3.1 y la Figura 3.3, es el siguiente:

1-metil-α-D-glucopiranos << *1-metil-α-D-galactopiranos* ~ *3-O-metil-D-glucopiranos* ~ *6-desoxi-L-galactopiranos* ~ *2-desoxi-D-glucopiranos* ~ *D-glucopiranos* << *D-galactopiranos* << *D-glucitol*.

Se pueden realizar varias observaciones a partir de las estructuras de cada sustrato y del orden de reactividad obtenido (Tabla 3.1):

- Los sacáridos de cadena abierta, como el D-glucitol y los sacáridos ácidos, reaccionan más rápido que aquellos con estructura cíclica.
- La velocidad de oxidación de la D-galactopiranos es casi el doble que la velocidad de oxidación de la D-glucopiranos, indicando que un cambio en la

orientación del grupo hidroxilo en el C4 (Tabla 3.1), modifica notoriamente la reactividad del sacárido frente al Cr^{IV}.

c) La ausencia de grupo hidroxilo C2 (2-desoxi-D-glucopiranososa) no afecta la velocidad de la reacción.

d) La metilación del grupo hidroxilo de C3 (3-O-metil-D-glucopiranososa) no afecta significativamente la velocidad de la reacción.

e) La metilación del grupo hidroxilo de C1 (1-metil- α -D-glucopiranososa y 1-metil- α -D-galactopiranososa) reduce notoriamente la velocidad con la que el Cr^{IV} oxida al sacárido respecto de la correspondiente aldopiranososa.

De esta forma, y teniendo en cuenta que la reacción redox Cr^{IV}/aldopiranosas, da lugar a *productos de oxidación a nivel del **C1** puede postularse que éste es el sitio más reactivo de las aldopiranosas.*

La tendencia observada en la reactividad redox de los sacáridos frente al Cr^{IV} puede ser racionalizada al considerar la relativa inestabilidad de los quelatos Cr^{IV}-sacárido que se forman previo a la reacción redox. La mayor reactividad de la D-galactopiranososa con el Cr^{IV} podría ser consecuencia de la *inestabilidad* del complejo Cr^{IV}-sacárido *inducida por interacciones no enlazantes 1,3-diaxiales* [54,109]. La interacción estérica O^{4a}:H^{2a} en el esteroisómero D-galactopiranosido podría justificar su mayor reactividad frente al Cr^{IV}, Figura 3.4. Por el contrario, la D-glucopiranososa, con todos los sustituyentes ubicados en posiciones pseudoecuatoriales, formaría un complejo Cr^{IV}-

sacárido termodinámicamente más estable, que sería oxidado más lentamente que el complejo formado por la D-galactopiranososa, como se observó experimentalmente. Por otro lado, los resultados mostraron que la eliminación del grupo hidroxilo ecuatorial en **C2** (2-desoxi-D-glucopiranososa) y la metilación del grupo hidroxilo en **C3** (3-O-metil-D-glucopiranososa) no modifican esencialmente la velocidad de oxidación de estos sacáridos por Cr^{IV}. Una posible explicación para este comportamiento, es que el *grupo sustituyente* se encuentra en posición *pseudo-ecuatorial*, por lo que no se modificaría la estabilidad del anillo. Por esta razón, los sacáridos D-glucopiranososa, 2-desoxi-D-glucopiranososa y 3-O-metil-D-glucopiranososa son oxidados por Cr^{IV} prácticamente a la misma velocidad.

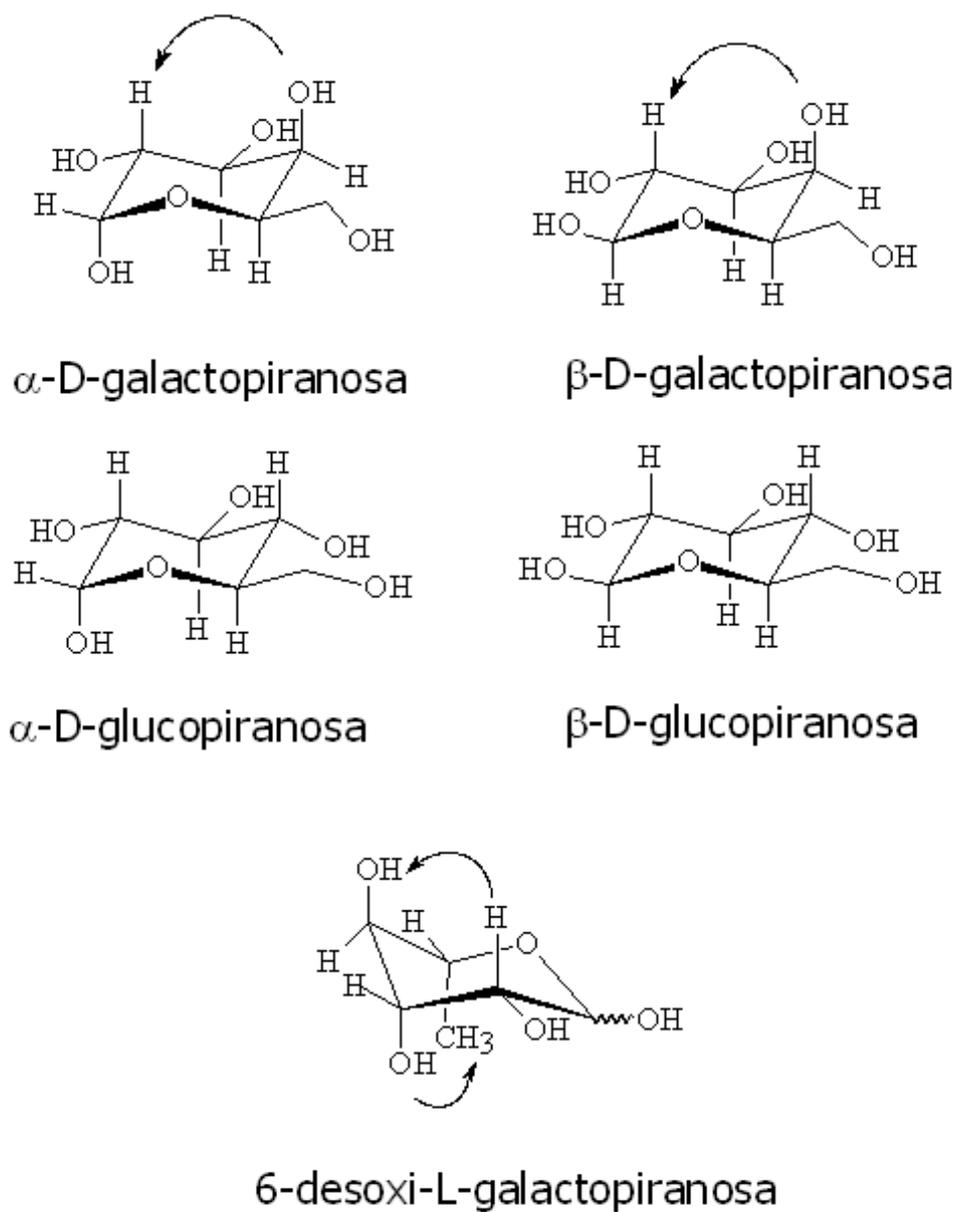


Figura 3.4. Interacciones no enlazantes 1,3-diaxiales en sacáridos.

Observando la 6-desoxi-L-galactopiranososa, Figura 3.4, vemos que hay dos interacciones de tipo 1,3-diaxial, por los que este sacárido debería reaccionar más rápido que la D-galactopiranososa. Sin embargo, el valor de k_4 determinado experimentalmente, revela un comportamiento opuesto. El resultado obtenido no puede ser explicado, entonces, en términos de efectos estéricos. Debe existir otro factor adicional de estabilización del complejo Cr^{IV} -6-desoxi-L-galactopiranososa que justifique la baja reactividad de este sacárido (Tabla 3.1). Una posible explicación sería una diferente conformación de la aldosa en el complejo intermediario. El mismo comportamiento se observó para la oxidación de 6-desoxi-L-galactopiranososa por Cr^{VI} [109].

Finalmente, en solución acuosa, los sacáridos están en rápido equilibrio entre sus formas cíclicas y abiertas. Sin embargo, la baja concentración de la forma abierta [110] presente en las soluciones de D-galacto y D-glucopiranososa y la alta reactividad de las formas $\alpha(\beta)$ -1-metil-galactopiranososa respecto a $\alpha(\beta)$ -1-metil-glucopiranososa con Cr^{VI} [109] indican que la forma reactiva de los sacáridos es la cíclica.

3.3. Parámetros de activación

Con el objetivo de obtener información de los parámetros de activación de la reacción del Cr^{IV} con los sustratos D-glucopiranososa y D-galactopiranososa, estas

reacciones se estudiaron a diferentes temperaturas (10 – 30 °C). Los datos experimentales pudieron ser ajustados empleando la ecuación de Arrhenius (ec. 3.7), que relaciona la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura. Los resultados también pudieron ser ajustados con la Ecuación de Eyring, que resulta de la *Teoría del Estado de Transición*, en su forma exponencial (ec. 3.8) o en su forma logarítmica (ec. 3.9):

$$k = A e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (3.7)$$

$$k = k' \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta S^\#}{R}\right)} e^{-\left(\frac{\Delta H^\#}{RT}\right)} \quad (3.8)$$

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\#}{R} - \frac{\Delta H^\#}{RT} \quad (3.9)$$

Donde:

k Constante de velocidad del proceso en estudio

A *Factor pre exponencial* o *factor de frecuencia*

E_a *Energía de activación de Arrhenius*

T Temperatura en grados Kelvin

k_B Constante de Boltzman = 1,38065 × 10⁻²³ J K⁻¹

h Constante de Plank = $6,62606876 \times 10^{-34}$ J s

R Constante de los gases = $8,3145$ J mol⁻¹K⁻¹

k *Factor de transmisión* = 1, para todas las reacciones en solución

ΔH[#] y **ΔS[#]** entalpía y entropía estándar de activación

Estos dos últimos parámetros corresponden a la formación del complejo Cr^{IV}-sacárido en el estado de transición [111].

Construyendo la gráfica del $\ln(k/T)$ vs T^{-1} , Figura 3.5, conocida como "*perfiles de temperatura*", se puede obtener ΔH^\ddagger a partir de la pendiente, y dado que $\ln(k_B/h)$ y R son valores conocidos, la intersección de la gráfica con el eje y, nos permite calcular ΔS^\ddagger .

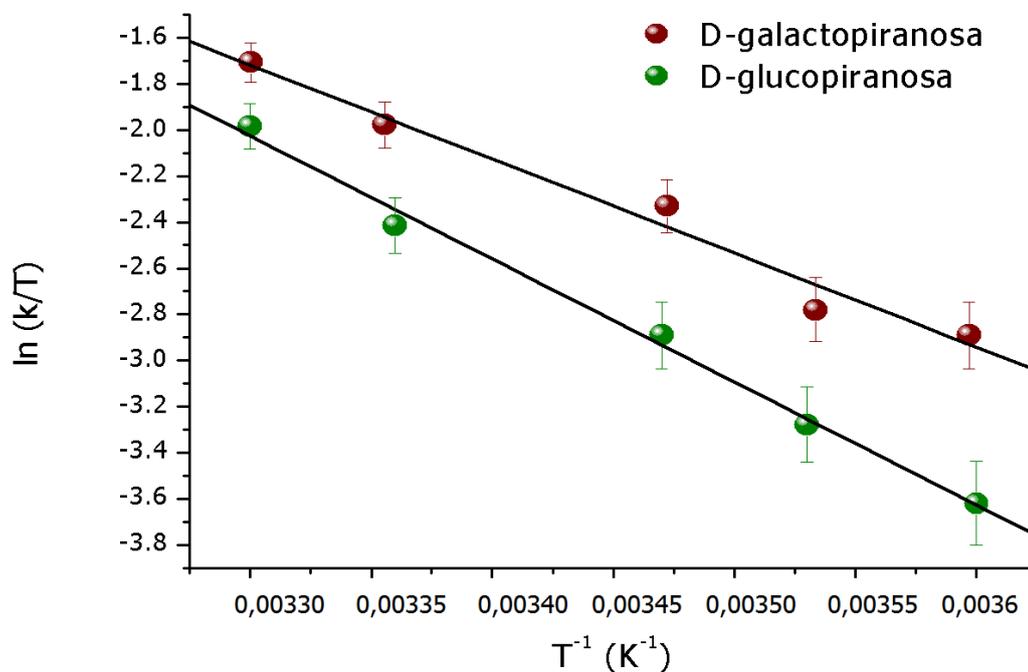


Figura 3.5. Perfil de temperatura para las reacciones D-galactopiranososa y D-glucopiranososa con Cr^{IV}. Condiciones: [Sustrato] = 1,0 mM, I = 1,0 M, [Cr^{IV}] ~ 0,07 mM, [O₂] = 1,26 mM, T = 10 – 30 °C, [H⁺] = 0,30 M.

En la Tabla 3.2 se comparan los valores de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger con los parámetros de activación de la reacción Cr^{IV} con otros compuestos hidroxilados (alcoholes primarios, alcoholes secundarios, 1,2-ciclohexanodiolos y sacáridos) cuyo mecanismo es conocido.

Tabla 3.2. Parámetros de activación para la oxidación por Cr^{IV} de D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, dioles, metanol, 2-propanol y ciclobutanol.

Sustrato	Parámetros de activación		ref
	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	
D-glucopiranososa ^[a]	34	-100	[112]
D-galactopiranososa ^[a]	44	-68	[112]
cis-1,2-ciclohexanediol	41	-78	[113]
trans-1,2-ciclohexanediol	51	-48	[113]
metanol	34	-98	[38]
2-propanol	33	-112	[38]
ciclobutanol	46	-61	[38]

^[a] Los parámetros de activación fueron calculados a partir de la ec. 3.9 y la Figura 3.5.

El análisis de los parámetros de activación para una serie de reacciones de Cr^{IV} con sustratos homólogos, que se diferencian en la identidad de algún grupo funcional, permite determinar si entre ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger existe una relación lineal también llamada *relación isocinética*. La existencia de una *relación*

isocinética, permite postular un mecanismo de reacción común para el conjunto de reacciones estudiadas. Cuando se presenta una desviación de la linealidad, existe una alta probabilidad de que el mecanismo sea diferente al de las demás reacciones consideradas [111]. Lefner [114] fue uno de los primeros autores en mencionar que esta “relación isocinética” indica la existencia de un mecanismo común para las reacciones que la presentan. El criterio desarrollado por este investigador es importante y en la actualidad se continúa utilizando [38,39,111,113,115].

Matemáticamente, la relación isocinética queda expresada en la ec. 3.10:

$$\Delta H^{\#} = \Delta H_0^{\#} + \beta \Delta S^{\#} \quad (3.10)$$

siendo $\Delta H_0^{\#}$ la *ordenada al origen, carente de sentido físico*, y β la *pendiente* de la *recta* determinada por la *representación* gráfica de $\Delta H^{\#}$ en función de $\Delta S^{\#}$. El valor de β se conoce como *temperatura isocinética*, expresada en grados Kelvin (K). *A esta temperatura las reacciones transcurren a la misma velocidad*. En la mayoría de los casos descritos en la bibliografía, el valor de β está alejado del rango de temperaturas estudiadas [38,39,111,113,115] y es mayor que la temperatura media experimental.

La Figura 3.6 muestra la relación entre $\Delta H^{\#}$ y $\Delta S^{\#}$ para la reacción del Cr^{IV} con los sustratos D-glucopiranososa y D-galactopiranososa. En la misma figura se

han incluido los parámetros de activación para la reacción entre Cr^{IV} y diferentes sustratos como alcoholes primarios, secundarios, 1,2-ciclohexanodiolos y fenol (Tabla 3.2). Excepto para reacción Cr^{IV}/fenol, los parámetros de activación del resto de las reacciones muestran una relación lineal ($r^2 = 0,973$).

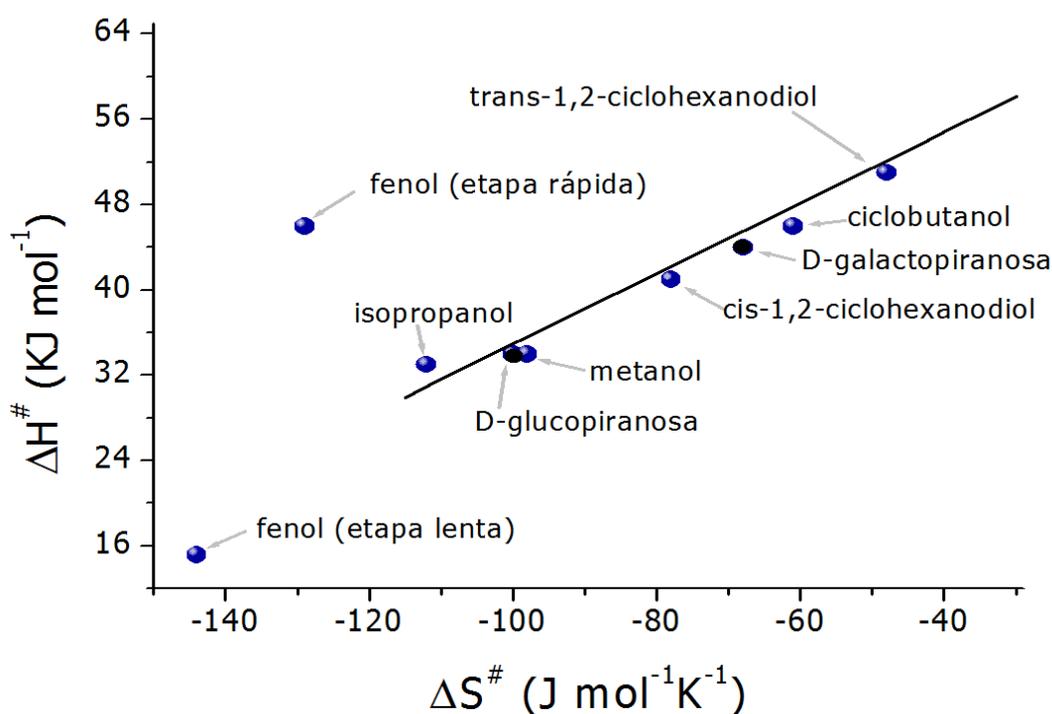


Figura 3.6. Gráfico de ΔH^\ddagger vs ΔS^\ddagger para la reacción de alcoholes primarios, secundarios, 1,2-ciclohexanodiolos y sacáridos con Cr^{IV}. Los datos fueron ajustados con la ec. 3.10.

El valor de β obtenido a partir de la pendiente de la Figura 3.6 se correspondió con un valor = 340 ± 40 K ($63 \pm 6^\circ\text{C}$), y resultó superior a las temperaturas experimentales estudiadas (10 - 30°C).

Es importante destacar que los gráficos lineales de ΔH^\ddagger vs ΔS^\ddagger pueden ser el resultado de errores experimentales cometidos al azar en su determinación [116]. Por ello, para decidir si *la relación isocinética encontrada es real*, y por lo tanto se corresponde con una *serie de reacciones con un mecanismo común*, es conveniente utilizar la ecuación de Arrhenius (ec. 3.7) y realizar la representación de $\ln k$ vs T^{-1} , su forma logarítmica, ec. 3.11. *La obtención de una correlación lineal permite concluir sobre la existencia de una genuina "serie de reacciones" con un mecanismo común.*

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (3.11)$$

Como se puede apreciar en la Figura 3.7, la aplicación de esta forma de representación, $\ln(k_4)$ vs T^{-1} , al estudio de las reacciones Cr^{IV}/D-glucopiranososa y Cr^{IV}/D-galactopiranososa da lugar a dos rectas ($r^2 = 0,980$ y $0,996$) que se cortan en un punto. *El punto de intersección de las rectas representa la inversa de la temperatura isocinética (β)*. A partir de este punto se puede calcular la *temperatura isocinética* que resultó tener un valor muy cercano al calculado a partir la pendiente de la gráfica de ΔH^\ddagger vs ΔS^\ddagger de la Figura 3.6, *validando de esta manera la relación isocinética.*

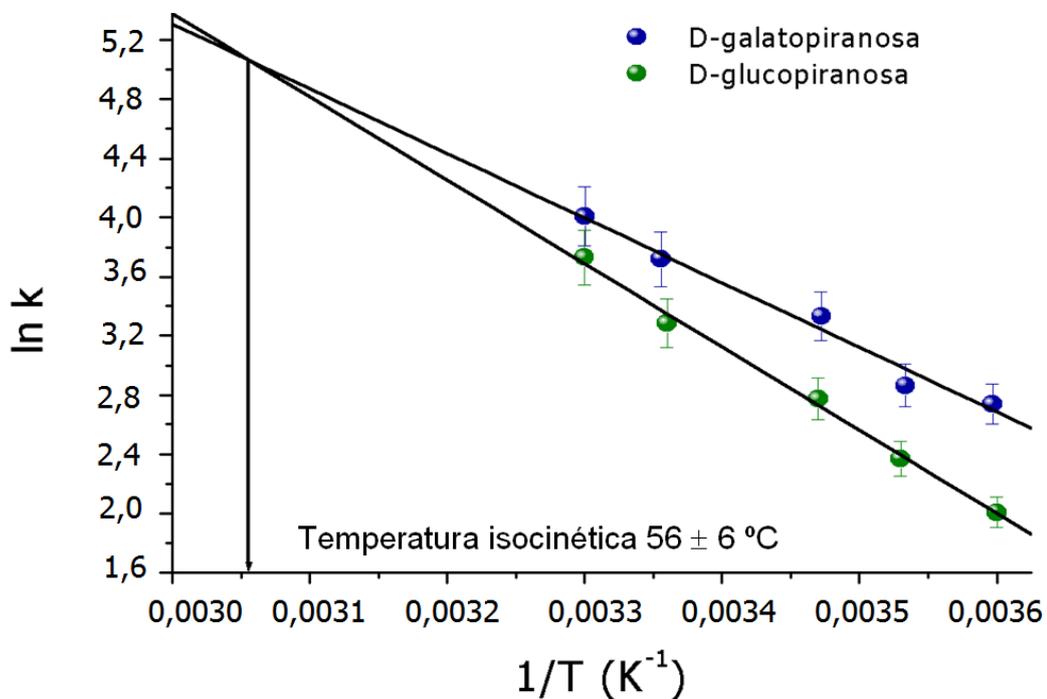
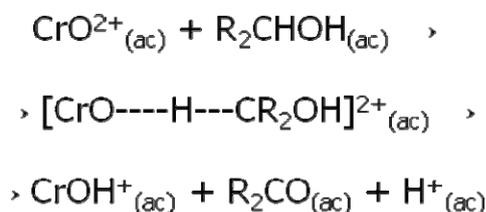


Figura 3.7. Representación del $\ln k_4$ vs T^{-1} para la reacción de Cr^{IV} con la D-glucopiranososa y la D-galactopiranososa.

El mecanismo de oxidación por Cr^{IV} de los alcoholes lineales y cíclicos mencionados previamente, ha sido demostrado por Espenson *et al.* [38,113], como una *transferencia de hidruro* desde el *sacárido* hacia el Cr^{IV} , Esquema 3.2.



Esquema 3.2. Reacciones propuestas para la transferencia de hidruro. $\text{CrO}^{2+} = \text{Cr}^{\text{IV}}$, R_2CHOH = sustrato, R_2CO = sustrato oxidado.

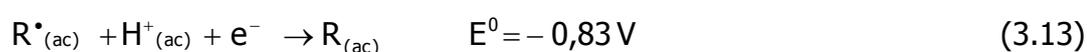
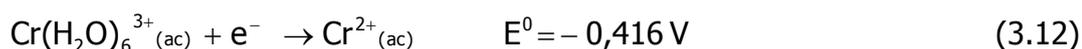
La Figura 3.6 demuestra claramente la existencia de una relación isocinética por ende hace posible postular que la oxidación por Cr^{IV} de alcoholes y de sacáridos comparten el mismo mecanismo de reacción.

La excepción la constituye el fenol, que presenta dos pares de valores de parámetros de activación, uno por cada etapa de la reacción Cr^{IV}/fenol [117], que se desvían de la recta común. Efectivamente, la reacción del Cr^{IV} con el fenol transcurre por un mecanismo totalmente diferente [117].

Por otro lado, la formación de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ es evidencia de la formación de Cr^{II} como producto directo de la reacción del Cr^{IV} con el sustrato orgánico (alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos) [39,64].

En lugar de una *reducción por dos electrones* podríamos pensar que el Cr^{IV} *oxide al sacárido por una vía monoelectrónica* para generar *Cr^{III} y radicales libres orgánicos*. Luego, el *radical libre orgánico*, podría reducir el Cr^{III} a Cr^{II} y éste último formar la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$. La reducción del Cr^{III} a Cr^{II} por el radical es termodinámicamente posible, ec. 3.12 y 3.13 [38], sin embargo no

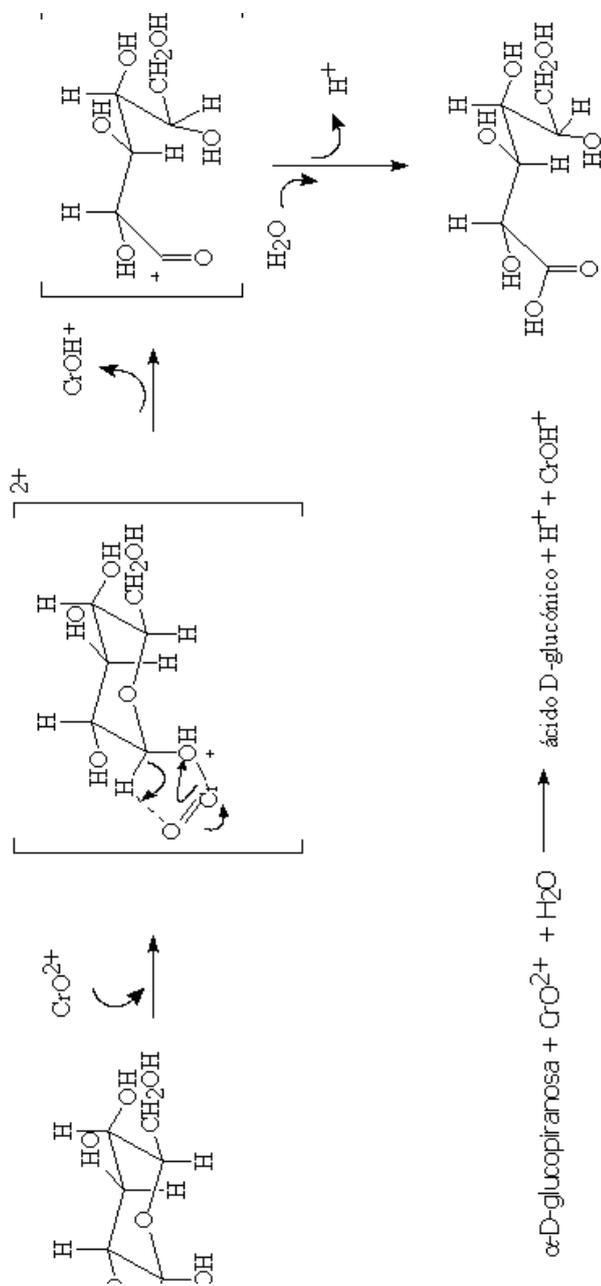
se produce debido a que es muy lenta ($k = 5,6 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [118]. En otras palabras, esta reacción está controlada cinéticamente.



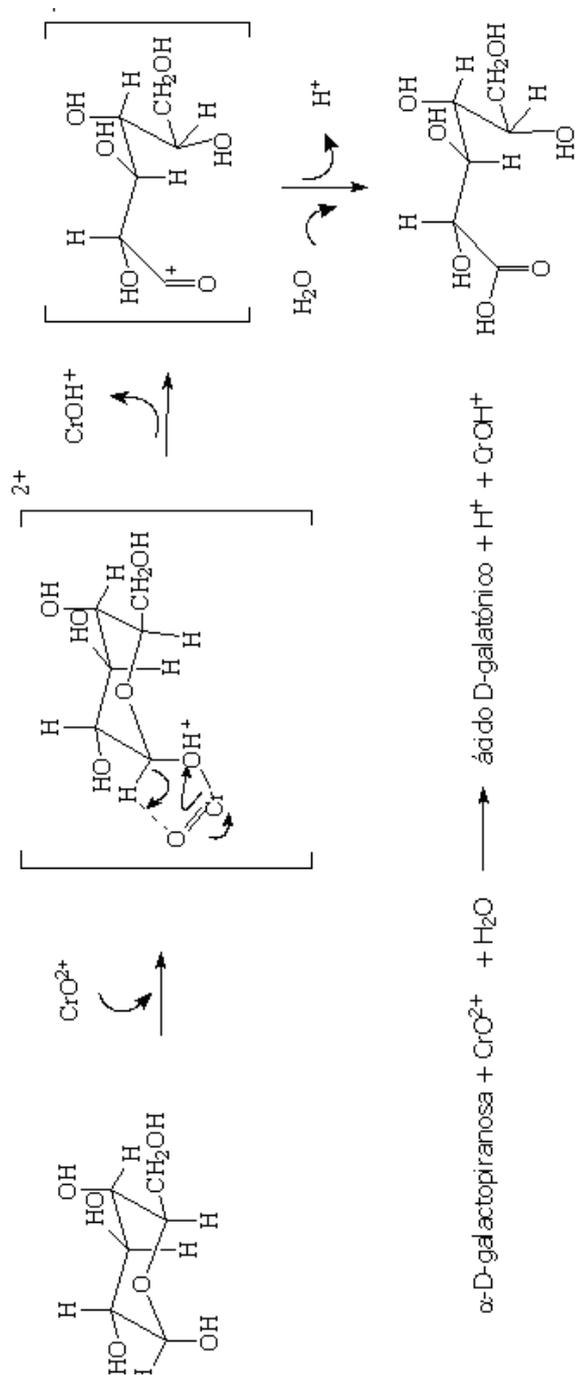
Teniendo en cuenta éste último argumento, se concluye que la única forma de obtener Cr^{II} (y por lo tanto, CrO₂²⁺) en mezclas oxigenadas Cr^{IV}/sacárido es por *reducción de dos electrones* de especies de Cr^{IV}.

Por último, *no se observó efecto isotópico cinético* cuando la reacción Cr^{IV}/D-glucopiranososa se realizó en *agua deutereada* ($k_H/k_D = 1,2$). Considerando el *efecto isotópico* cinético demostrado *con sustratos totalmente deuterados* [38,64,113], sumado a la *ausencia de efecto isotópico* cuando se trabaja en agua deutereada, se propone que la oxidación de los *sustratos* D-glucopiranososa y D-galactopiranososa, ocurre por un *mecanismo concertado de reducción bieletrónica del Cr^{IV} a Cr^I por transferencia de hidruros del sustrato* [113]. Este mecanismo se caracteriza por un *valor positivo de ΔH^\ddagger* y un *valor muy negativo de ΔS^\ddagger* . *El valor negativo de este último parámetro de activación es atribuido al estricto requerimiento de orientación de la transferencia de hidruro*. Se postula que esta transferencia tiene lugar a

través de un estado de transición cíclico muy ordenado similar al propuesto para la oxidación de alcoholes por Cr^{IV} [111]. Los Esquemas 3.3 y 3.4 muestran, el mecanismo de reacción propuesto para oxidación de los sustratos α -D-glucopiranososa y α -D-galactopiranososa por Cr^{IV}.



Esquema 3.3. Mecanismo propuesto para la reacción de oxidación Cr^{IV}/α-D-glucopiranososa.



Esquema 3.4. Mecanismo propuesto para la reacción de oxidación Cr^{IV}/α-D-galactopiranososa

Como se indicó previamente, la velocidad de oxidación de las aldopiranosas por Cr^{IV} resultó ser independiente de la [H⁺]. En particular, en los casos de las reacciones Cr^{IV}/D-glucopiranososa y Cr^{IV}/D-galactopiranososa, la ley de velocidad experimental resultó válida hasta pH 2,0. Este valor de pH puede ser encontrado en compartimientos subcelulares como los fagosomas [12,19,23], lo cuál hace factible la oxidación de sustratos biológicamente importantes como la D-glucopiranososa y D-galactopiranososa, por la especie hipervalente Cr^{IV} generado intracelularmente por reducción de Cr^{VI}.

Finalmente, es importante destacar que si bien la formación del intermediario de Cr^{IV} en la reacción redox con Cr^{VI} ha sido previamente observada para la oxidación crómica de sustratos orgánicos [44]; solo en *unos pocos casos se determinó la constante de velocidad de la reacción redox Cr^{IV}/sustrato* [60,91,95,96]. *Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el Cr^{IV} es una especie más reactiva, que las especies Cr^{VI} o Cr^V con los sustratos orgánicos empleados en este estudio. De hecho, la velocidad con la que el Cr^{IV} oxida a los sacáridos estudiados es al menos uno o dos órdenes de magnitud mayor que velocidad de oxidación Cr^V/sacárido o Cr^{VI}/sacárido.*

3.4. Oxidación de sacáridos ácidos por Cr^{IV}

Como se demostró en trabajos previos [62,96], los sustratos ácidos como el ácido D-galacturónico y el ácido D-glucurónico, poseen un comportamiento completamente diferente cuando reaccionan con Cr^{IV}. La ley de velocidad experimental para la reacción Cr^{IV}/sacárido obtenida para estos sustratos muestra una fuerte inhibición del proceso redox al aumentar la [H⁺]. Los resultados experimentales para el ácido D-glucónico muestran el mismo comportamiento, como puede observarse en la Figura 3.8.

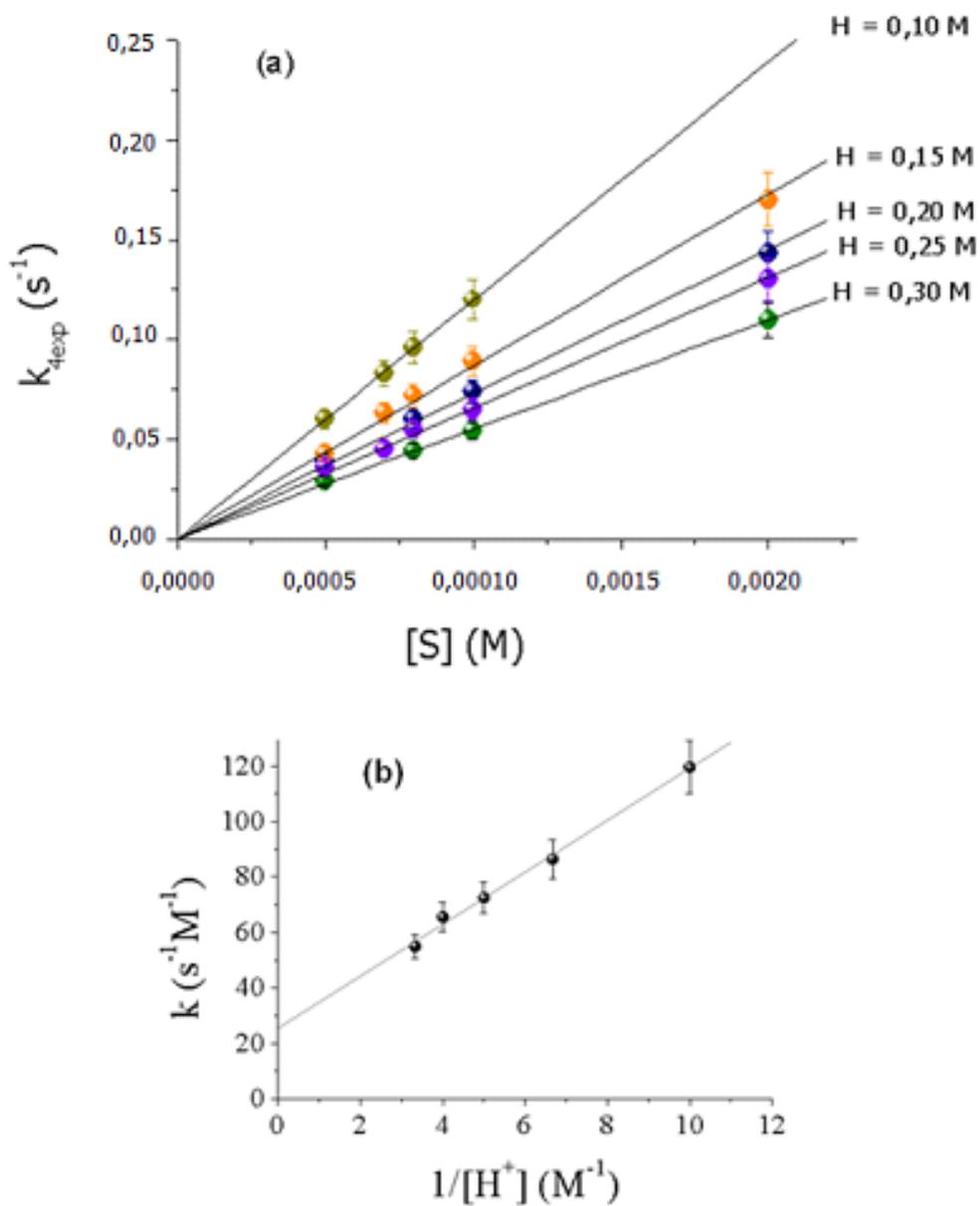


Figura 3.8. (a) Efecto de la [ácido D-glucónico] sobre $k_{4\text{exp}}$; (b) dependencia de $k_{4\text{H}}$ con la $[\text{H}^+]$. Condiciones: $[\text{Cr}^{\text{IV}}] \sim 0,07 \text{ mM}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] =$ (a) 0,10 M, (b) 0,15 M, (c) 0,20 M, (d) 0,25 M y (e) 0,30 M.

Al representar los valores de $k_{4\text{exp}}$ vs [ácido D-glucónico] se obtiene una familia de rectas sin ordenada al origen cuyas pendientes disminuyen con el aumento de la $[\text{H}^+]$, ec. 3.14. A partir de las pendientes de esta familia de rectas se pudieron determinar los valores de $k_{4\text{H}}$.

$$k_{4\text{exp}} = k_{4\text{H}} [\text{ácidoD} - \text{glucónico}] \quad (3.14)$$

La constante $k_{4\text{H}}$, varía linealmente con la $[\text{H}^+]^{-1}$ con una ordena al origen k_a y una pendiente k_b , ec. 3.15 e inserto de la Figura 3.8.

$$k_{4\text{H}} = k_a + k_b [\text{H}^+]^{-1} \quad (3.15)$$

Siendo los valores para k_a y k_b :

$$k_a = (25,5 \pm 2,4) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_b = (9,4 \pm 0,4) \text{ s}^{-1}$$

La constante de velocidad para la desaparición de Cr^{IV} está dada por la ec. 3.16:

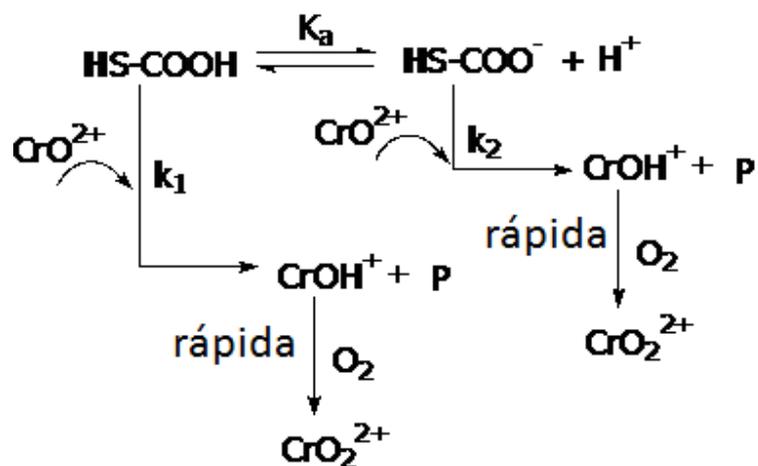
$$k_4 = (k_a + k_b [\text{H}^+]^{-1}) [\text{ácido D} - \text{glucónico}] \quad (3.16)$$

Reemplazando 3.15 en la ec. 3.14, se obtiene la ec. 3.17, la cual representa la *ley de velocidad experimental* para la oxidación del ácido D-glucónico.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = (k_a + k_b [\text{H}^+]^{-1}) [\text{ácido D-glucónico}] [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (3.17)$$

Su forma y dependencia con la [H⁺] es similar a la obtenida para la reacción de otros sustratos ácidos con Cr^{IV} [38,62].

El Esquema 3.5 muestra la secuencia de reacciones del posible mecanismo por el cual ocurre la oxidación del ácido D-glucónico por Cr^{IV}. Debido al equilibrio entre el ácido D-glucónico (HS-COOH) y su base conjugada (HS-COO⁻) existen dos especies capaces de reaccionar con el Cr^{IV} en dos etapas en paralelo, para dar Cr^{II} y producto orgánico oxidado (P).



Esquema 3.5. Mecanismo propuesto para la reacción de Cr^{IV} con ácido D-glucónico.

En este esquema, k_1 y k_2 representan las constantes de velocidad para la oxidación del ácido D-glucónico (HS-COOH) y su base conjugada (HS-COO⁻), respectivamente. Teniendo en cuenta las dos etapas lentas paralelas llegamos a la ec. 3.18:

$$k_4 = k_1 [\text{HS} - \text{COOH}] + k_2 [\text{HS} - \text{COO}^-] \quad (3.18)$$

Para obtener k_4 , se debe tener en cuenta la expresión de la constante de equilibrio, K_a , ec. 3.19,

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HS} - \text{COO}^-]}{[\text{HS} - \text{COOH}]} \quad (3.19)$$

Considerando que en todo momento, la concentración total de sustrato se puede expresar según la ec. 3.20:

$$[\text{HS} - \text{COOH}]_{\text{T}} = [\text{HS} - \text{COOH}] + [\text{HS} - \text{COO}^{-}] \quad (3.20)$$

y realizando los correspondientes arreglos matemáticos, la ec. 3.14 se transforma en la ec. 3.21:

$$k_4 = \left[\frac{[\text{H}^+]k_1 + k_2 K_a}{[\text{H}^+] + K_a} \right] [\text{HS} - \text{COOH}] \quad (3.21)$$

y dado que $[\text{H}^+] \gg K_a$ [191], la ec. 3.21 se convierte en la ec. 3.22:

$$k_4 = \left(k_1 + k_2 K_a [\text{H}^+]^{-1} \right) [\text{HS} - \text{COOH}] \quad (3.22)$$

y por lo tanto,

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \frac{d[\text{CrO}_2^{2+}]}{dt} = \left(k_1 + k_2 K_a [\text{H}^+]^{-1} \right) [\text{HS} - \text{COOH}]_{\text{T}} [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (3.23)$$

La ec. 3.23 obtenida a partir del mecanismo propuesto está en total acuerdo con la ley de velocidad experimental, ec. 3.17, donde:

$$k_1 = k_a = 25,5 (\pm 2,4) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

y

$$k_2 K_a = k_b = 9,4 (\pm 0,4) \text{ s}^{-1}$$

Finalmente, y teniendo en cuenta:

- a) Lo expuesto previamente para las reacciones de oxidación por Cr^{IV} de los sacáridos D-glucopiranososa y D-galactopiranososa.
- b) Que la reacción redox Cr^{IV}/sacárido produce ácidos aldónicos, por lo cuál se postulara el C1 como el sitio más reactivo de las aldopiranosas estudiadas.
- c) Que los sacáridos neutros estudiados siguen la misma ley de velocidad para la oxidación por Cr^{IV}, ec. 3.6.
- d) Que los sacáridos ácidos estudiados siguen la misma ley de velocidad para la oxidación por Cr^{IV}, ec. 3.23.

Se propone para todos los sacáridos estudiados el mismo mecanismo de oxidación por Cr^{IV} en medio ácido: la *reducción bieletrónica del Cr^{IV} a Cr^{II} por transferencia de hidruros provenientes del sustrato* (Anexo 2).

Capítulo 4

Estudios de caracterización

de Complejos Cr^v -sacáridos

por Resonancia

Paramagnética Electrónica

4.1. Caracterización de especies sacárido-Cr^V por espectroscopia RPE

La resonancia paramagnética electrónica (**RPE**) es una técnica espectroscópica poderosa, versátil y no destructiva, que se ha convertido en una de las herramientas más potentes para la caracterización de complejos de metales de transición paramagnéticos con sacáridos y biomoléculas. Para comprender esta técnica, sus aplicaciones y poder interpretar sus resultados, es necesario introducir primero algunos conceptos básicos sobre sus fundamentos y los distintos factores que puedan afectar y modificar los niveles de energía del electrón y, por ende, de una señal de RPE.

En ausencia de un campo magnético externo el electrón libre no tiene preferencia por ninguno de los estados de espín posibles, y los dos estados son energéticamente equivalentes, Figura 4.1.

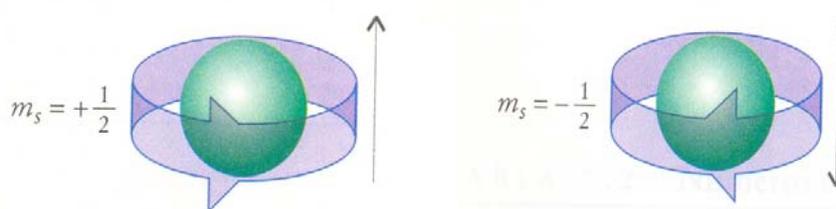


Figura 4.1. Estados de espín posibles para un electrón desapareado.

Cuando una especie paramagnética -especie que posee electrones desapareados- se somete a un campo magnético externo (**H₀**), aparecen

distintos estados energéticos que reflejan el desdoblamiento del espín electrónico, debido a la interacción del campo magnético externo con el momento de espín del electrón desapareado (m_s , cuyo valor puede ser $\pm 1/2$). Esta interacción, llamada *Efecto Zeeman*, se puede representar matemáticamente mediante la ec. 4.1:

$$E = g \mu H_0 \quad (4.1)$$

En esta ecuación, g es la constante giromagnética, que para el electrón libre vale 2,0036; μ es el magnetón de Bohr, cuyo valor es $9,274096 \times 10^{-21}$ erg/gauss y H_0 es el campo magnético externo aplicado, expresado en Gauss.

Cuando el campo magnético externo interacciona con los dos posibles componentes del momento de espín electrónico, genera dos estados cuya diferencia de energía está dada por la ec. 4.2:

$$\Delta E = g \mu H_0 \quad (4.2)$$

El resultado final es la aparición de dos poblaciones, que difieren en su energía. La diferencia de energía entre las poblaciones es proporcional al campo aplicado y divergen linealmente a medida que aumenta la intensidad

del campo magnético externo aplicado. Cuando la muestra paramagnética, colocada bajo un campo magnético externo, es irradiada con una radiación electromagnética, se producirá una absorción de energía al valor del campo magnético (campo resonante) en el cual la diferencia de energía entre los estados de espín, ΔE , coincide con el valor de frecuencia de la radiación electromagnética empleada. O sea que se producirá absorción de energía, cuando se verifique la ec. 4.3, en la que h es la constante de Plank ($6,6261 \times 10^{-27}$ ergios s⁻¹) y ν es la frecuencia de la radiación electromagnética aplicada:

$$\Delta E = h \nu \quad (4.3)$$

Igualando las ec. 4.2 y 4.3, se obtiene la ec. 4.4, y se llega a la denominada *condición de resonancia de RPE*. La *constante giromagnética* puede ser expresada, entonces, mediante la ec. 4.5:

$$h \nu = g \mu H \quad (4.4)$$

$$g = \frac{h \nu}{\mu H_0} \quad (4.5)$$

En la Figura 4.2 se muestra el desdoblamiento de Zeeman para dos niveles de espín electrónico degenerados en un sistema con $S = 1/2$ (momento de espín electrónico), $m_s = \pm 1/2$, al aplicar un campo magnético H_0 .

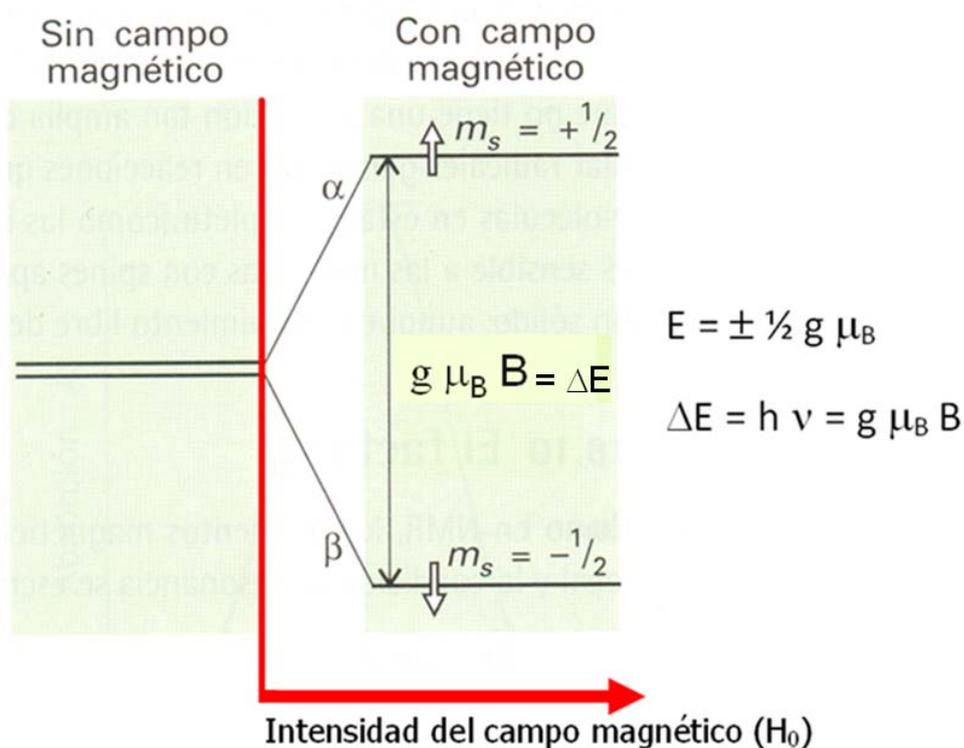


Figura 4.2. Interacción de un campo magnético externo con el momento de espín electrónico (efecto Zeeman).

Existen diferentes radiaciones electromagnéticas (o bandas) de uso habitual para trabajar en RPE. Estas se clasifican en *función* de la *frecuencia* de la *microonda* usada. Una de las *más utilizadas* es la llamada "banda X", con un valor de frecuencia de $\approx 9,5$ GHz, a la que le corresponde un campo resonante de ~ 3300 Gauss, para el electrón libre.

Dado que el valor de campo resonante al que aparece la señal de RPE, depende de la frecuencia fija utilizada, no es un parámetro adecuado para identificar una especie. Sin embargo el factor g es independiente de la frecuencia y por lo tanto resulta mejor para este propósito. De esta manera, conociendo el valor del campo y la frecuencia, se puede calcular el valor de g asociado a la transición de espín para cada especie estudiada. Este parámetro espectroscópico brinda información útil en cuanto al tipo y número de átomos que coordinan al centro metálico: *un electrón desapareado es muy sensible al entorno y puede interactuar con el momento de espín nuclear (I) de los átomos próximos del ligando que posean I distinto de cero*. Clasificamos a estas interacciones en dos tipos:

- a) Los acoplamientos entre el espín electrónico de los electrones del metal y el espín nuclear del propio núcleo metálico originan el desdoblamiento de la señal de RPE. Este tipo de acoplamiento se denomina *hiperfino*.
- b) La interacción entre el espín electrónico y los espines nucleares de los átomos del ligando, se denomina *interacción o acoplamiento superhiperfino* (*shf*).

Ambos acoplamiento producen el desdoblamiento o multiplicidad de la señal de RPE. La *multiplicidad* de la señal generada por acoplamiento con el espín nuclear de un átomo determinado está dada por la ec. 4.6, donde n es el

número de núcleos equivalentes que interactúan con el espín electrónico [120].

$$\text{multiplicidad de señal} = 2nI + 1 \quad (4.6)$$

Las constantes de *acoplamiento hiperfino* y *shf* se simbolizan A_{iso} y a_{iso} respectivamente.

Las señales observadas en RPE pueden ser *isotrópicas* o *anisotrópicas*. Cuando los espines electrónicos en las direcciones x, y, z no pueden ser diferenciadas para una señal paramagnética en particular, lo que se observa es una señal promedio denominada *isotrópica*. Un sistema es *isotrópico* cuando existe un valor de g (denominado g_{iso}). En aquellos sistemas que poseen *momento angular orbital* y *de spin*, el valor de g ya no es el mismo en todas las direcciones y se dice que el sistema es *anisotrópico*. La *anisotropía* surge por el *acoplamiento del momento angular del spin con el momento angular orbital*, denominado *acoplamiento spin-órbita*. El momento angular de espín se orienta con el campo aplicado, mientras que el momento angular orbital (asociado al movimiento de los electrones en orbitales moleculares) se encuentra fijado por la función de onda molecular. La anisotropía también implica que el *acoplamiento hiperfino electrón-núcleo* sea diferente en las distintas direcciones, es decir, que las *constantes de acoplamiento hiperfino* (A) y *shf* (a), serán ahora distintas en cada dirección.

La *anisotropía* es generalmente importante en los *sistemas inorgánicos* con *metales de transición* y con los elementos denominados *tierras raras*. Sin embargo, cuando una molécula anisotrópica se estudia en solución, los efectos anisotrópicos (debidos a la falta de simetría) se promedian por la rápida rotación de las moléculas. De esta manera, los parámetros de RPE obtenidos de moléculas en solución se vuelven isotrópicos.

La especie Cr^V posee un electrón desapareado, como lo refleja su configuración electrónica, [Ar] 3d¹. Por este motivo, la espectroscopia RPE puede aplicarse a los complejos formados entre la especie paramagnética Cr^V y los sacáridos en estudio. Los parámetros espectroscópicos que se pueden obtener por RPE, *g_{iso}*, *A_{iso}* y *a_{iso}*, junto con la multiplicidad de la señal de RPE brindan suficiente información como "*para caracterizar los complejos en solución*". Esta es una ventaja muy importante si tenemos en cuenta que estos complejos oxoCr^V-sacárido son relativamente inestables y muy difíciles de aislar.

En la naturaleza el Cr^V existe como una mezcla isotópica de ⁵²Cr (*I* = 0, abundancia 90,45 %) y ⁵³Cr (*I* = 3/2, abundancia 9,55 %). Por lo tanto, todas las especies de Cr^V generan una señal mayoritaria, correspondiente al ⁵²Cr y 4 señales equidistantes, de menor intensidad, correspondientes al ⁵³Cr. Estas últimas son denominadas *señales satélites*, Figura 4.3 y son el resultado de los acoplamientos hiperfinos antes mencionados.

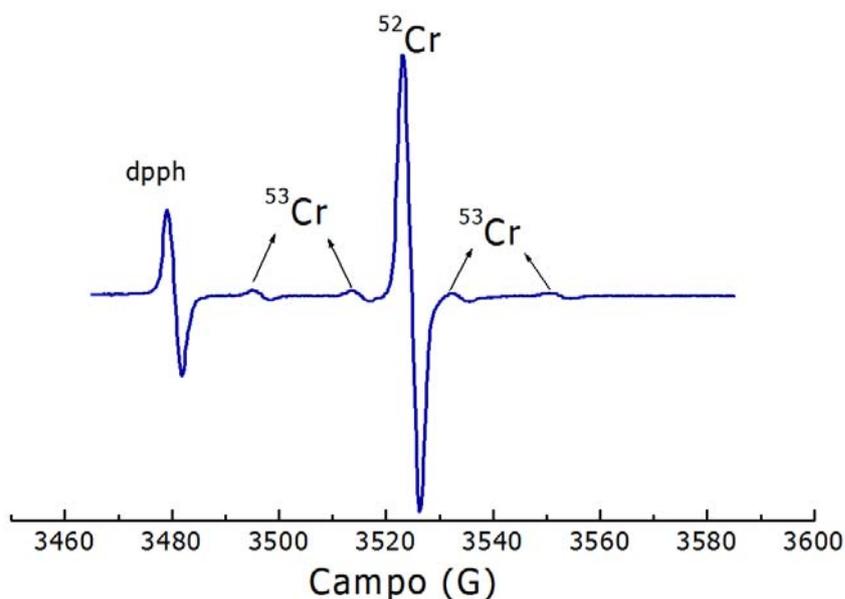


Figura 4.3 Señal principal y señales satélites debidas a los acoplamientos hiperfinos de ⁵²Cr y ⁵³Cr.

En la literatura se han informado muy pocos complejos de Cr^V con ligandos ácidos que han sido completamente caracterizados. Entre ellos se encuentran los complejos oxo-Cr^V con 2-hidroxiácidos como el ehba (Figura 3.1), que *no poseen protones carbinólicos que puedan acoplar con el espín electrónico de la especie Cr^V* [12]. Generalmente, los complejos de Cr^V *presentan simetría axial con acoplamiento espín-órbita nulo*, lo que produce *tiempos de relajación largos y señales de RPE angostas e intensas a temperatura ambiente*.

Los sacáridos en estudio en este trabajo de Tesis Doctoral están formados por C, O e H. De los tres elementos mencionados, solo los núcleos de H

poseen I diferente de cero ($I = 1/2$), por lo tanto los acoplamientos shf son simbolizados como ${}^1\text{H } a_{iso}$.

Los parámetros de RPE, g_{iso} , A_{iso} y ${}^1\text{H}a_{iso}$ junto con los acoplamientos superhiperfinos de protón (shf) han probado ser útiles en la determinación de los *modos de unión de distintos ligandos* al Cr^V [12,53]. Los valores de g_{iso} y ${}^1\text{H } a_{iso}$ de las señales de RPE de los complejos de Cr^V dependen del *número de coordinación* de la especie de Cr^V y de la *naturaleza* de los *grupos donores unidos* al grupo oxo-Cr^V [35]. Existe un *método empírico*, desarrollado por Lay *et al.* [35] que permite *determinar el número de coordinación de complejos de oxo-Cr^V* (penta o hexacoordinados) así como el *tipo de grupos donores unidos al metal a partir de los valores medidos de g_{iso} y A_{iso}* . Este método permite utilizar los valores de los parámetros espectroscópicos de complejos de oxo-Cr^V de estructura conocida para *predecir las estructuras en solución de nuevos complejos de Cr^V, no caracterizados*. Los valores de g_{iso} y A_{iso} se pueden calcular de manera aditiva, como:

$$g_{iso} = \sum g_{iso}(X) / n \quad \text{y} \quad A_{iso} = \sum A_{iso}(X) / n$$

siendo g_{iso} (X) y A_{iso} (X) los valores para el complejo que contiene, 4 ligandos X (n = 4) o 5 ligandos X (n = 5) respectivamente, además del ligando oxo.

En la Tabla 4.1 se detallan los valores de g_{iso} y A_{iso} calculados teniendo en cuenta todas las combinaciones posibles para mono y bisquelatos de oxo-Cr^V penta y hexacoordinados, con ligandos polihidroxicarboxílicos.

Tabla 4.1. Valores de g_{iso} y de A_{iso} calculados para especies oxo-Cr^V

Monoquelatos pentacoordinados	g_{iso}	A_{iso}	Bisquelatos pentacoordinados	g_{iso}	A_{iso}
$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_2(\text{OH}_2)_2]^+$	1,9766	16,6	$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_4]^-$	1,9800	16,5
$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RCO}_2)(\text{RO})(\text{OH}_2)_2]^+$	1,9758	16,6	$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_3(\text{RCO}_2)]^-$	1,9791	16,6
			$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_2(\text{RCO}_2)_2]^-$	1,9783	16,7
Monoquelatos hexacoordinados	g_{iso}	A_{iso}	Bisquelatos hexacoordinados	g_{iso}	A_{iso}
$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_2(\text{OH}_2)_3]^+$	1,9724	19,6	$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_5]^{2-}$	1,9759	18,4
$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RCO}_2)(\text{RO})(\text{OH}_2)_3]^+$	1,9715	19,9	$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_4(\text{OH}_2)]^-$	1,9747	20,0
			$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_3(\text{RCO}_2)(\text{OH}_2)]^-$	1,9738	19,1
			$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_2(\text{RCO}_2)_2(\text{OH}_2)]^-$	1,9730	19,5
			$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_4(\text{RCO}_2)]^{2-}$	1,9750	18,7
			$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_3(\text{RCO}_2)_2]^{2-}$	1,9741	19,1
			$[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{RO})_2(\text{RCO}_2)_3]^{2-}$	1,9733	19,4

* valores de A_{iso} x 10^4 cm⁻¹

Los valores de la Tabla 4.1 indican que al aumentar el número de coordinación, g_{iso} disminuye mientras que A_{iso} aumenta. Para un dado número de coordinación, al pasar de estructuras monoquelatos a bisquelatos puede observarse que el valor de g_{iso} aumenta mientras que A_{iso} se mantiene en el mismo valor.

En particular, los parámetros g_{iso} y A_{iso} , junto con el acoplamiento shf de la señal producido por los H del ligando permiten distinguir entre unión a diolatos cíclicos y lineales. También es posible deducir si las especies Cr^V-sacáridos corresponden a complejos en donde el *centro metálico* forme parte de *anillos quelantes* de **5** o **6** miembros.

De esta manera, dado que los valores de g_{iso} y $^1H a_{iso}$ de las señales de RPE de los complejos de Cr^V dependen del número de coordinación del Cr^V y de la naturaleza de los grupos donores unidos al oxo-Cr^V [35], es posible deducir el número de moléculas de ligando coordinadas al centro metálico como así también los átomos del ligando involucrados en la coordinación.

Una importante área recientemente desarrollada en RPE, es la *Resonancia Paramagnética Electrónica de pulso (RPE de pulso)*. En esta variante metodológica de la espectroscopia RPE, los espines electrónicos son excitados por una serie de pulsos de microondas, y la señal inducida por estos pulsos se mide luego en ausencia de microondas. En los experimentos clásicos de

RPE en banda continua, se mide la absorción de radiación de microonda constante a medida que el campo magnético externo se varía en intensidad. El espectro obtenido refleja el desdoblamiento entre los niveles de energía del espín electrónico. En los experimentos de RPE de pulso, se mide la señal emitida por el sistema de espín electrónico luego de una serie de uno o más pulsos de microondas. La señal resultante contiene información espectral y también de relajación del espín electrónico [121].

Basada en el concepto de pulso, se desarrolló la *Doble Resonancia Electrónica Nuclear*, o **ENDOR** (**E**lectron **N**uclear **D**ouble **R**esonance), introducida por Feher en 1956 [122].

La técnica ENDOR consiste básicamente en *la eliminación de la saturación de una transición electrónica en un sistema con estructura hiperfina por resonancia nuclear*. De esta forma, se combinan la *sensibilidad* de la Resonancia Paramagnética Electrónica y la *resolución* de la Resonancia Magnética Nuclear [125]. En otras palabras, *se miden las frecuencias de resonancia magnética de los núcleos interactuando con el espín electrónico, al excitar los espines electrónicos con un campo de microondas y los núcleos con radiofrecuencias (rf)*. Cuando se aplica en RPE de onda continua, la *intensidad de los espectros obtenidos depende del balance entre los tiempos de relajación del electrón y el núcleo*. En **RPE** de pulso, los tiempos de relajación no son críticos, pero las *formas de los espectros dependen de los*

tiempos de pulso aplicado. La espectroscopia **RPE - ENDOR** de pulso, permite el *estudio de sistemas con tiempos cortos de relajación*. Existen dos modos básicos de ENDOR: Mims ENDOR, desarrollada inicialmente por Bill Mims en 1965 [124], y Davies ENDOR, desarrollada por E. R. Davies en 1974 [72]. Ambos enfoques emplean uno o más pulsos de microondas para preparar un estado de espín no equilibrado, y uno o más pulsos para detectarlo posteriormente. Entre los períodos de preparación y detección, hay un período de evolución en el cuál, se aplica el pulso de **rf**. Cuando el valor de la rf coincide con la frecuencia **ENDOR** de un núcleo, su espín se invierte, cambiando la frecuencia del espín electrónico (vía el acoplamiento hiperfino) resultando en un cambio en la señal de RPE detectada [121].

4.2. Detección y caracterización de especies de oxo-Cr^V-sacárido

4.2.1. Detección de especies de oxo-Cr^V-GHL

La presencia de complejos oxo-Cr^V-GHL pudo ser identificada con gran sensibilidad, por espectroscopia de RPE. Se obtuvieron espectros en banda X continua con *señales isotrópicas angostas e intensas a temperatura ambiente*. Con una modulación de amplitud de 0,4 G, las mezclas de reacción Cr^{VI}/GHL a pH ≤ 4 presentaron en su espectro (a temperatura ambiente), *señales isotrópicas angostas*. El espectro consistió en:

a) una *señal mayoritaria*, correspondiente al ⁵²Cr (90,2 %), centrada en g_{iso} = 1,9802 y flanqueada por un débil cuarteto debido al isótopo ⁵³Cr, A_{iso} = $(16,6 \pm 0,01) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

b) por una señal minoritaria (9,8 %), con g_{iso1} = 1,9766 y g_{iso2} = 1,9779, Figura 4.4.

Ambas señales se componen de más de una especie, como se ilustra en el inserto de la Figura 4.4. Los cambios en la [**GHL**] no afectaron la resolución espectral. La [Cr^{VI}] usada en los experimentos de RPE fue baja, para evitar los fenómenos de relajación los cuales podrían producir un ensanchamiento del espectro y pérdida de resolución del mismo. La intensidad de la señal de RPE y el período de tiempo en el cuál las especies Cr^V pudieron ser observadas, dependieron de la [H⁺].

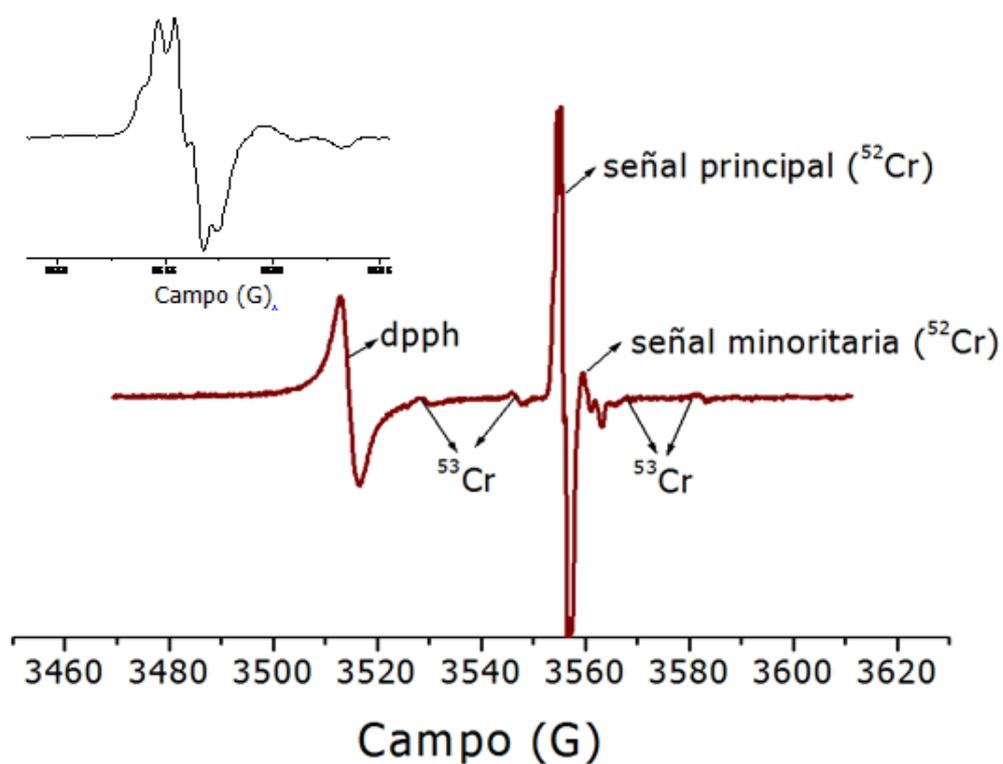


Figura 4.4. Espectro experimental de RPE en banda X de las especies oxo-Cr^V-GHL. Condiciones: [GHL] = 0,3 M, pH = 1,0, [Cr^{VI}] = 0,6 mM, T = 20,0 °C, I = 1,0 M, F = 9,855995 GHz, modulación de amplitud = 0,4 G, ancho de barrido = 180,0 G.

A temperatura ambiente y en el rango de valor de pH 1,0 – 4,0, la reacción del Cr^{VI} con **GSH** (relación 1:1) en presencia de un exceso molar de 500 veces de **GHL**, produjo un espectro de RPE de especies de oxo-Cr^V- **GHL** *idéntico al obtenido por reacción directa del Cr^{VI} con la GHL*. El hecho de que el espectro de RPE se componga de las mismas especies cuando se usan mezclas Cr^{VI}/**GHL** o cuando se adiciona GHL a una *mezcla equimolar Cr^{VI}/**GSH***, *elimina la posibilidad de que cualquiera de las especies se forme por coordinación de la especie Cr^V con el producto de oxidación orgánico*.

Cuando se utilizó un gran exceso de **GHL** respecto del Cr^{VI} ($\geq 500:1$), ya sea en condiciones fuertemente acidas (HClO₄ 0,4 M) o en el rango de pH 1,0 – 4,0, el espectro de RPE estaba compuesto de dos tripletes a $g_{iso1} = 1,9802$ y $g_{iso2} = 1,9803$, y de dos señales menores a $g_{iso3} = 1,9766$ y $g_{iso4} = 1,9779$. Otras especies minoritarias estaban presentes, pero no se incluyeron en la simulación, para evitar la sobre parametrización. La Figura 4.5 muestra los espectros experimentales y simulados, mientras que la Tabla 4.2 enumera los parámetros espectroscópicos de RPE de estas especies oxo-Cr^V.

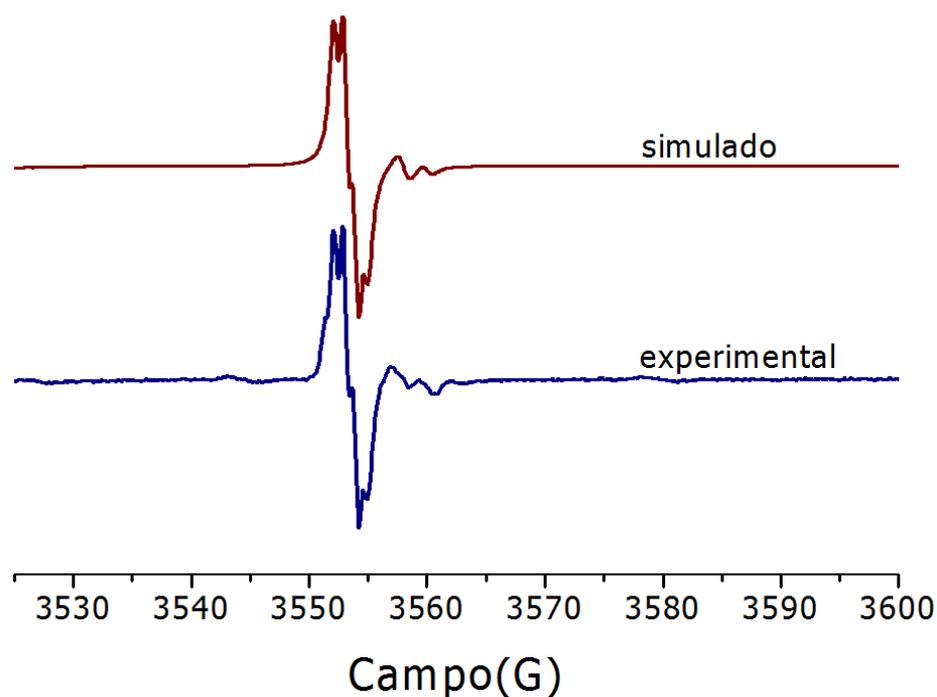


Figura 4.5. Espectros simulado y experimental de RPE en banda X, mostrando las especies oxo-Cr^V-GHL. Condiciones: [Cr^{VI}] = [GSH] = $4,8 \times 10^{-4}$ M, [GHL] = 0,3 M, pH = 1,0, modulación de amplitud = 0,4 G, I = 1,0 M, T = 20,0 °C, resolución = 2048 puntos.

La presencia de las *señales débiles (satélites)* debidas al acoplamiento hiperfino del ⁵³Cr con un valor de $A_{iso} = (16,6 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ junto al los valores de g_{iso} confirma que la *señal mayoritaria es el resultado de la presencia de especies bisquelatos oxo-Cr^V penta coordinados*, Tabla 4.1

Tabla 4.2. Propiedades espectroscópicas de RPE en banda X
continua, de las especies oxo-Cr^V-GHL.

pH	g_{iso}	Multiplicidad	$^1\text{H } a_{iso}$ (10^{-4} cm^{-1})	Ancho de línea (10^{-4} cm^{-1})	%
≤ 4	1,9802	t	0,87	0,49	47,9
	1,9803	t	0,82	0,40	42,3
	1,9766	NR	-	0,90	7,4
	1,9779	NR	-	0,78	2,4

Condiciones experimentales: $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = [\text{GSH}] = 4,8 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{GHL}] = 1,0 \text{ M}$, pH = 1,0, modulación de amplitud = 0,4 G, I = 1,0 M, T = 20,0 °C, resolución = 2048 puntos. Los espectros isotrópicos fueron simulados usando el programa pest WinSim. t = triplete; NR = no resuelto

Se ha determinado previamente, que los quelatos de Cr^V de cinco miembros están favorecidos respecto de los de seis miembros [35]. Por esta razón, cualquiera de los grupos *vic*-diolato del ligando **GHL** resultan sitios potenciales de coordinación para formar especies de Cr^V de cinco miembros. Los dos componentes de la señal de RPE observados a $g_{iso1} = 1,9802$ y $g_{iso2} = 1,9803$ corresponden a los calculados para complejos oxo-Cr^V bisquelatos pentacoordinados, con cuatro grupos alcoholato donores, Tabla 4.1. Los

desdoblamientos *shf* encontrados para los dos componentes de las señales de RPE, se encuentran en concordancia con los esperados para especies oxo-Cr^V-diolato₂ con dos protones carbinólicos acoplados al spin electrónico del Cr^V. De esta forma, la **GHL** actúa como una *molécula bidentada* uniéndose al oxo-Cr^V para dar dos isómeros geométricos, $g_{iso1} = 1,9802$ y $g_{iso2} = 1,9803$, $[\text{Cr}^{\text{V}}(\text{O})(\text{O}^1, \text{O}^{\text{ring}}\text{-GHL})_2]^-$ ($g_{\text{calc}} = 1,9800$), **I** y **II** en la Figura 4.6. Las dos señales con estructura *shf* a $g_{iso3} = 1,9766$ y $g_{iso4} = 1,9780$ no resuelta fueron atribuidas a especies monoquelato oxo-Cr^V pentacoordinadas, $[\text{Cr}(\text{O})(\text{O}^1, \text{O}^{\text{ring}}\text{-GHL})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ ($g_{\text{predicho}} = 1,9767$) y $[\text{Cr}(\text{O})(\text{O}^1\text{-GHL})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($g_{\text{predicho}} = 1,9783$) respectivamente, **III** y **IV** en la Figura 4.6.

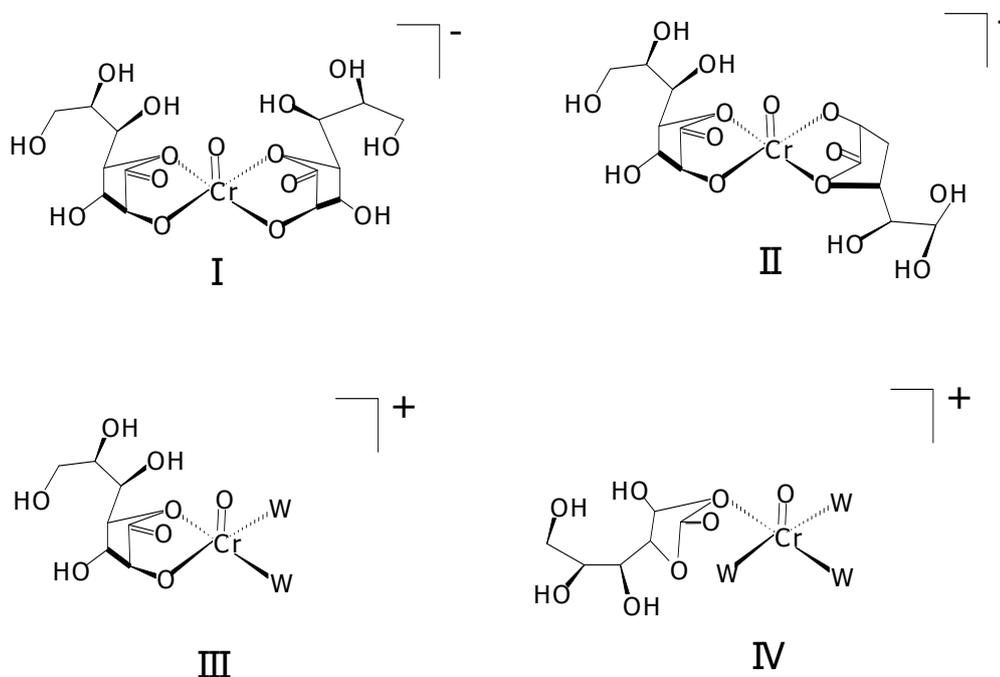


Figura 4.6. Estructuras propuestas para las especies oxo-Cr^V-GHL a pH 1,0. w = H₂O

En las reacciones Cr^{VI}/**GHL** a pH (1 – 4), el producto final del cromo es la especie Cr^{III}. La señal de la especie Cr^{III}_(ac) a temperatura ambiente presenta un valor centrado de $g \sim 2,00$. Se puede apreciar que la señal es ancha, Figura 4.7.

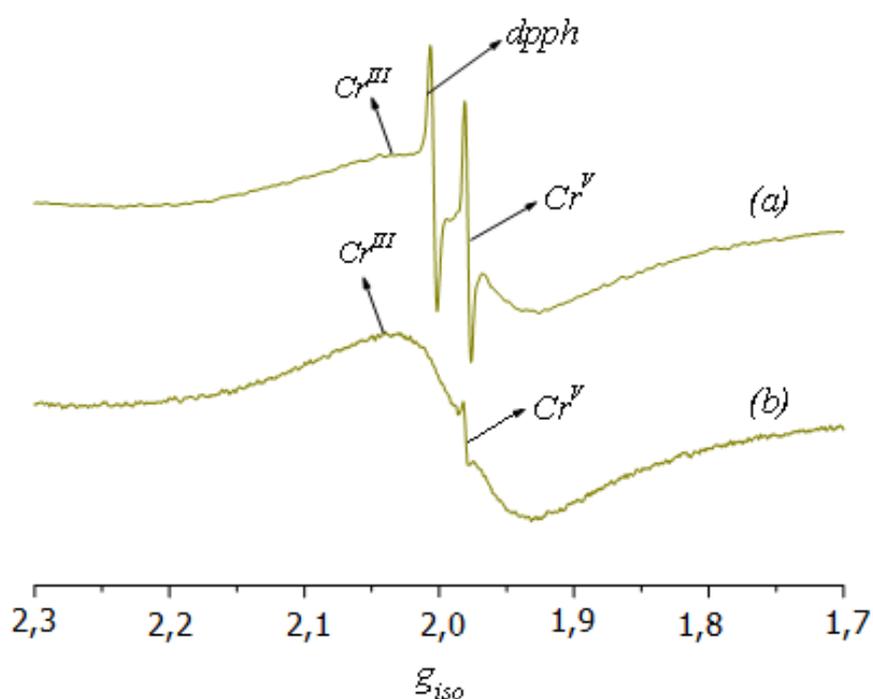


Figura 4.7. Espectros experimentales de RPE en banda X, mostrando las especies oxo-Cr^V-GHL y la formación de Cr^{III}. Condiciones: [Cr^{VI}] = [GSH] = $4,8 \times 10^{-4}$ M, [GHL] = 0,3 M, pH = 1,0, I = 1,0 M, T = 20,0 °C, modulación de amplitud = 1,0 G, resolución = 2048 puntos. a) 5 minutos de iniciada la reacción, b) 30 minutos de iniciada la reacción.

4.2.2. Detección y caracterización de especies oxo-Cr^V-Galur

La mayor parte de la información de la literatura sobre la caracterización de complejos Cr^V-sacárido mediante RPE se basa en la interpretación de experimentos de RPE de onda continua a temperatura ambiente [12]. Si bien

se puede obtener información relevante de la espectroscopia RPE en onda continua, existe cierto riesgo de hacer sobre interpretaciones espectrales. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación [55], los espectros de RPE de onda continua en banda X, a temperatura ambiente, obtenidos a partir de mezclas Cr^{VI}/**Galur** a bajo pH fueron interpretados en términos de la contribución de tres especies:

- (a) los conformeros cis y trans de la especie $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^6, \text{O}^5\text{-galactofuranuronato})_2]^-$ (**especies V y VI**, respectivamente, Figura 4.8)
- (b) la especie $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^{\text{ring}}, \text{O}^6\text{-galactopirauronato})(\text{O}^5, \text{O}^6\text{-galactofuranuronato})]$ (**especie VII**, Figura 4.8).

Las especies oxo-Cr^V fueron siempre las mismas, independientemente de la $[\text{H}^+]$ y de la relación metal-ligando [55]. En presencia de exceso de Galur, a temperatura ambiente y en el rango de pH = 1,0 – 5,0; las mezclas Cr^{VI}/**GSH** (relación 1:1) produjeron espectros de RPE de complejos oxo-Cr^V idénticos a los obtenidos por reacción directa de Cr^{VI} con **Galur**.

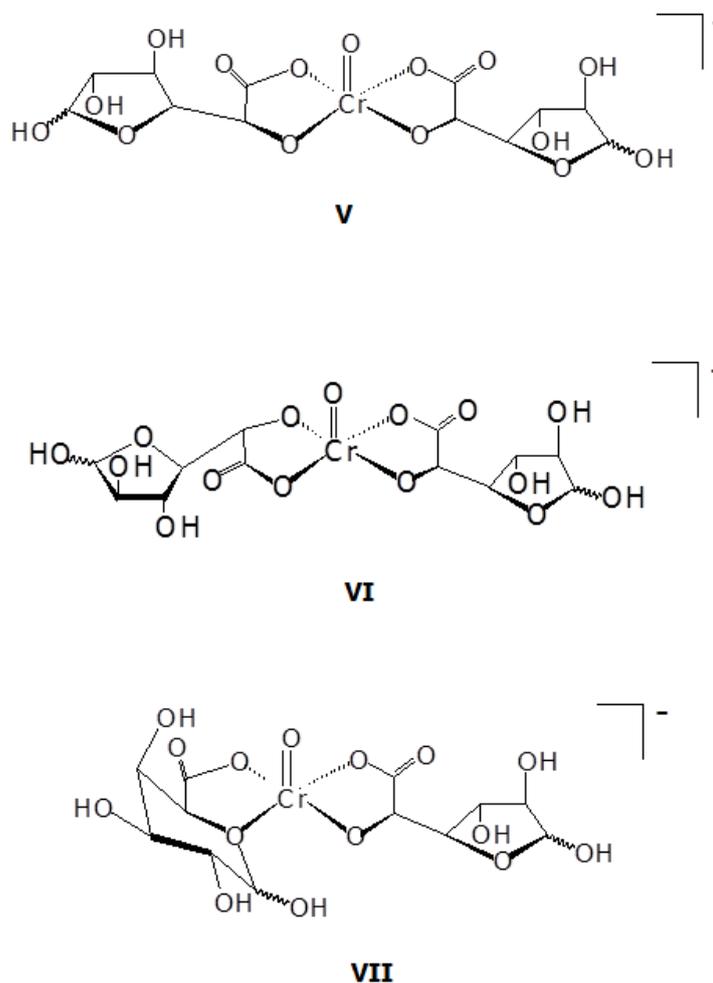


Figura 4.8. Estructuras propuestas inicialmente, para los complejos oxo-Cr^V-Galur.

Esta interpretación se basó en datos experimentales en banda X continua, específicamente los valores isotrópicos hiperfinos de protón y los valores de g_{iso} extraídos de los espectros de RPE a temperatura ambiente que fueron comparados con los datos de RPE informados para otros complejos oxo-Cr^V [12]. Con la finalidad de confirmarsuposiciones previas, se realizaron nuevos

experimentos. No se observaron mayores cambios espectrales cuando se compararon los espectros de RPE de onda continua a temperatura ambiente de mezclas Cr^{VI}/**Galur** a pH = 3,0 en H₂O y en ²H₂O, Figura 4.9, indicando que el *desdoblamiento hiperfino de protón resuelto en el espectro de RPE de onda continua a temperatura ambiente "no corresponde a protones intercambiables"*. Esto *excluye la coordinación ecuatorial de moléculas de agua en el complejo oxo-Cr^V; lo cual podría llevar a una considerable contribución hiperfina de protones intercambiables. Esto significa que están presentes estructuras "bisquelatos" oxo-Cr^V, más que "monoquelatos"*.

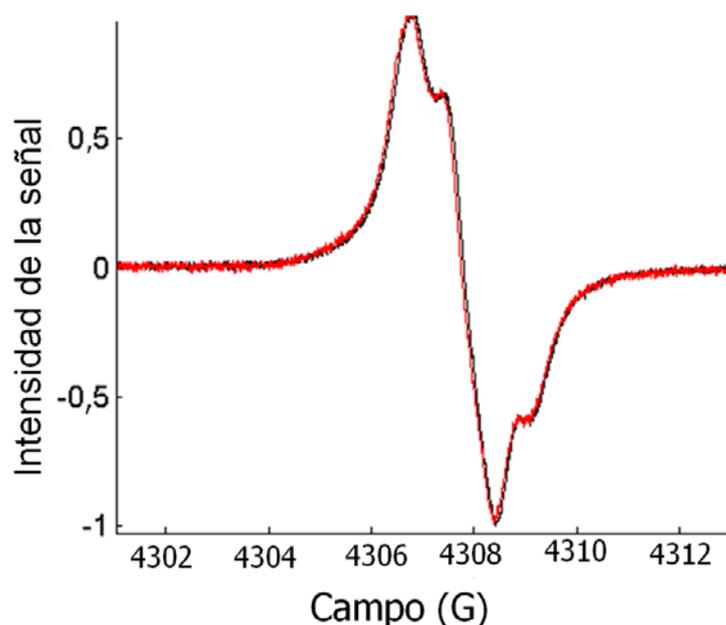


Figura 4.9. Comparación de los espectros de RPE de onda continua a temperatura ambiente obtenidos a partir de mezclas Cr^{VI}/Galur a pH 3,0 en H₂O (negro) y en ²H₂O (rojo). Solo se muestra la porción central del espectro. Condiciones: [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,67 mM, [Galur] = 0,33 mM, T = 20 °C.

Una observación similar se hizo trabajando a una temperatura de 50 K, Figura 4.10.a-b. La Figura 4.10.c muestra la simulación del espectro de RPE de onda continua a baja temperatura de mezclas de Cr^{VI}/**Galur** a pH = 3,0 (Figura 4.10) asumiendo una sola especie oxo-Cr^V (especie 1 en Tabla 4.3). Los correspondientes valores de g_{iso} (1,9788) y el acoplamiento de ⁵³Cr isotrópico hiperfino (⁵³Cr $A_{iso} = 17,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) concuerdan con los valores derivados anteriormente a partir de los espectros de RPE de onda continua a temperatura ambiente ($g_{iso1} = 1,9786$, $g_{iso2} = 1,9784$, $g_{iso3} = 1,9785$, ⁵³Cr $A_{iso} = 17,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) para los dos tripletes y el doblete, respectivamente

[55]. Las interacciones hiperfinas observadas para cromo, son típicas de una penta-coordinación a un centro de Cr [35,125]. Sin embargo, aunque la simulación en la Figura 4.10.c resulta muy buena, no es perfecta. La simulación puede ser mejorada considerablemente, asumiendo, al menos, una especie adicional con parámetros de RPE ligeramente diferentes (especie 2 en Tabla 4.3, Figura 4.10.d), lo que *corroborar la hipótesis previa de múltiples especies al espectro de RPE a temperatura ambiente* [55].

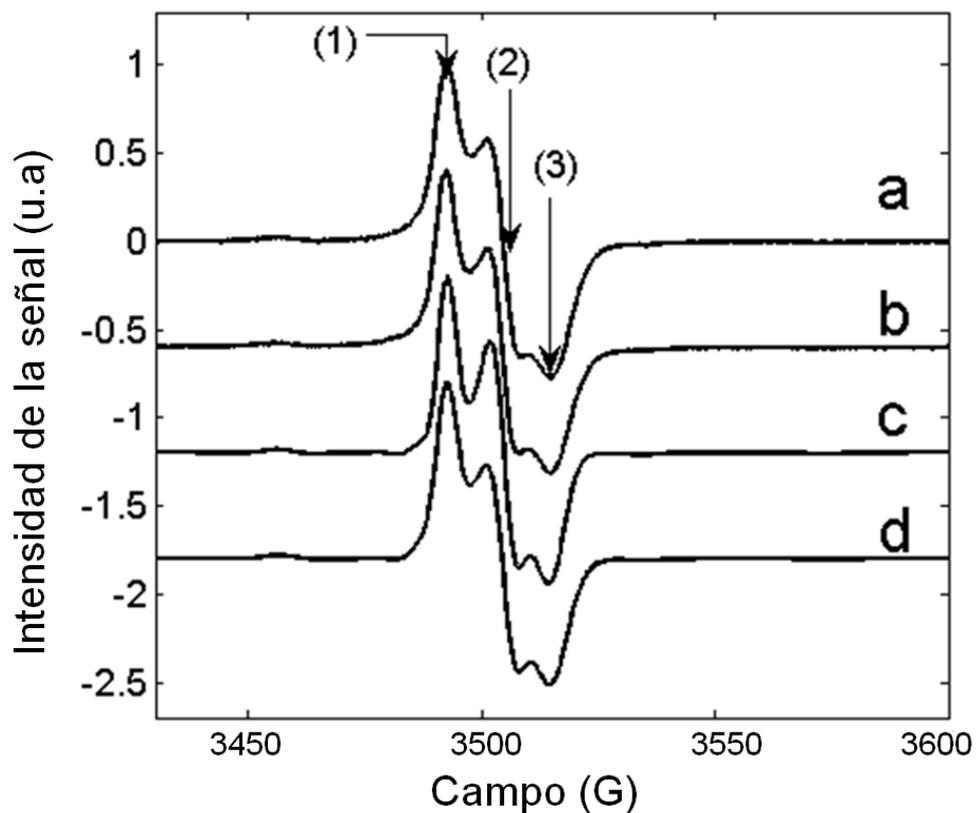


Figura 4.10. Espectros de RPE en banda X y onda continua, registrados a 50 K para los complejos oxo-Cr^V-Galur presentes a pH 3,0. Condiciones: [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,67 mM, [Galur] = 0,33 M. Modulación de amplitud: 3,0 G. (a) Espectro experimental usando H₂O (l) como solvente, los valores (1-3) corresponden a los valores de campo escogidos para los experimentos ENDOR, (b) Espectro experimental usando ²H₂O (l) como solvente, (c) Simulación asumiendo una especie simple con los parámetros dados en la Tabla 4.3, (d) Simulación asumiendo dos especies en relación 1:1 con los parámetros dados en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Parámetros espectroscópicos derivados de los espectros de RPE a 50 K para mezclas Cr^{VI}/Galur a pH 3,0.

	g_x	g_y	g_z	$^{53}\text{Cr } a_x$	$^{53}\text{Cr } a_y$	$^{53}\text{Cr } a_z$	
Especie 1	1,9853 ± 0,0002	1,9784 ± 0,0003	1,9726 ± 0,0003	7,3 ± 1,7	7,6 ± 1,7	35,9 ± 0,7	RPE
Especie 2	1,9855 ± 0,0002	1,9791 ± 0,0003	1,9718 ± 0,0003	7,3 ± 1,7	7,7 ± 1,7	35,9 ± 0,7	RPE
Estructura V	1,9854	1,9810	1,9784	1,2	5,2	29,8	DFT
Estructura VI	1,9868	1,9828	1,9771	0,5	4,7	28,5	DFT
Estructura VII	1,9865	1,9843	1,9751	2,5	7,0	31,2	DFT

Datos comparados con los valores calculados por DFT para los tres complejos oxo-Cr^V indicados en la Figura 4.8. Las coordenadas de las estructuras optimizadas se indican en la Figura S1. Los valores de a están dados en 10^{-4} cm^{-1} .

La Figura 4.11.b-d muestra la comparación de los espectros de ¹H Davies ENDOR de mezclas Cr^{VI}/Galur a pH 3,0 en ²H₂O tomados a los tres valores de campo (1 - 3) mostrados en la Figura 4.10.a (1-3). El ancho espectral fue el mismo (~ 4 MHz) para todas las posiciones y corresponde al máximo componente de acoplamiento hiperfino (en valores absolutos) de los

"*protones no intercambiables*". El máximo acoplamiento hiperfino de "*protones intercambiables es considerablemente menor*", como se evidencia por el espectro de ENDOR, tomado en la posición (1) para la mezcla Cr^{VI}/**Galur** a pH 3,0 en H₂O, Figura 4.11.a. La comparación con el espectro de ENDOR en la Figura 4.11.b muestra que los dos espectros difieren únicamente por la fuerte línea central con un ancho aproximado de 1 MHz.

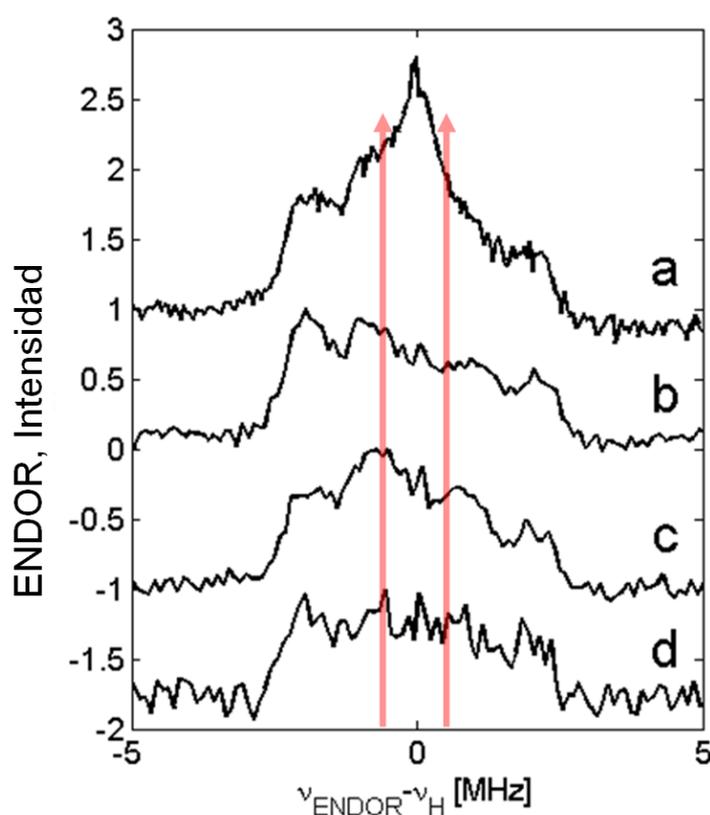


Figura 4.11. Espectro de ¹H Davies ENDOR para complejos oxo-Cr^V-Galur en H₂O (a) y ²H₂O (b-d) registrados a 20 K. Condiciones: [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,67 mM, [Galur] = 0,33 M. Espectros (a, b) Posición (1), (c) Posición (2) y (d) Posición (3) en la figura 4.10.

Para poder verificar las primeras interpretaciones de los espectros de RPE de onda continua a temperatura ambiente, realizadas en términos de tres especies [55], se realizaron cálculos por DFT de los parámetros de RPE de las tres estructuras propuestas, en la Figura 4.8. Los cálculos son informados sobre los complejos que poseen quiralidad R en el centro C1. Resultados similares se encontraron para las formas S, también sobre C1. Adicionalmente, se hicieron cálculos en complejos $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{O}^1, \text{O}^6\text{-galactopiruranonato})(\text{O}^6, \text{O}^5\text{-galactofuranuronato})]^-$, más reactivos y menos estables que las tres especies antes mencionadas. Aunque el estado actual de conocimientos del método DFT para complejos de metales de transición no es aún tan preciso para realizar una comparación cuantitativa entre experimentos y cálculos, los aspectos generales predichos por DFT son usualmente muy buenos [126]. La Tabla 4.3 muestra los cálculos de g y valores hiperfinos para los tres complejos con ^{53}Cr . Los valores de g concuerdan muy bien con los valores experimentales y se encuentran dentro de los valores teóricos y experimentales de g hallados para complejos oxo-Cr^V [127]. Los valores teóricos hiperfinos de ^{53}Cr "están subestimados". Resultados similares se han informado previamente para otros sistemas oxo-Cr^V [127].

También se calcularon los valores hiperfinos de protón y se comprobó que ninguno de los "protones intercambiables" en cualquiera de los complejos

posee valores hiperfinos de protón isotrópico mayores a 0,15 MHz (en valor absoluto). Esto *concuera con la observación de que el solvente deuterado no cambia el espectro de RPE de onda continua a temperatura ambiente y que los desdoblamientos hiperfinos de protones isotrópicos ($> 1,7$ MHz en valor absoluto) deben provenir de "protones no intercambiables"*.

En la Tabla 4.4, se rinforman los datos hiperfinos de ¹H calculados para "protones no intercambiables", que poseen valores hiperfinos isotrópicos no despreciables, para los tres complejos calculados. En el espectro de RPE de onda continua a temperatura ambiente del estudio [56] previo se propuso que la señal triplete proviene de la interacción del electrón desapareado con dos protones equivalentes con $|H_{a\text{iso}1}| = (1,8 \pm 0,1)$ MHz (triplete 1) y con $|H_{a\text{iso}2}| = (2,9 \pm 0,1)$ MHz (triplete 2). También se sugirió que estos protones eran los dos protones carbinólicos en las estructuras **V** y **VI** [55], Figura 4.8. Estos "protones no son intercambiables" lo que *concuera con los resultados aquí expuestos del experimento de RPE en agua deuterada*, Figura 4.9.

Los cálculos de DFT confirman que los protones carbinólicos son los únicos en las estructuras **V** y **VI** que poseen un acoplamiento hiperfino isotrópico significativo (Tabla 4.4). Todos los demás protones no intercambiables tienen acoplamientos isotrópicos menores a 0,15 MGz (en valores absolutos). Aunque los acoplamientos isotrópicos y el máximo acoplamiento hiperfino de protón (en valores absolutos) de los protones carbinólicos están en cierta

forma sobreestimados en el cálculo de DFT, existe una buena concordancia entre el conjunto global de aspectos predicho por DFT y las observaciones experimentales.

Para poder ajustar el espectro de RPE de onda continua a temperatura ambiente, se tomo en consideración una señal doblete ($|H_{\text{aiso3}}| = (2,4 \pm 0,1)$ MHz debida a una tercer especie minoritaria [55]. Esta fue descrita como la especie $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^{\text{ring}}, \text{O}^6\text{-galactopiranuronato})(\text{O}^5, \text{O}^6\text{-galactofuranuronato})]$ (**VII**, Figura 4.8), con una multiplicidad doblete debida al protón carbinólico del galactofuranuronato. El análisis de DFT reveló que además de este protón, también el protón carbinólico del galactopiranuronato posee un acoplamiento hiperfino isotrópico significativo (Tabla 4.4), lo cuál indicaría que esta especie no se encontraría en la mezcla de reacción.

Por otro lado, los complejos $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^1, \text{O}^6\text{-galactopiranuronato})(\text{O}^6, \text{O}^5\text{-galactofuranuronato})]^-$ son considerablemente menos estables que los dos complejos $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^6, \text{O}^5\text{-galactofuranuronato})_2]^-$. Más aún, se encontró que los acoplamientos hiperfinos de algunos de los protones no intercambiables eran demasiado altos en comparación con los datos experimentales.

Tabla 4.4. Cálculos de parámetros por DFT para los protones carbinólicos de los tres complejos oxo-Cr^V descritos en la Figura 4.7.

		<i>A_x</i> (MHz)	<i>A_y</i> (MHz)	<i>A_z</i> (MHz)	<i>a_{iso}</i> (MHz)
Estructura V	H1	0,5	-5,6	-5,9	-3,7
	H2	1,4	-5,6	-5,9	-3,4
Estructura VI	H1	1,2	-5,5	-5,8	-3,4
	H2	1,2	-5,5	-5,7	-3,3
Estructura VII	H1 ^[a]	-0,9	-6,8	-7,6	-5,1
	H2 ^[b]	1,9	-3,1	-3,4	-1,7

^[a] Galactofuranuronato, ^[b] Galactopiranuronato

Como conclusión, aunque se puede obtener información relevante sobre la identidad de los complejos usando espectroscopia RPE de onda continua, existe un riesgo significativo de realizar sobre interpretaciones de los espectros. Por esta razón, se usaron los métodos espectroscópicos de RPE de onda continua a baja temperatura, Davies ENDOR de ¹H y DFT, para poder comprobar las primeras sugerencias realizadas sobre la especie Cr^V presentes en mezclas Cr^{VI}-**Galur** a valores bajos de pH. Los cálculos computacionales de DFT realizados en el presente trabajo, combinados con los experimentos de RPE de onda continua a baja temperatura y Davies ENDOR de ¹H corroboran la presencia de las especies [Cr^{VO}(O⁶,O⁵-galactofuranuronato)₂]⁻

(**V** y **VI** en la Figura 4.8) a valores bajos de pH, pero no se pudo confirmar la presencia de la especie $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^{\text{ring}}, \text{O}^6\text{-galactopiruranonato})(\text{O}^5, \text{O}^6\text{-galactofuranuronato})]$ (**VII** en la Figura 4.8).

De hecho, los datos de RPE a temperatura ambiente, pueden ser simulados *relativamente bien asumiendo solo dos tripletes*, e incluso los datos de baja temperatura son bien reproducidos con dos contribuciones (Figura 4.10). Se ha informado que el Cr^V forma quelatos de cinco miembros más favorablemente que de los seis miembros [128]. Adicionalmente, la especie **Galur** es un buen ligando para la formación de estos quelatos, ya que posee grupos 2-hidroxicarboxilato y vic-diolato potenciales para esta unión.

4.2.3. Detección y caracterización de especies oxo-Cr^V-Glucar

Las mezclas de reacción Cr^{VI}/Glucar estudiadas por RPE, mostraron señales angostas e intensas a temperatura ambiente, debidas a complejos Cr^V-Glucar. Los espectros consisten en una señal principal proveniente del ⁵²Cr con un *g_{iso}* medio de 1,9785 y cuatro señales minoritarias provenientes del isótopo de ⁵³Cr, Figura 4.12.

La *señal principal* no es *simple*, como se puede apreciar en el inserto de la Figura 4.12, y es la resultante de la contribución de varias especies. La concentración de Cr^{VI} usada en los experimentos de RPE fue baja para evitar fenómenos de relajación que ensanchan la señal con la consiguiente pérdida

de resolución. La variación en la concentración de **Glucar** no afecta la forma de la señal ni su resolución, *de lo cual puede inferirse que los complejos observados poseen su esfera de coordinación saturada*. La intensidad de la señal de RPE y el período durante el cual se pueden observar las señales de las especies Cr^V-Glucar depende de la concentración de protones y Glucar. A elevadas concentraciones de protones y de Glucar el *tiempo de vida media* de *éstos complejos* es demasiado corto para ser medidos por RPE. Por esta razón, se utilizaron condiciones experimentales en donde las especies de Cr^V son más estables. Luego de transcurrida la reacción la especie final fue siempre Cr^{III}.

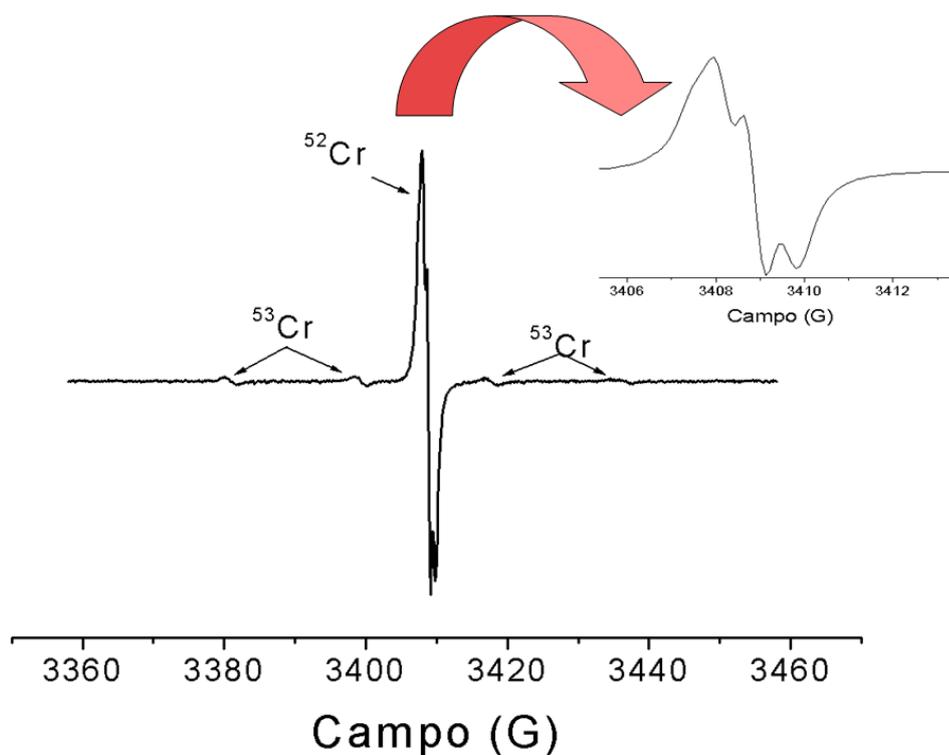


Figura 4.12. Espectro de EPR, banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, pH = 4,0, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44041 GHz, modulación de amplitud = 0,5 G, ancho de barrido = 100,0 G, tiempo de conversión = 81,92 ms; constante de tiempo = 40,96 ms, centro de campo = 3408 G, potencia: 10 mW, resolución = 1024 puntos.

Con el objetivo de caracterizar estos complejos, se realizaron espectros secuenciales por EPR banda X, a temperatura ambiente, a distintos valores de pH. La modulación de amplitud utilizada en estos experimentos fue 0,2 G y 0,5 G. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a) Con baja modulación de amplitud, el espectro de RPE mostró mayor resolución a todos los valores de pH estudiados, Figura 4.13.

b) A valores de pH 1,0 - 2,0 - 3,2 - 4,1 y 5,3, se observa una señal cuyo tiempo de vida media depende del pH, Figuras 4.14 - 4.18, sin cambios en la forma del espectro (inserto Figuras 4.14 - 4.18).

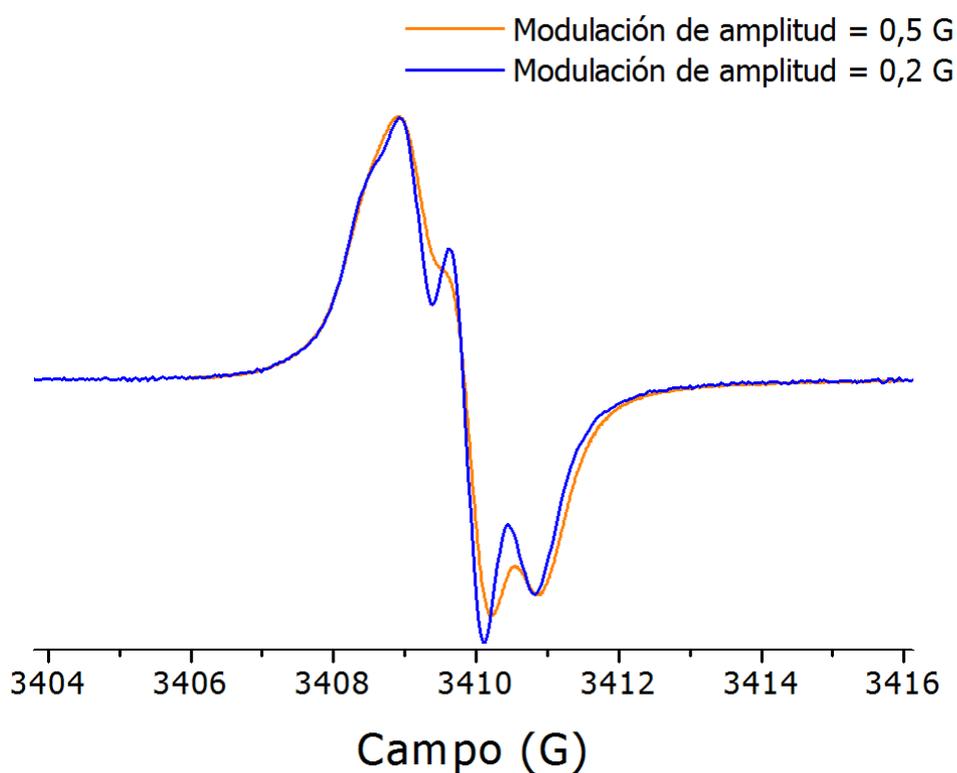


Figura 4.13. Espectro experimental de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, pH = 3,2, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms.

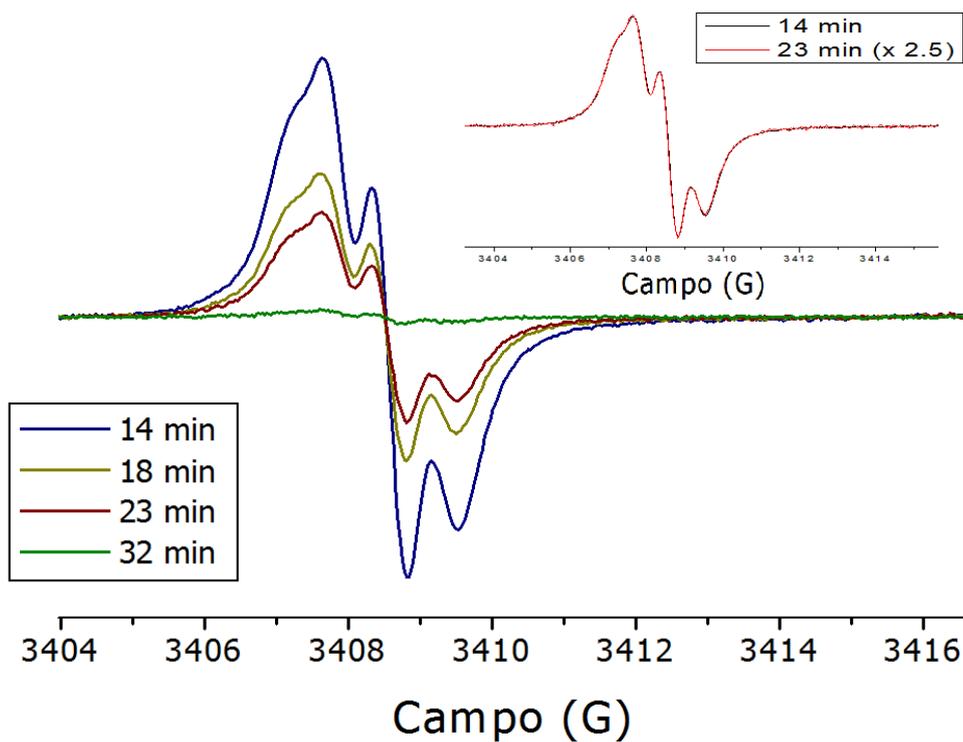


Figura 4.14. Evolución en el tiempo del espectro experimental de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar a pH = 1,0. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, pH = 1,0, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms, modulación de amplitud:=0,2 G.

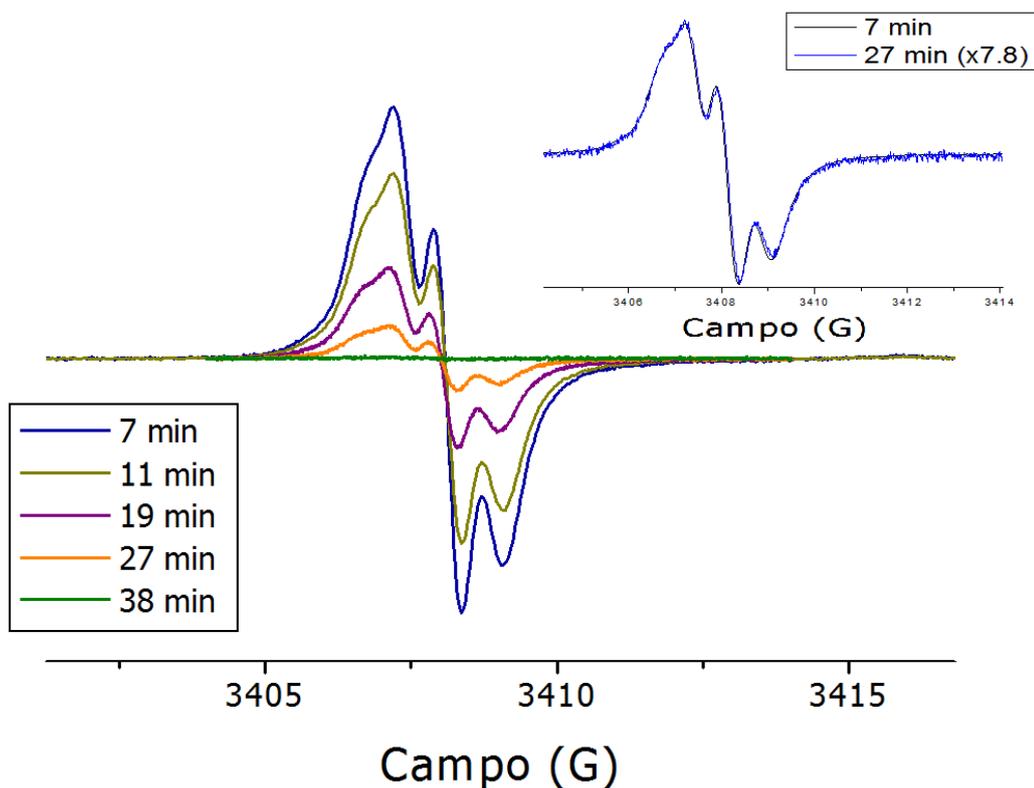


Figura 4.15. Evolución en el tiempo del espectro experimental de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar a pH = 2,0. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, pH = 2,0, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms, modulación de amplitud=0,2 G.

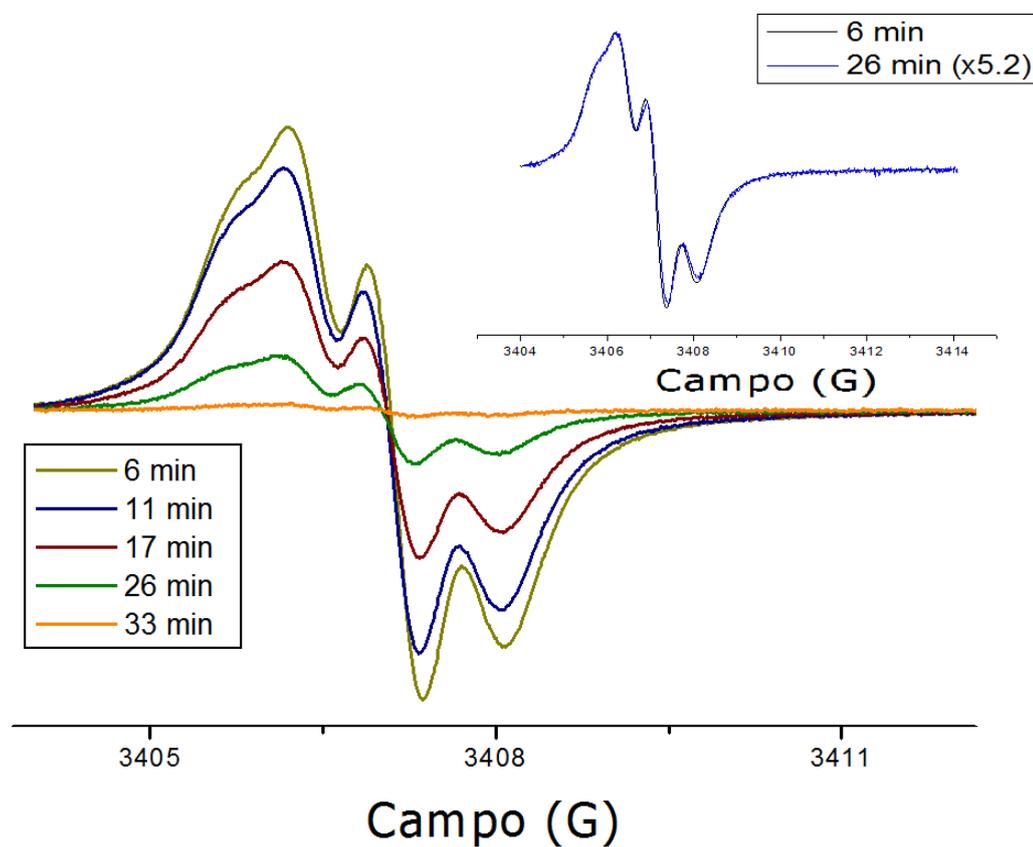


Figura 4.16. Evolución en el tiempo del espectro experimental de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar a pH =3,2. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, pH = 3,2, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms, modulación de amplitud=0,2 G.

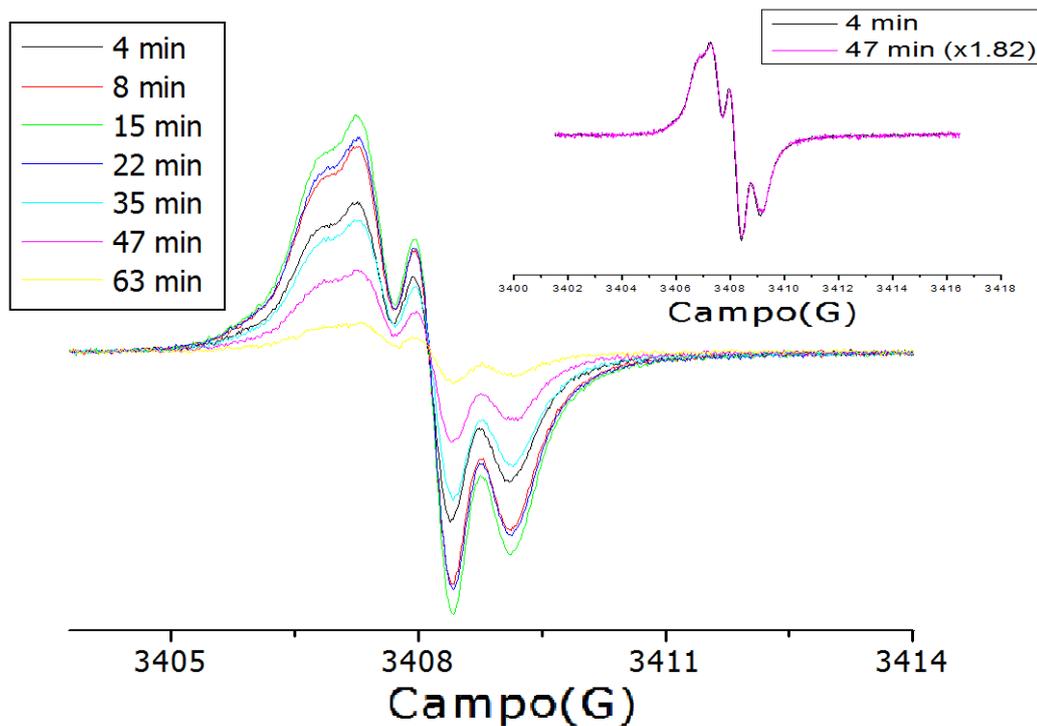


Figura 4.17. Evolución en el tiempo del espectro experimental de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar a pH = 4,1. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M; pH = 4,1, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms, modulación de amplitud: 0,2 G.

De las figuras anteriores se deduce que las especies oxo-Cr^V-Glucar en el rango de pH 1,0 – 4,1, son las mismas, ya que no observan cambios en la forma del espectro, con el tiempo. Además, la formación y subsiguiente decaimiento de las señales muestra un comportamiento similar: el incremento inicial de la señal es muy rápido y el decaimiento posterior toma un tiempo relativamente corto (30 - 40 min). A pH = 4,1 la forma del espectro es ligeramente diferente (Figura 4.17 y 4.18), el hombro de los espectros a campos más bajos se intensifica levemente.

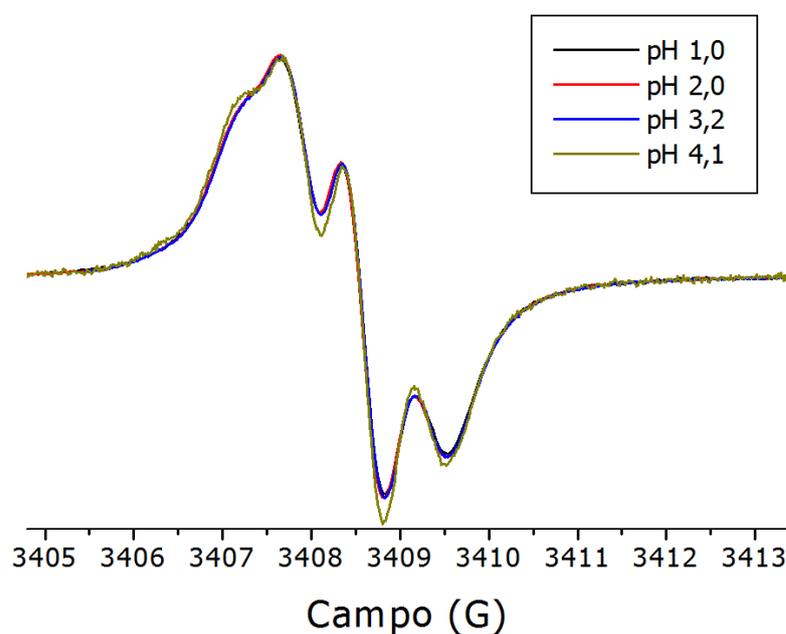


Figura 4.18. Comparación de los espectros de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar a diferentes pH. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM; T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms.

También, la formación y decaimiento de la señal son más lentos a pH = 4,1. La intensidad de la señal de RPE crecen más lentamente y desaparece después de transcurrida más de una hora.

A pH = 6,0 el espectro es diferente, Figura 4.19 b. Por ende, en el rango de valores de pH 4,1 – 6,0 tiene lugar un cambio en el tipo de coordinación del ligando **Glucar** al Cr^V originando especies oxo-Cr^V Glucar diferentes.

Para realizar la caracterización, todos los espectros fueron simulados con el programa *pest Winsim*, para asignar el tipo de coordinación y comparar los resultados obtenidos a diferentes valores de pH. En cada caso, el valor de campo se corrigió usando el estándar interno, dp^h ($g_{iso} = 2,0036$) antes de la simulación. Los resultados obtenidos en la simulación de los espectros se muestran en la Tabla 4.5, mientras que la Figura 4.19 compara los espectros experimentales y simulados para las especies oxo-Cr^V-Glucar generadas a pH 4,1 y 6,0.

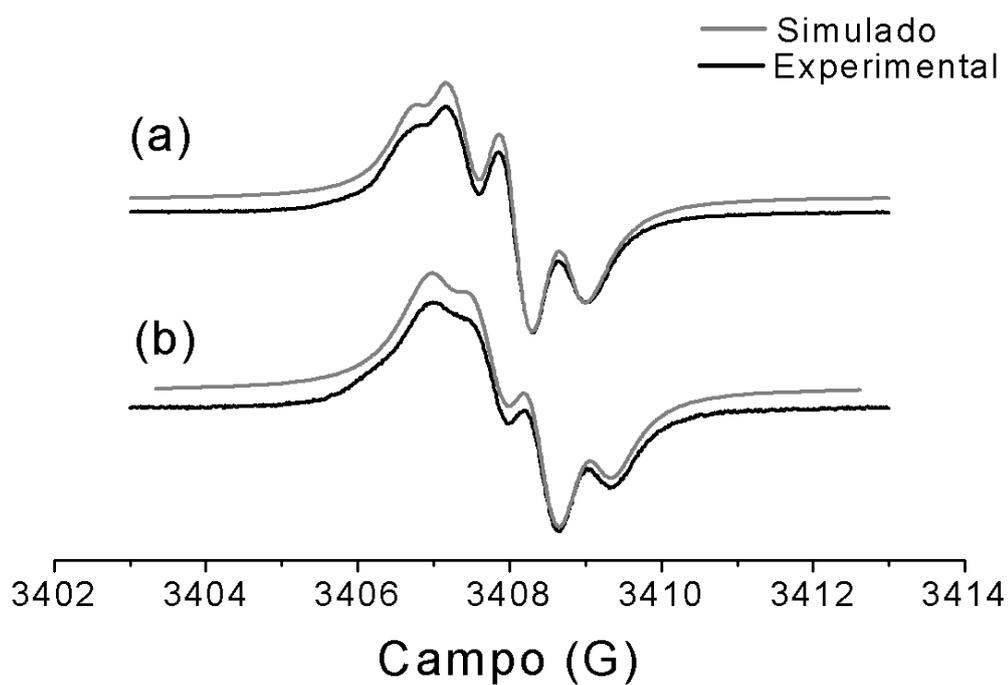


Figura 4.19. espectros experimentales y simulados de RPE de onda continua en banda X, de las especies oxo-Cr^V-Glucar: a) pH 4,1 y b) pH 6,0. Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms, modulación de amplitud: 0,2 G.

Tabla 4.5. Parámetros espectroscópicos de las especies oxo-Cr^V-
Glucar

Multiplicidad		¹ H a _{iso} (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	⁵³ Cr A _{iso} (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	Ancho de línea (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	g _{iso}	%
pH						
1,0	t	0,68	17,0	0,46	1,9783	76,4
	t	0,59		0,43	1,9785	23,6
3,2	t	0,68	17,0	0,46	1,9783	75,6
	t	0,60		0,40	1,9785	24,4
4,1	t	0,69	17,0	0,46	1,9783	74,9
	t	0,62		0,38	1,9785	25,1
6,0	t	0,71	16,8	0,39	1,9783	32,9
	t	0,63		0,47	1,9785	56,3
	s	-		0,64	1,9790	10,8
[H ⁺] (M)						
0,20	t	0,67	17,0	0,48	1,9783	74,1
	t	0,58		0,42	1,9785	25,9

Condiciones: [Glucar] = 0,13 M, [Cr^{VI}] = [GSH] = 1,0 mM, T = 20,0 °C, F = 9,44 GHz, tiempo de conversión = 81,92 ms, constante de tiempo = 40,96 ms, modulación de amplitud: 0,2 G.

Cuando se empleó un exceso de **Glucar** sobre Cr^{VI} (130:1), en el rango de pH 1,0 – 4,1, los espectros experimentales indicaron la existencia de más de una especies oxo-Cr^V-Glucar. Los parámetros obtenidos a partir de la simulación indicaron la presencia de al *menos tres especies*. Dos de ellas

presentaron una multiplicidad triplete: tripletes a $g_{iso1} = 1,9783$ y $g_{iso2} = 1,9785$. La multiplicidad de la tercera especie no pudo ser resuelta por lo que se la simuló como un singlete con $g_{iso3} = 1,9790$, Figura 4.19 y Tabla 4.5.

La presencia de la tercera especie pudo ser visualizada como un hombro, a bajos valores de campo. El acoplamiento *shf* correspondientes a las señales con g_{iso1} y g_{iso2} (tripletes) es el esperado para *dos protones carbinólicos equivalentes acoplados al espín del electrón* de la especie de Cr^V. Para formar los quelatos de cinco miembros más estables, estos protones carbinólicos deben pertenecer al sitio 2-hidroxicarboxilato de dos moléculas diferentes de **Glucar**, unidas al Cr^V, para dar $[Cr^VO(O^1, O^2\text{-glucar})_2]^-$. Los valores de g_{iso} y A_{iso} ($17,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) se corresponden con los de complejos oxo-Cr^V penta coordinados con dos grupos carboxilato y dos grupos alcoholato, Tabla 4.1. Los diferentes 1H a_{iso} y g_{iso} para los dos tripletes se *corresponden* con los dos *isómeros geométricos* del *bisquelato pentacoordinado oxo-Cr^V- Glucar*, **VIII** y **XI**, Figura 4.20.

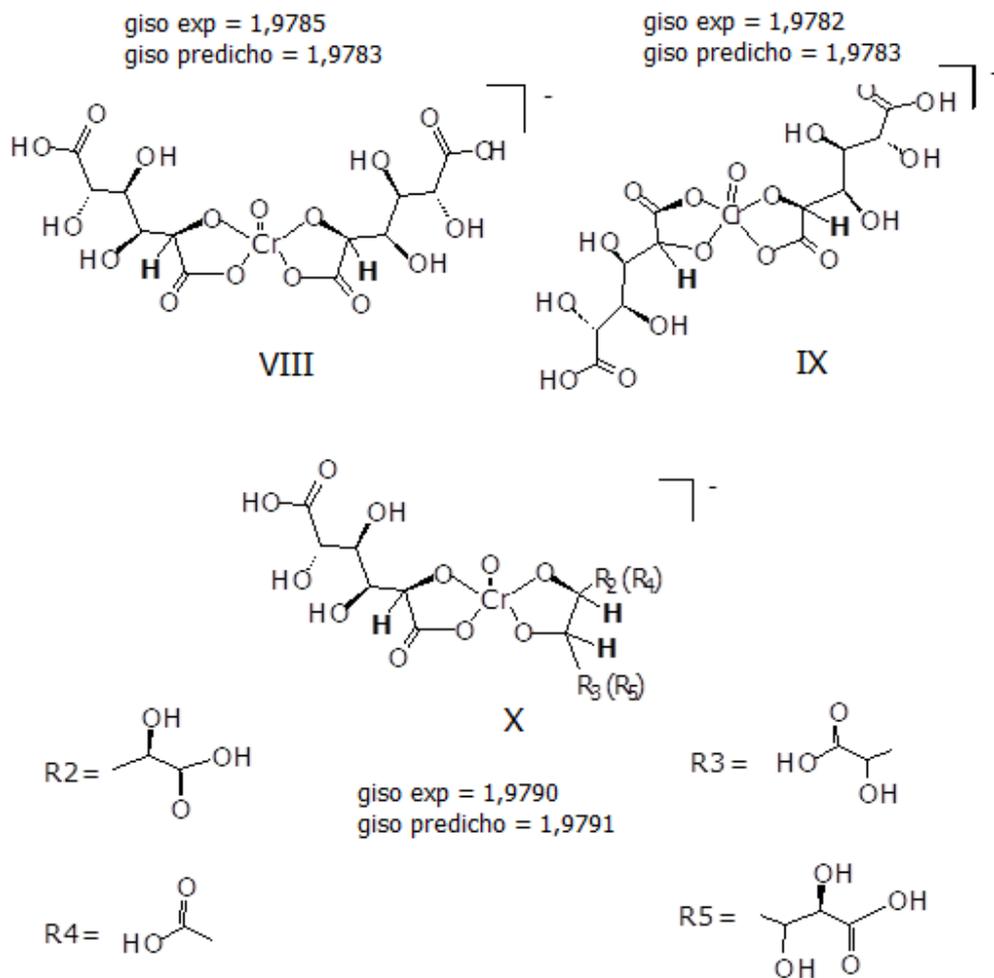


Figura 4.20. Estructuras propuestas para los complejos oxo-Cr^V-Glucosa a pH ácido.

Otros posibles tipos de coordinación han sido descartados por las siguientes razones:

- a) La posibilidad que Glucar actúe como molécula tetradentada a través de sus dos grupos carboxilato, generaría especies demasiado inestables, debido a efectos tensionales.
- b) Cuatro grupos carboxilato provenientes de cuatro moléculas de Glucar diferentes generarían una especie Glucar-Cr^V con un valor predicho de $g_{iso} = 1,9764$, el cuál no fue observado.
- c) Los complejos de vida media larga Cr^V-Glucar fueron generados por reacción de Cr^{VI} con solución acuosa conteniendo GSH a temperatura ambiente. En estos experimentos se usó una $[Cr^{VI}] = [GSH]$. La reacción Cr^{VI}/GSH es un método rápido y conveniente para generar Cr^V por reducción mono electrónica de Cr^{VI}. Finalmente el Cr^V es coordinado por **Glucar**, el cuál está en exceso sobre el Cr^V. Ninguna de las especies encontradas en las mezclas de reacción Cr^{VI}/**Glucar** poseía el valor típico de g_{iso} de especies oxo-Cr^V-S (1,9961, 1,9857 y 1,9820).
- d) Los valores experimentales obtenidos de g_{iso} excluyen la posibilidad de especies hexacoordinadas.

Aunque el acoplamiento *shf* de la señal con g_{iso3} no fue resuelto, su valor provee información estructural. El alto valor de g_{iso} (1,9790) *sugiere especies oxo-Cr^V penta coordinadas*, muy posiblemente *especies de coordinación mixta*. Una posible estructura para esta tercer especie es un bisquelato pentacoordinado en donde una molécula de **Glucar** coordina al Cr^V usando su grupo 2-hidroxicarboxilato y otra molécula de **Glucar** cualquier sitio vic-diolato, por ejemplo, $[Cr^VO(O^1, O^2\text{-glucar}) (O^{3(4)}, O^{4(5)}\text{-glucar})]^-$ (**X**, Figura 4.20). El valor predicho de g_{iso} para especies oxo-Cr^V penta coordinadas con un grupo donador 2-hidroxicarboxilato y dos grupos alcoholatos (1,9791), Tabla 4.1, está razonablemente de acuerdo con el valor de g_{iso} observado (1,9790). Esta especie está en muy baja proporción y solo puede ser observada a pH = 6,0 (11,0 %)- La falta de resolución de esta señal podría deberse a su baja proporción.

La presencia de especies monoquelatos de Cr^V fue descartada en base a:

- a) El efecto de la concentración del ligando sobre la señal a pH constante. La independencia del espectro con el aumento de [**Glucar**] confirma que las tres especies tiene la esfera de coordinación del Cr^V saturada con el ácido aldarico.
- b) Los valores experimentales de $^{53}Cr A_{iso}$ y g_{iso} son muy distintos de los correspondientes a monoquelatos.

El espectro de RPE dependiente del tiempo de la mezcla de reacción Cr^{VI}/**Glucar** en el rango de pH 1,0 – 4,1 muestra que las especies oxo-Cr^V-**Glucar** son siempre las mismas: las proporciones de las especies, estructuras superhiperfinas y valores de g_{iso} son casi constantes, al menos en el rango de pH 1,0 – 4,1. A pH = 6,0 la forma del espectro de RPE es diferente, Figura 4.19 y Tabla 4.4. Los valores de g_{iso1} , g_{iso2} y A_{iso} corresponden a los calculados para complejos oxo-Cr^V coordinados con *dos moléculas diferentes de Glucar* a través de sus grupos 2-hidroxicarboxilato para dar $[Cr^VO(O^1, O^2-glucar)_2]^-$, Tabla 4.1. Los acoplamientos *shf* de las señales con g_{iso1} y g_{iso2} son los *esperados para dos protones carbinólicos equivalentes acoplados al espín electrónico* de Cr^V. Las diferencias entre los valores de g_{iso1} y g_{iso2} indican que corresponden a los dos isómeros geométricos del Cr^V ($[Cr^VO(O^1, O^2-glucar)_2]^-$), **VIII** y **IX**, Figura 4.20. Cualquiera de los grupos *vic*-diolato de **Glucar** constituyen un modo de unión potencial para dar especies de Cr^V con *anillos quelantes de cinco miembros*. La tercer especie con $g_{iso} = 1,9790$ podría corresponder a complejos bisquelatos oxo-Cr^V penta coordinados con dos moléculas de **Glucar**: una coordinada por medio de dos grupos alcoholatos y la otra por medio de su grupo 2-hidroxicarboxylato ($g_{iso, predicho} = 1,9791$), **X**, Figura 4.20.

La presente caracterización propuesta es coherente con los resultados de RPE a temperatura ambiente y la química de coordinación de grupo carboxilato y

2-hidroxicaoboxilato a pH ácido. Al aumentar el pH, los grupos diolato comienzan a competir por la coordinación del Cr^V para generar las especies mixtas.

Un método alternativo para obtener las especies oxo-Cr^V-**Glucar** es el intercambio de ligando. Como donador de Cr^V se empleó el complejo Na[Cr^VO(ehba)₂], relativamente estable a pH = 3,0. La Figura 4.21 muestra la evolución en el tiempo del espectro de RPE de una mezcla **Glucar**/Na[Cr^VO(ehba)₂] (100/1) a pH = 3,0. Al principio de la reacción de intercambio, el espectro se compone de dos singletes a $g_{iso1} = 1,9785$ y $g_{iso2} = 1,9783$, típicos de la especie [Cr^VO(ehba)₂]⁻ *sin protones carbinólicos acoplados al espín electrónico* de la especie de Cr^V. Los parámetros de RPE sugieren que los singletes pueden ser asociados a dos bisquelatos –isómeros geométricos- en los cuales el ehba, actúa como ligando bidentado a través de los grupos 2-hidroxicarboxilato. Luego de 20 minutos, el espectro de RPE es dominado por dos tripletes. Este espectro puede ser simulado con dos tripletes y un singlete. Los resultados obtenidos a partir de la simulación del espectro experimental a los 20 minutos, están de acuerdo con los obtenidos para las especies Cr^V-Glucar obtenidas por reacción Cr^{VI}/**Glucar** o Cr^{VI}/**GSH**/**Glucar**.

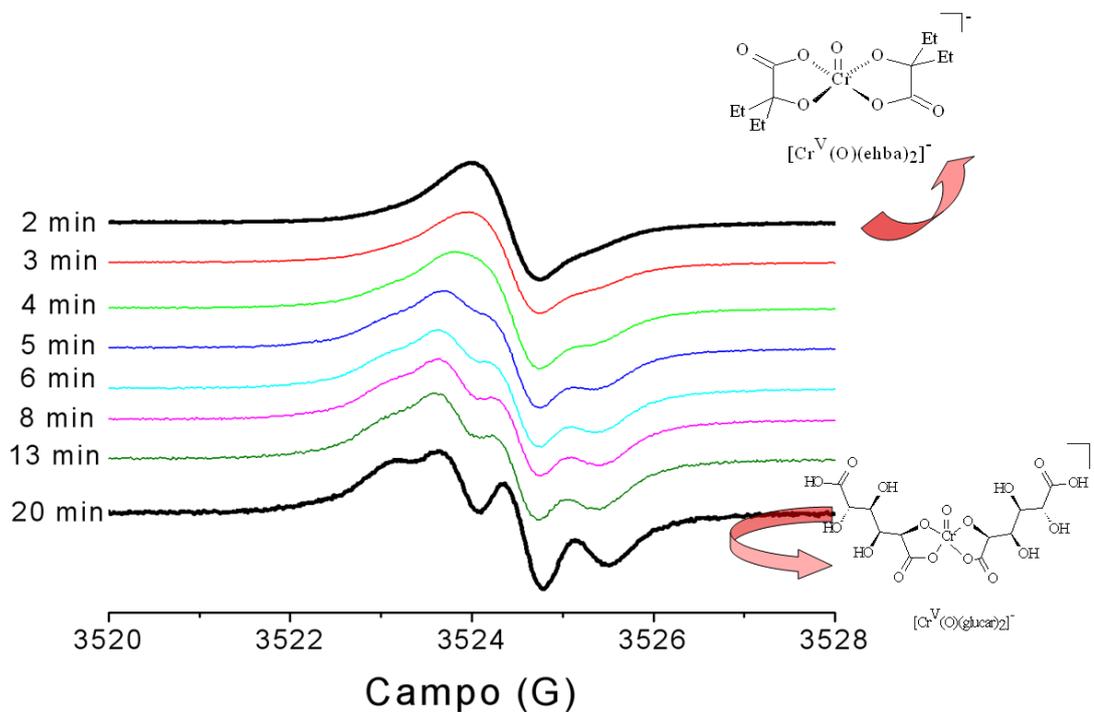


Figura 4.21. Evolución en el tiempo del espectro de RPE de una mezcla Glucar/ $\text{Na}[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]$ (100/1) a pH = 3,0.

Se sabe que Glucar puede formar dos lactonas, D-glucaro-1,4-lactona y D-glucaro-6,3-lactona, Figura 4.22. Ambas podrían contribuir a la señal de RPE observadas en la mezcla de reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Glucar}$, en caso de formarse en cantidad apreciable.

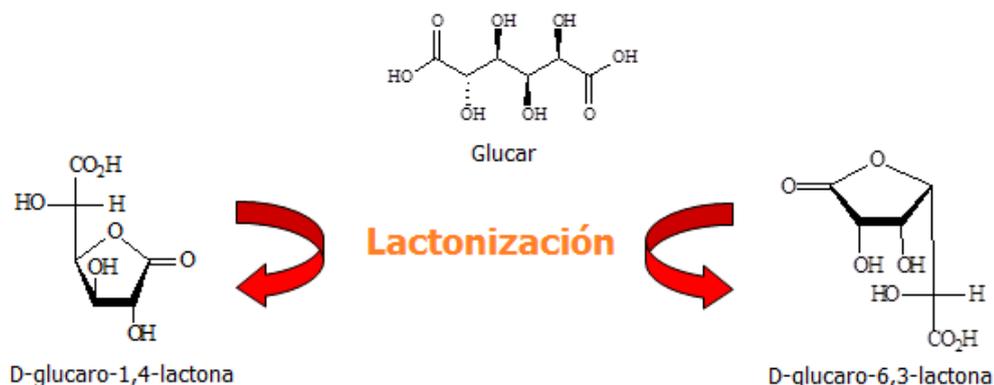


Figura 4.22. Formación de lactonas a partir de Glucar.

La Figura 4.23 muestra los espectros experimentales y simulados de ambas lactonas y la Tabla 4.6 resume los parámetros de RPE obtenidos de las especies oxo-Cr^V generados en mezclas Cr^{VI}/lactonas. La estructura de los complejos oxo- Cr^V-lactonas generadas, fueron analizadas a partir de los parámetros espectrales de RPE de soluciones frescas de lactonas luego de mezclarlas con soluciones de Cr^{VI}/**GSH** (1:1) a diferentes valores de pH. En el rango de pH 1,0 – 3,0 y relación lactona/Cr^{VI} = 515/1, los parámetros espectrales de RPE están compuestos de dos tripletes para ambas lactonas, Figura 4.23. Los valores obtenidos de g_{iso} y A_{iso} para los complejos oxo-Cr^V-D-glucaro-1,4-lactona y oxo-Cr^V- D-glucaro-6,3-lactona se resumen en la Tabla 4.6.

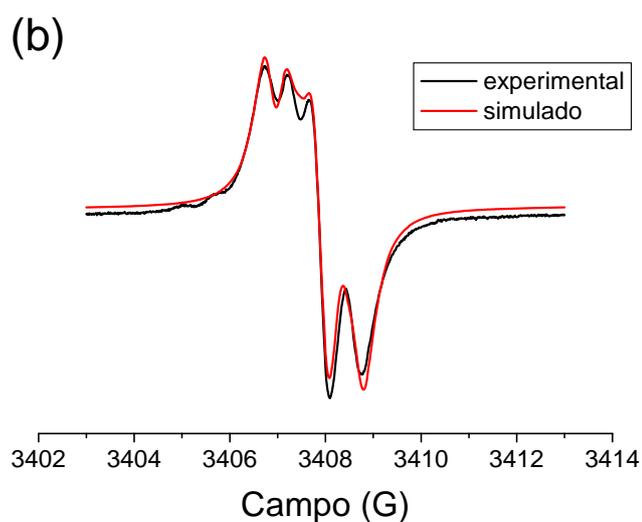
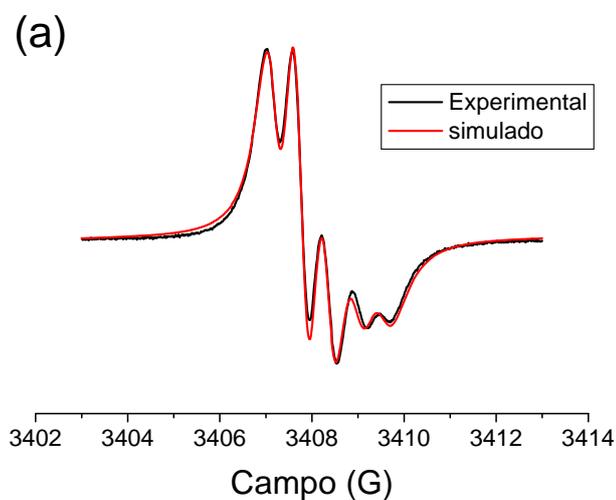


Figura 4.23. Espectros experimental y simulados de RPE en banda X onda continua de las especies oxo-Cr^V-lactonas. Condiciones: (a) [D-1,4-glucarolactona] = 0,17 M, [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,33 mM, pH = 3,0, Frecuencia = 9,439320 GHz, (b) [D-6,3-glucarolactona] = 0,17 M, [Cr^{VI}] = [GSH] = 0,33 mM, Frecuencia = 9,439173 GHz. Modulación de amplitud = 0,50 G, Tiempo de conversión = 81,92 ms, Constante de tiempo = 40,96 ms, Resolución = 1024 puntos. Rojo: espectro simulado. Negro: espectro experimental.

Tabla 4.6. Parámetros de RPE para especies oxo-Cr^V-lactonas obtenidas por simulación (1).

Lactona	Multiplicidad	¹ H a _{iso}	⁵³ Cr A _{iso}	g _{iso}	Ancho de línea	%
D-glucaro-1,4-lactona	t	0,55	18,8	1,9781	0,45	39,2
		0,53		1,9785	0,35	60,8
D-glucaro-6,3-lactona	t	0,92	18,6	1,9784	0,30	37,8
		0,83		1,9783	0,34	62,2

t = triplete. Espectro isotrópico simulado usando el programa WinSim. (1) Los valores de ¹H a_{iso} y A_{iso} están dados en 10⁻⁴ cm⁻¹

Los valores de *g*_{iso} y *a*_{iso}, Tabla 4.6, corresponden a los predichos para complejos oxo-Cr^V con dos alcoholatos y dos carboxilatos como grupos donores (*g*_{predicho} = 1,9783). Las *constantes de acoplamiento shf* obtenidas a partir de la simulación de la señal de RPE están en acuerdo con los valores esperados para especies oxo-Cr^V-2-hidroxiácidos con dos (uno por cada ligando quelante) protones carbinólicos acoplados al espín electrónico del Cr^V. Las dos señales de Cr^V pueden, en principio, ser atribuidas a los diferentes isómeros geométricos bisquelatos, [Cr^VO(O¹,O²-lactona)₂]⁻ en solución, **XI-XIV** en la Figura 4.24.

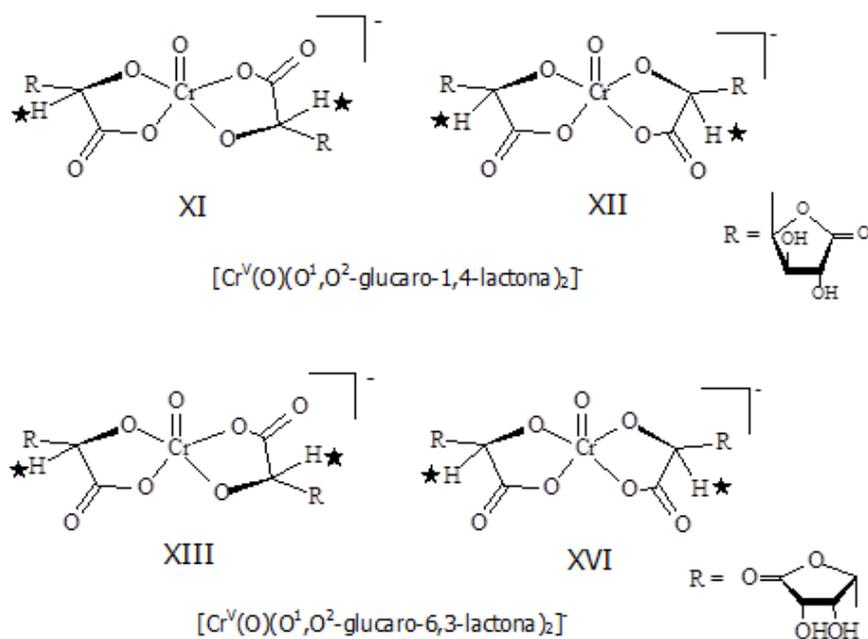


Figura 4.24. Estructuras propuestas para las especies oxo-Cr^V-lactonas.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Tabla 4.5 y las Figuras 4.13-17 y 4.24, es evidente que en las mezclas Cr^{VI}/**Glucar** en medio ácido en el rango de valores de pH 1,0 – 3,0; no hay presentes cantidades significativas, ninguna de las dos lactonas, D-glucaro-1,4-lactona y D-glucaro-6,3-lactona. Hemos asignado las estructuras **XI-XIV** a las especies oxo-Cr^V-lactona en una solución recientemente preparada: Cr^{VI}/lactona. En el rango de valores de pH 1,0 - 3,0, el espectro de RPE permanece sin cambios durante 5 h. Sin embargo, si se ajusta el pH a 5,0 o 6,0, luego de 30 minutos, el espectro de RPE cambia al obtenido al comenzar con mezclas Cr^{VI}/Glucar. *La apertura de las lactonas para dar Glucar podría explicar esta observación.*

Capítulo 5

*Estudios de la oxidación de
sacáridos por Cr^{VI/IV}*

5.1. Estudio de la reacción de oxidación de sacáridos por Cr^{VI} en medio ácido

5.1.1. Evolución en el tiempo de la reacción Cr^{VI} /sacárido

En medio ácido, los sustratos orgánicos, **GHL**, **Galur** y **Glucar**, son oxidados por el Cr^{VI} . Al finalizar la reacción redox Cr^{VI} /sacárido, se obtienen especies de Cr^{III} y sustrato oxidado. Cuando la evolución en el tiempo de este proceso es monitoreada mediante espectroscopia UV-vis, se obtienen espectros de absorción, cuyas características brindan información sobre el tipo de especies involucradas en la reacción redox Cr^{VI} /sacárido.

Se analizaron los espectros secuenciales de absorción, obtenidos a partir de la mezcla de reacción Cr^{VI} /sacárido en medio ácido, de los tres sacáridos estudiados en el presente trabajo. En todos los casos, se pudieron observar bandas de absorción, que presentaron máximos a 350 nm, y hombros a 420 – 500 nm, ambos característicos de la especie Cr^{VI} en medio ácido. Los valores de absorbancia de estas bandas decayeron en el tiempo, simultáneamente con la aparición de nuevas bandas a 540 - 570 nm y 410 - 430 nm, cuya intensidad varió en el tiempo, Figuras 5.1 - 5.3. Los espectros secuenciales de absorción, para las tres mezclas de reacción Cr^{VI} /sacáridos, indicaron la ausencia de puntos isobéuticos, insertos, Figuras 5.1 – 5.3.

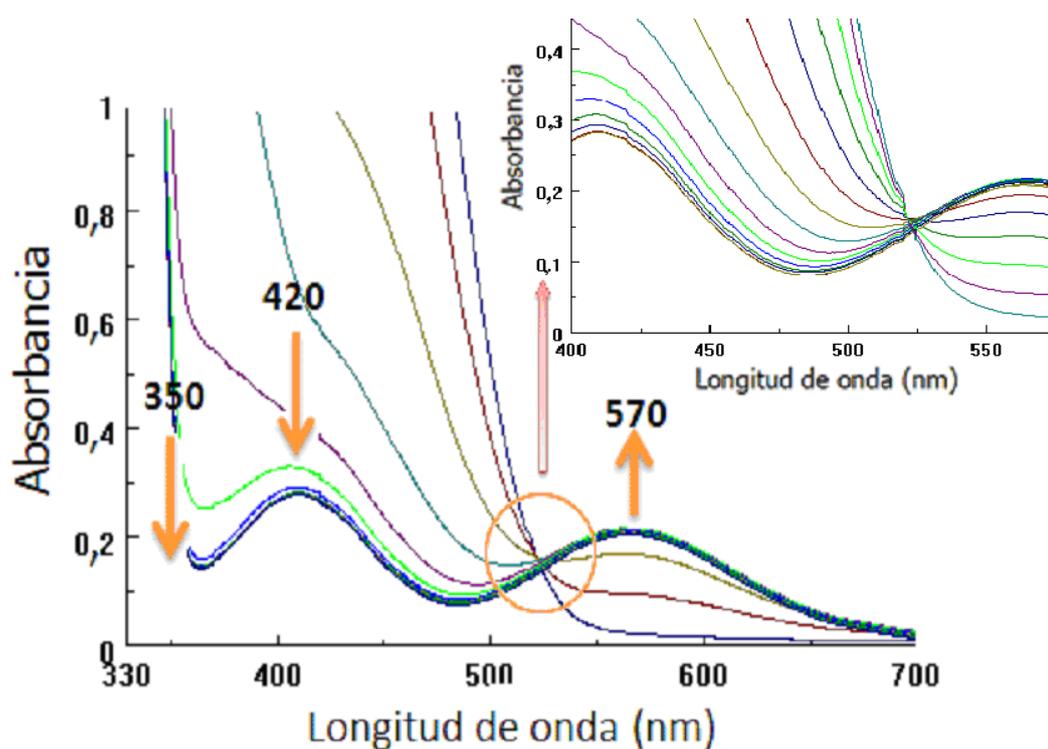


Figura 5.1. Evolución en el tiempo de la reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$ por espectroscopia UV-vis. Condiciones: $[\text{H}^+] = 0,2 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 6,0 \text{ mM}$, $[\text{GHL}] = 0,6 \text{ M}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$. El primer espectro fue tomado a $t = 2 \text{ min}$, el ultimo espectro a $t = 370 \text{ min}$, el tiempo entre cada espectro fue de $5,0 \text{ min}$. Inserto: detalle mostrando la ausencia de punto isobéptico.

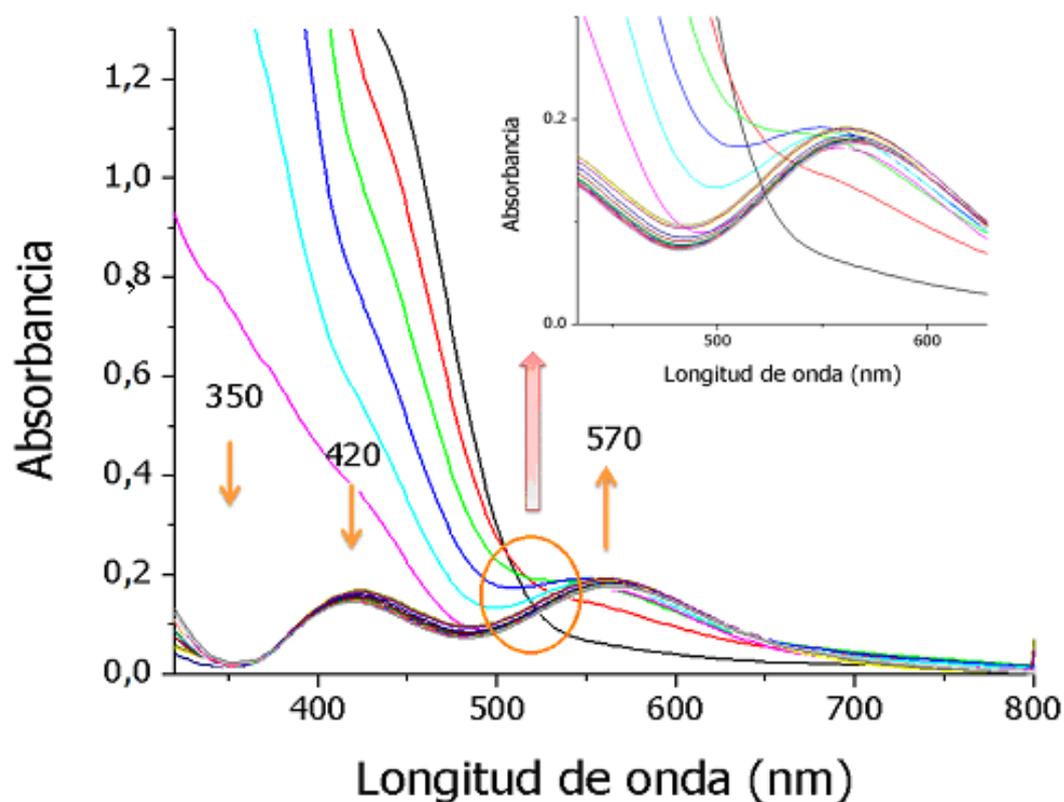


Figura 5.2. Evolución en el tiempo de la reacción Cr^{VI} /Galur seguido por espectroscopia UV-vis. Condiciones: $[\text{H}^+] = 0,1 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 6,0 \text{ mM}$, $[\text{Galur}] = 0,6 \text{ M}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$. El primer espectro fue tomado a $t = 2 \text{ min}$, el ultimo espectro a $t = 145 \text{ min}$, el tiempo entre cada espectro fue de $5,0 \text{ min}$. Inserto: detalle mostrando la ausencia de punto isosbético.

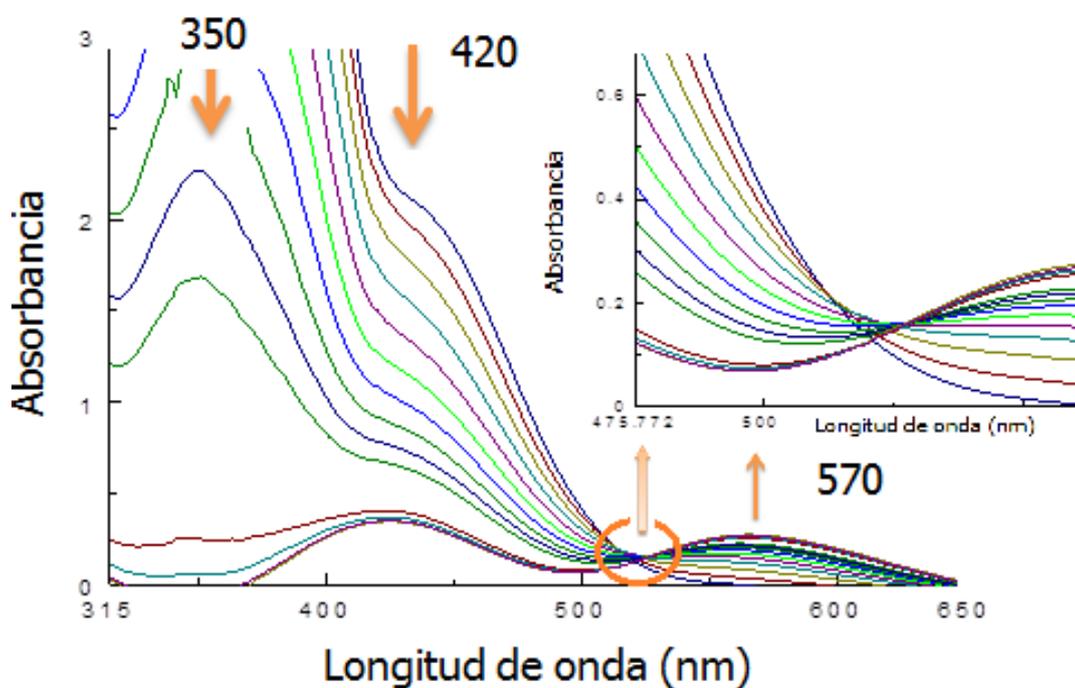


Figura 5.3. Evolución en el tiempo de la reacción Cr^{VI} /Glucar seguido por espectroscopia UV-vis. Condiciones: $[\text{Glucar}] = 50 \text{ mM}$; $[\text{H}^+] = 0,15 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 2,0 \text{ mM}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$. El primer espectro fue tomado a $t = 2 \text{ min}$, el último espectro a $t = 950 \text{ min}$, el tiempo entre cada espectro fue de $3,0 \text{ min}$. Inserto: detalle mostrando la ausencia de punto isobéptico.

Hacia el final de la reacción redox Cr^{VI} /sacárido, se observaron en el espectro de absorción electrónica de cada una de las tres mezclas de reacción, dos bandas de transición electrónica d-d, a $400 - 430 \text{ nm}$ y $540 - 570 \text{ nm}$, atribuibles a las transiciones ${}^4\text{A}_{2g} \rightarrow {}^4\text{T}_{1g}$ y ${}^4\text{A}_{2g} \rightarrow {}^4\text{T}_{2g}$ de especies de Cr^{III} coordinadas con ligandos oxigenados con simetría octaédrica [129]. En cada caso, estas bandas mostraron una lenta disminución de su intensidad y desplazamientos de sus máximos de absorción. Estos desplazamientos de los

máximos se atribuyeron al proceso de hidrólisis de complejos Cr^{III}-sacárido, hasta alcanzar la formación de la especie [Cr(H₂O)₆]³⁺.

A las 24 h, se observaron en el espectro UV-vis, las típicas bandas del ión [Cr(OH₂)₆]³⁺ (410 nm, $\epsilon = 18,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y 574 nm, $\epsilon = 15,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [129].

Estos resultados confirman que, *al finalizar la reacción Cr^{VI}/sacárido se forma un complejo Cr^{III}-sacárido soluble, el cuál se hidroliza a [Cr(OH₂)₆]³⁺ luego de un lapso de tiempo.*

A modo de ejemplo, la Figura 5.4 muestra los últimos espectros realizados sobre la mezcla Cr^{VI}/**Glucar**, luego de 950 minutos, donde la concentración de Cr^{VI} es despreciable. Las bandas a 548 y 400 nm disminuyen en intensidad y ambas sufren un desplazamiento de 10 nm hacia longitudes de onda mayores, sugiriendo la formación de especies Cr^{III}-**Glucar** que se hidrolizan con el tiempo. Los últimos espectros de la Figura 5.4 se corresponden con la especie [Cr(OH₂)₆]³⁺, indicando que se ha producido la hidrólisis completa de los complejos Cr^{III}-**Glucar**.

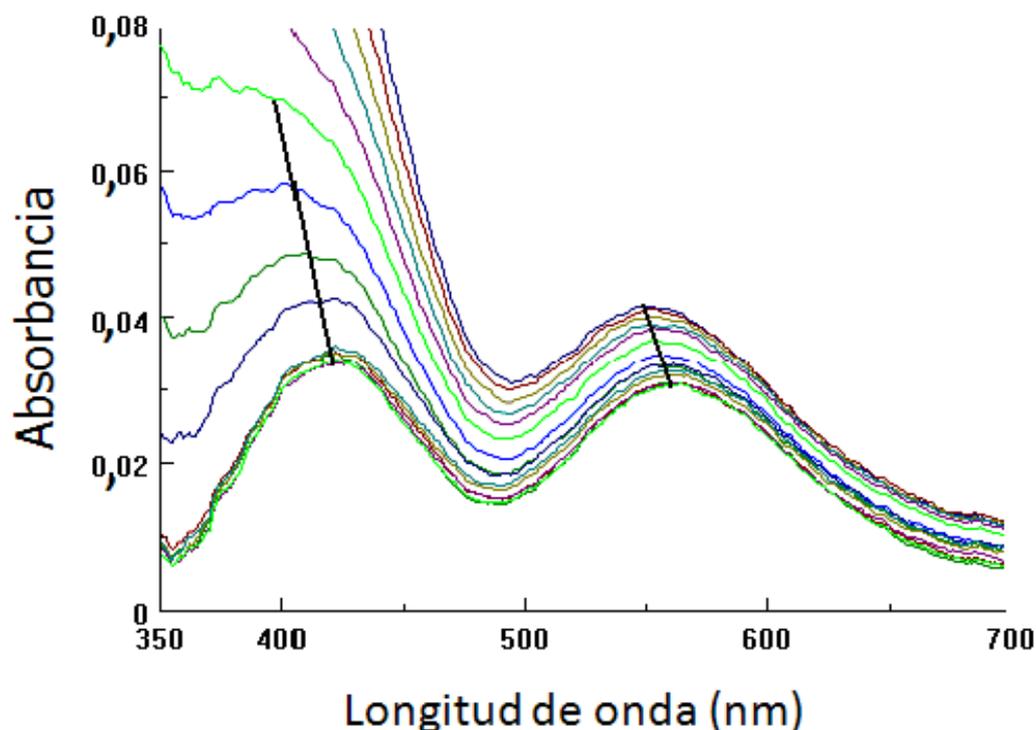


Figura 5.4. Espectros intermedios y finales de una mezcla de reacción de Cr^{VI} /Glucar. Condiciones: $[\text{Glucar}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] = 0,15 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 2,0 \text{ mM}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$. Espectros cada 5 minutos. Se observa el desplazamiento de las bandas debido a la hidrólisis de las especies de Cr^{III} -Glucar en $[\text{Cr}(\text{OH}_2)_6]^{3+}(\text{ac})$.

La evidente falta de punto isobéptico en todas las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido estudiadas, indica que, en todas ellas existen especies intermedias de cromo en concentraciones apreciables durante la reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} . Se puede concluir que el agente oxidante Cr^{VI} no se reduce directamente a Cr^{III} en una sola etapa y, por lo tanto, la velocidad de desaparición de Cr^{VI} no es igual a la velocidad de aparición de Cr^{III} . En consecuencia, deben existir varias etapas de reducción en donde se generen

las especies intermediarias de cromo hipervalente, en concentraciones apreciables. La posibilidad de que especies Cr^{IV} -sacárido se acumulen en la mezcla de reacción Cr^{VI} /sacárido es muy baja. Como ha sido demostrado en el Capítulo 3, *Estudios cinéticos de la oxidación de sacáridos por Cr^{IV}* , que el Cr^{IV} es un intermediario redox dada su alta reactividad con los sacáridos estudiados impediría que se acumule en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido.

5.1.2. Detección de ésteres de Cr^{VI}

La formación de ésteres de Cr^{VI} , se investigó para los sacáridos **GHL** y **Glucar**, mediante espectroscopía diferencial de mezclas Cr^{VI} /sacárido. La capacidad de **Galur** para formar éste tipo de especie fue informada previamente [55]. Como se describió en la sección 2.3.8, en el rango de valores de pH = 6,5 - 7,0 la reacción redox Cr^{VI} /sacárido procede muy lentamente. De hecho, la velocidad de la reacción redox debe ser lo suficientemente lenta como para permitir observar la formación de ésteres de Cr^{VI} -sacárido. Por ello, a estos valores de pH y a tiempos cortos de reacción, la etapa de formación de ésteres de Cr^{VI} puede distinguirse claramente de la correspondiente a la transferencia electrónica. En todos los casos, las mezclas Cr^{VI} /sacárido exhibieron una banda de absorción con un valor de λ_{max} en el rango 340 - 390 nm, consistente con la atribuida a ésteres de Cr^{VI} [101]. La

absorbancia de estas bandas se incrementa con el aumento de la [sacárido], probablemente como resultado de un desplazamiento hacia la formación de los ésteres en el equilibrio. A manera de ejemplo, se pueden observar en la Figura 5.5, los espectros diferenciales obtenidos para la reacción Cr^{VI} /GHL a pH 7,1 y luego de 2,0 min de reacción.

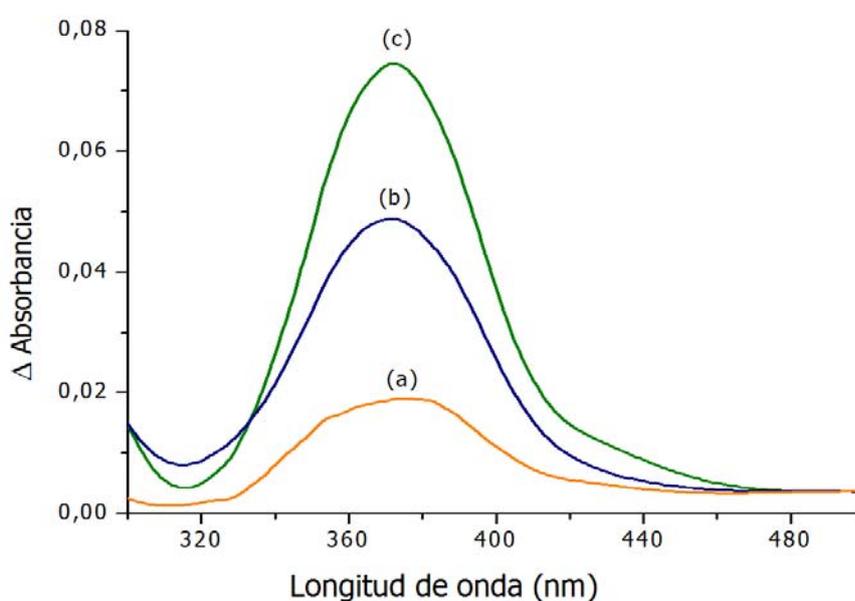


Figura 5.5. Espectros diferenciales de mezclas Cr^{VI} /GHL a pH = 7,1 mostrando el incremento en la banda a 372 nm con el aumento de la [GHL]. Condiciones: [GHL] = (a) 0,06, (b) 0,09 y (c) 0,12 M, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 0,6$ mM, $I = 1,0$ M, $T = 25$ °C.

5.1.3. Detección de radicales en mezclas Cr^{VI} /sacárido

La presencia de radicales libres orgánicos se evaluó en mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido, para los tres sacáridos en estudio (**GHL**, **Galur** y **Glucar**), mediante el test de polimerización con acrilonitrilo o acrilamida, como

agentes polimerizantes. Este tipo de test ha sido utilizado ampliamente para la detección de radicales libres orgánicos [102]. Los radicales libres orgánicos del tipo R^\cdot derivados de la oxidación de los sacáridos, actúan como iniciadores de la reacción de polimerización de los monómeros de acrilamida o acrilonitrilo, Figura 5.6.

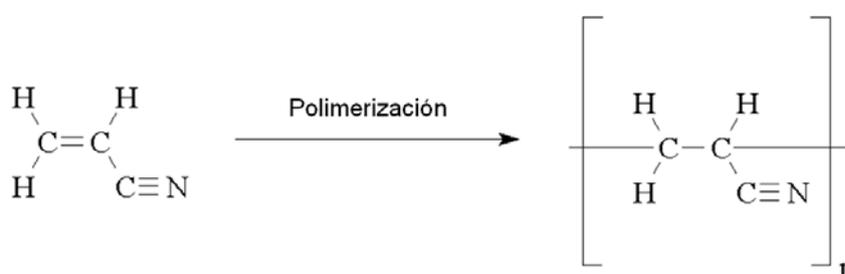


Figura 5.6. Reacción de polimerización de los monómeros de acrilonitrilo.

En todas las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido a las que se le adiciona agente polimerizante (acrilonitrilo o acrilamida) se obtuvo un precipitado blanco, indicando un resultado positivo. *La detección de radicales libres mediante el ensayo de polimerización, pone de manifiesto que existe una vía involucrando una etapa mono electrónica con formación de un radical orgánico, durante la reacción redox Cr^{VI} /sacárido.* Resultados similares se han obtenido para la reacción del Cr^{VI} con diversos sustratos orgánicos [44].

Si bien podría pensarse en detectar los radicales libres orgánicos por Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) utilizando atrapadores tales,

como el DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolin N-óxido), nuestros intentos resultaron infructuosos. El DMPO puede formar aductos relativamente estables con los radicales libres permitiendo su detección por RPE [130]. Los intentos realizados para la detección de radicales libres por RPE en nuestras mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido, fueron fallidos. Probablemente este resultado negativo se basa en que el atrapador de radicales libres es oxidado por el Cr^{VI} , por lo que perdería su capacidad de formar aductos estables.

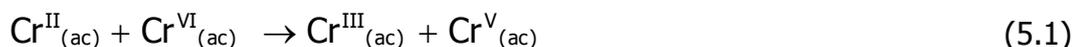
5.1.4. Detección de los intermediarios de reacción $\text{Cr}^{\text{II}}/\text{Cr}^{\text{IV}}$ en mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido

La especie Cr^{II} participa en el mecanismo de oxidación de numerosos alcoholes por Cr^{IV} y Cr^{VI} en medio ácido [38-42].

Se sabe que el Cr^{IV} puede oxidar alcoholes actuando como un agente oxidante de dos electrones para dar Cr^{II} y el correspondiente producto orgánico oxidado [39]. La presencia de los intermediarios de Cr^{II} y de Cr^{IV} en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido puede ser demostrada por su conversión en la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$, como se detalló en la sección 2.3.4.2 [38-42].

Cuando se intenta detectar al intermediario redox Cr^{II} , en mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido, existen dos reacciones que pueden eliminarlo del medio de reacción y evitar su detección experimental:

a) la reacción del Cr^{II} con Cr^{VI}, ec. 5.1



b) el consumo autocatalítico del CrO₂²⁺ por el Cr^{II}, ec. 5.2



Como se puede ver en las ecuaciones 5.1 y 5.2, el Cr^{VI} y el O₂ compiten por el Cr^{II}. Si la concentración de Cr^{VI} es alta tiene lugar la reacción indicada por la ec. 5.1. Además, la baja concentración de O₂ hace que solo parte del Cr^{II} (generado por reacción redox entre Cr^{IV} y el sacárido) se transforme en CrO₂²⁺. El Cr^{II} remanente reacciona según la ec. 5.2 para dar más Cr^{IV} que es reducido nuevamente a Cr^{II} por el sustrato que se encuentra en exceso. En definitiva, *no se lograría detectar* CrO₂²⁺.

Sin embargo, *si las condiciones experimentales son apropiadas*, es decir, se utiliza una [O₂] (1,26 mM) y una [Cr^{VI}] (~10⁻⁵ M), *la reacción del Cr^{II} (si se encuentra presente en la mezcla de reacción) con O₂ para dar CrO₂²⁺ puede competir exitosamente con las reacciones expresadas por las ec. 5.1 y 5.2* [38,39,44].

Los barridos espectrales periódicos de soluciones saturadas en O₂, de las mezclas de reacción Cr^{VI}/**GHL** y Cr^{VI}/**Galur** en medio ácido, mostraron la aparición de dos bandas de absorción a 290 y 245 nm, con una relación de intensidades $Abs_{245}/Abs_{290} = 2,2$, Figuras 5.7 - 5.8. Como se indicó previamente en la sección 2.3.3.4, estas dos bandas, así como la relación de intensidad máxima entre ambas, son *características del compuesto* CrO₂²⁺_(ac) [39,]. La identidad de la especie CrO₂²⁺_(ac), fue confirmada también, mediante la reacción con Fe^{II}, ec. 2.2.

Luego de que todo el Cr^{VI} ha sido consumido, ambas bandas persisten en solución, como se ha observado en la reducción de Cr^{VI} por alcoholes, polioles lineales, sacáridos e hidroxiaácidos [38-62].

Estos resultados espectroscópicos indican que el Cr^{II} se forma en la reacción Cr^{VI}/**GHL** y Cr^{VI}/**Galur**, lo cuál puede considerarse como evidencia de que el Cr^{IV} está involucrado en el mecanismo redox, como ocurre con otros sustratos estudiados [38-62].

Los primeros espectros de la serie de las Figuras 5.7 y 5.8 corresponden a mezclas de las especies: CrO₂²⁺_(ac) y Cr^{VI} como lo indica la presencia de las tres bandas de absorción a **245**, **290** y **350** nm. En la parte superior de las Figuras 5.7 y 5.8 se puede ver la evolución en el tiempo de la concentración de CrO₂²⁺_(ac), para la mezcla de reacción Cr^{VI}/**GHL** y Cr^{VI}/**Galur** respectivamente. A **245 nm** absorben las especies CrO₂²⁺_(ac) y Cr^{VI}, por ello,

para calcular la $[\text{CrO}_2^{2+}]$ a cada tiempo se restó la contribución a la absorbancia del Cr^{VI} a esa longitud de onda. La $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ es conocida ya que a 350 nm solo absorbe esta especie. Por lo tanto, es posible calcular su contribución a la absorbancia total a 245 nm para cada tiempo.

De esta manera la concentración de $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ en función del tiempo de reacción (inserto de las Figuras 5.7 y 5.8) puede calcularse según las ec. 5.3 a 5.5:

$$\text{Abs}_{(\text{CrO}_2^{2+})}^{245} = \text{Abs}_{(\text{total})}^{245} - \text{Abs}_{(\text{Cr}^{\text{VI}})}^{245} \quad (5.3)$$

$$\text{Abs}_{(\text{CrO}_2^{2+})}^{245} = \text{Abs}_{(\text{total})}^{245} - \left[\frac{\text{Abs}_{(\text{Cr}^{\text{VI}})}^{245}}{\epsilon_1} \times \epsilon_2 \right] \quad (5.4)$$

$$[\text{CrO}_2^{2+}] = \frac{\text{Abs}_{(\text{CrO}_2^{2+})}^{245}}{\epsilon_3} \quad (5.5)$$

En las ec. 5.3 a 5.5, ϵ_1 y ϵ_2 representan los coeficientes de absortividad molar del Cr^{VI} a **350** y **245** nm, respectivamente, mientras que ϵ_3 es el coeficiente de absortividad molar del CrO_2^{2+} a 245 nm. En nuestras condiciones experimentales, $\epsilon_1 = 1550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_2 = 1900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El valor de $\epsilon_3 = 7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ es un dato obtenido de la literatura [39].

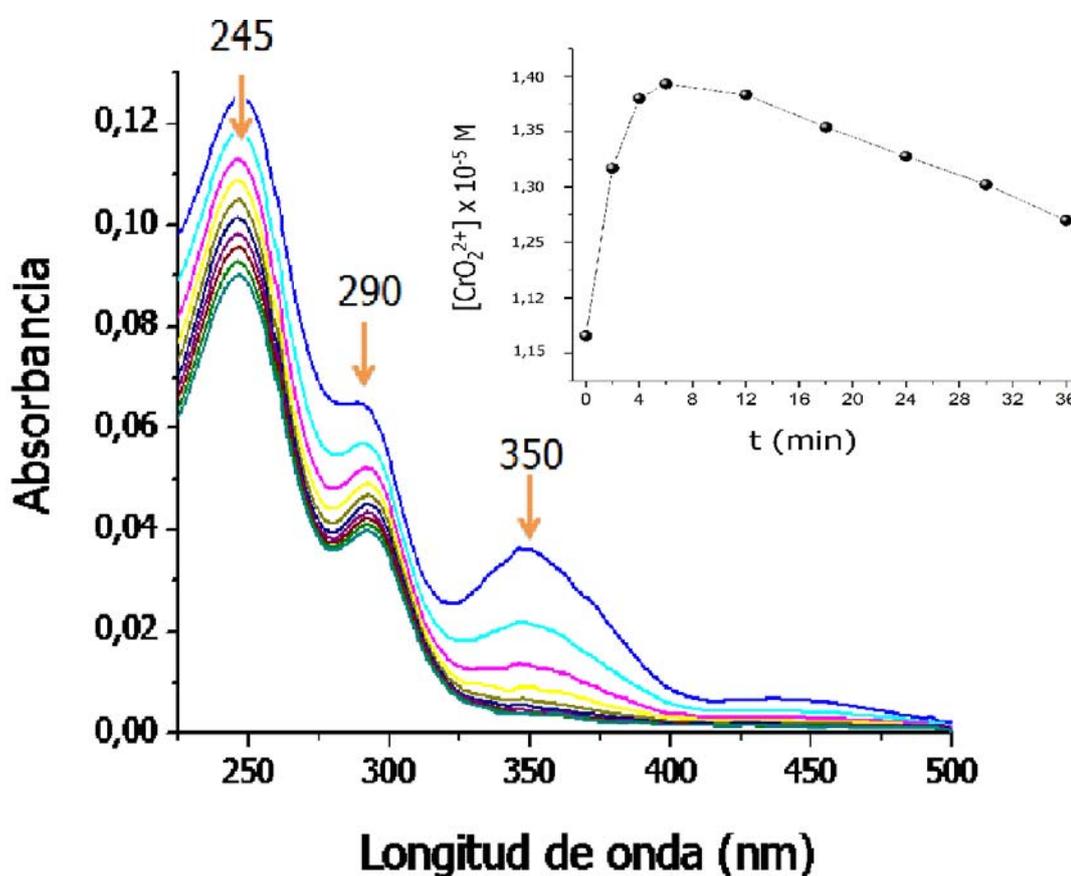


Figura 5.7. Evolución en el tiempo de los espectros de mezclas Cr^{VI} /GHL exhibiendo la formación de CrO_2^{2+} . Condiciones: $[\text{GHL}] = 0,2 \text{ M}$, $[\text{HClO}_4] = 0,2 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Espectros 1 - 4 y 5 - 9 adquiridos cada 2 y 6 min respectivamente. Inserto: evolución con el tiempo de la $[\text{CrO}_2^{2+}]$ a 245 nm.

De acuerdo a esto, la concentración máxima de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ para la mezcla de reacción Cr^{VI} /GHL presentó un valor de $1,4 \times 10^{-5} \text{ M}$, (rendimiento = 46 %). Si la reacción redox Cr^{VI} /GHL tuviera lugar exclusivamente través de la ruta $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{II}}$ [44], la cantidad de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ generado debería alcanzar el 100 % de rendimiento. Pero en este caso, el

porcentaje de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ producido fue menor, sugiriendo que parte del Cr^{VI} está reaccionando por otra vía que no involucra a las especies $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Cr}^{\text{II}}$.

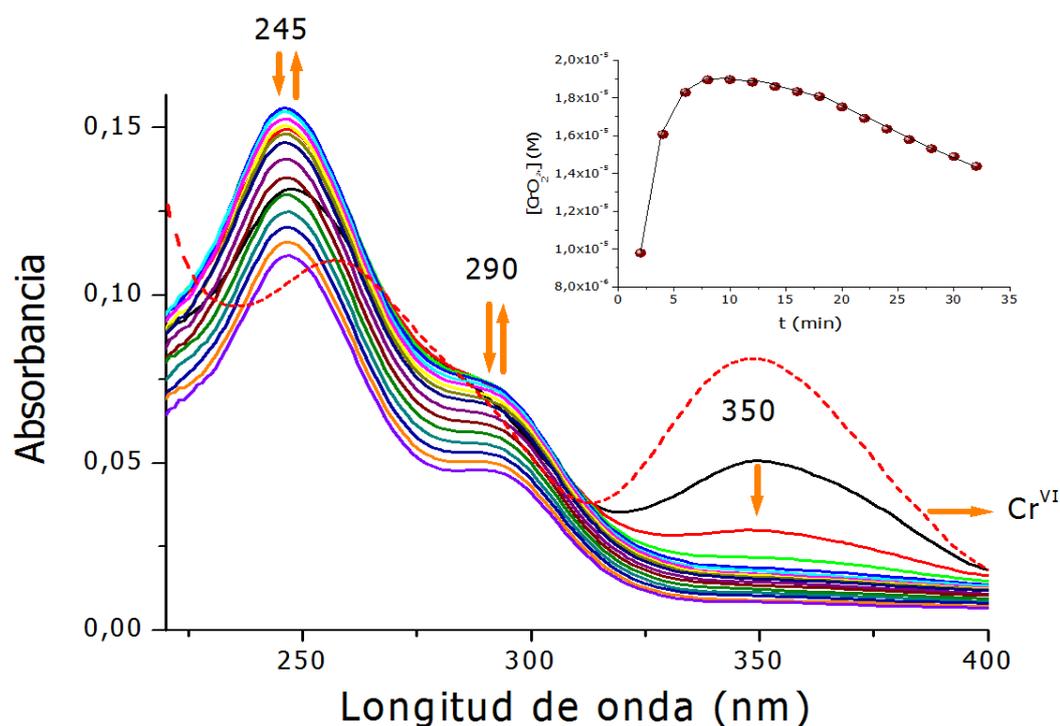


Figura 5.8. Evolución en el tiempo de los espectros de mezclas $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$ exhibiendo la formación de CrO_2^{2+} . Condiciones: $[\text{Galur}] = 0,02 \text{ M}$, $[\text{H}^+] = 1,0 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Espectros cada 2 min. Inserto: evolución con el tiempo de la $[\text{CrO}_2^{2+}]$ a 245 nm.

Para la mezcla de reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$, la concentración máxima de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ obtenida corresponde a un valor de $1,9 \times 10^{-5} \text{ M}$, (rendimiento = 32 %). Nuevamente, si la reacción redox $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$ tuviera lugar exclusivamente través de pasos de 2 electrones, el rendimiento en la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$

generado debería alcanzar el 100 %. Dado que el porcentaje de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ producido fue menor, esto sugiere que parte del Cr^{VI} reacciona por una vía mono electrónica, es decir, no involucra a las especies Cr^{IV}/Cr^{II}.

Los resultados obtenidos al intentar detectar la presencia de CrO_2^{2+} en mezclas Cr^{VI}/**Glucar** fueron, inicialmente, negativos. Los barridos periódicos de soluciones saturadas en O₂, de la mezcla de reacción Cr^{VI}/**Glucar** en medio ácido y condiciones similares a las utilizadas para los estudios de otros sustratos, no mostraron la aparición de las dos bandas de absorción características de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$, Figura 5.9. El espectro obtenido, muestra una única banda alrededor de **275** nm, aproximadamente, que se superpone con el espectro de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$, Figura 5.9. Es posible que este espectro corresponda al complejo Cr^{III}-Glucar, formado durante la reacción de la oxidación Cr^{VI}/**Glucar** [131], o a la especie *bis-μ-hidroxo* de carácter dímérico, $[\text{Cr}(\text{OH})_2\text{Cr}]^{4+}$, formada cuando el Cr^{II} entra en la esfera de coordinación del Cr^{IV}. Luego de la transferencia electrónica, ambos centros metálicos producen Cr^{III} [38].

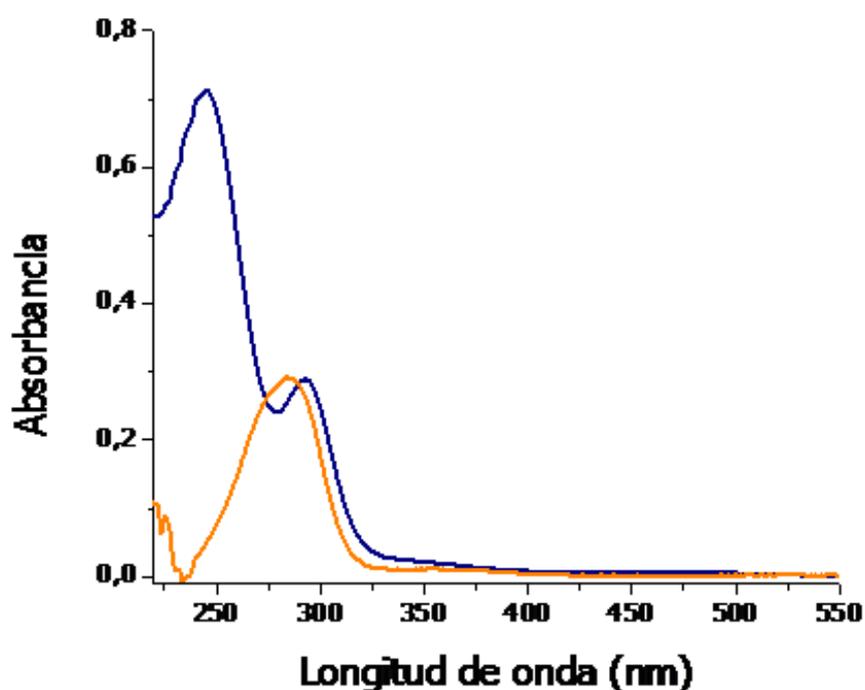


Figura 5.9. Comparación de los espectros de la especie CrO_2^{2+} y el espectro obtenido para una mezcla de reacción Cr^{VI} /Glucar. Condiciones: $[\text{Glucar}] = 40,0 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] = 0,3 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ (relación S/ Cr^{VI} 4000:1), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Azul, espectro de CrO_2^{2+} ; naranja, espectro de la mezcla de reacción Cr^{VI} /Glucar.

A pesar de este resultado, y teniendo en cuenta lo expuesto al inicio de esta sección, sabemos que las especies: Cr^{II} y Cr^{IV} , participan del mecanismo de oxidación por Cr^{VI} de numerosos sustratos [38-40,44,113,132]. Entonces, para poder observar la aparición de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$, para esta reacción particular, utilizamos condiciones experimentales diferentes. Para ello se tuvo en cuenta:

- (a) la baja solubilidad del sustrato orgánico,
- (b) la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ necesaria para mantener una relación apropiada para esta experiencia,
- (c) que la acidez y fuerza iónica del medio no afecte, significativamente la estabilidad del sustrato y el CrO_2^{2+} (sección 2.3.3.5), y
- (d) evitar la desproporción del Cr^{IV} (sección 2.3.3.6).

Los espectros obtenidos en estas nuevas condiciones se muestran en la Figura 5.10.

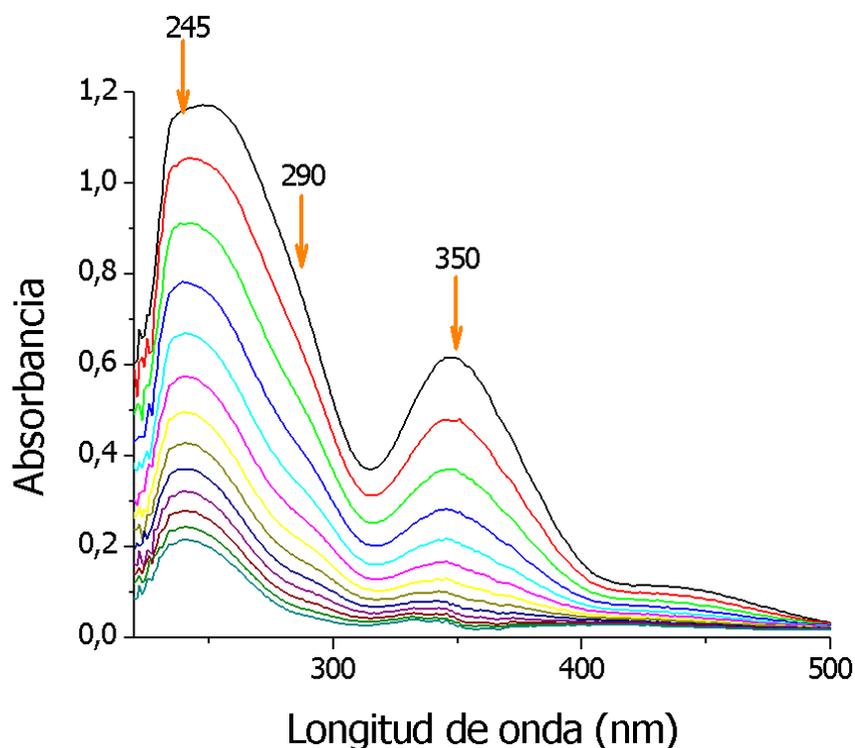


Figura 5.10. Evolución en el tiempo de los espectros de mezclas Cr^{VI} /Glucar exhibiendo la formación de CrO_2^{2+} . Condiciones: $[\text{Glucar}] = 40 \text{ mM}$; $[\text{H}^+] = 2,0 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $I = 2,0 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$. Espectros barridos cada 3 min.

Los primeros tres espectros de la Figura 5.10 indican la presencia de dos bandas de absorción a 245 y 350 nm. A partir del cuarto espectro, se observa la aparición de un hombro (poco definido) a **290** nm. La banda a **350** nm corresponde a Cr^{VI} , mientras que la banda a 245 nm y el hombro a **290** nm, indicarían la presencia en la mezcla, de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$. La identidad de este compuesto fue confirmada luego, mediante la reacción con Fe^{II} , ec. 2.2.

Proponemos que la presencia de otra especie (no identificada) en la mezcla de reacción, hace que la relación de intensidades Abs_{245}/Abs_{290} no concuerde con los valores esperados en la detección del ion CrO_2^{2+} , como fue observado en las reacciones redox Cr^{VI}/**GHL** y Cr^{VI}/**Galur**.

Estos resultados espectroscópicos indican que el Cr^{II} se forma en la reacción Cr^{VI}/**Glucar** y puede ser considerado evidencia de que el Cr^{IV} está involucrado en el mecanismo redox [38-40,43,44,55,61,62].

Debido a la presencia de una interferencia, producida por una especie no identificada, Figura 5.9, el estudio cinético de la reacción Cr^{IV}/**Glucar** *no puede realizarse bajo las mismas condiciones experimentales empleadas* para la oxidación por Cr^{VI} de los sustratos **GHL** y **Galur**.

5.2. Estudios cinéticos de la oxidación de GHL y Galur por

Cr^{IV}

Los resultados obtenidos en la sección anterior, indican que en mezclas de reacción Cr^{VI}/**GHL**, Cr^{VI}/**Galur** y Cr^{VI}/**Glucar** existen especies intermediarias de Cr^{IV}. Se realizaron estudios para determinar la velocidad de la reacción de oxidación por Cr^{IV} de los sustratos **GHL** y **Galur**, de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 2, *Materiales y métodos*.

Como se describió en la sección 5.1.4, los espectros de mezclas de reacción Cr^{IV}/**GHL** y Cr^{IV}/**Galur** confirmaron que el aumento en la absorbancia a **290**

nm fue el resultado del incremento en la $[\text{CrO}_2^{2+}]$. En ambos casos, el espectro obtenido reveló valores de λ_{max} a **245** y **290** nm, junto con una relación de intensidades $\text{Abs}_{245}/\text{Abs}_{290} = 2,2$ característica de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ [38,39,44]. Adicionalmente, y para los dos sustratos en estudio en esta sección, al final de la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{sacárido}$, se adicionó solución de Fe^{II} en exceso y el espectro diferencial obtenido mostró una absorbancia negativa a 290 nm, confirmando la identidad de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$. De esta manera, la cinética de la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{GHL}$ y $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Galur}$ en medio ácido, en soluciones saturadas de O_2 , fue seguida espectrofotométricamente a **290** nm, por la formación de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$, como se detalló en la sección 2.3.3.8.

Es importante destacar que el Cr^{IV} puede *desproporcionar* en Cr^{III} y Cr^{VI} , con una *cinética* de *segundo orden* respecto a la $[\text{Cr}^{\text{IV}}]$ y una *dependencia inversa* con la $[\text{H}^+]$ [133]. La reacción de desproporción debe ser evitada, ya que el Cr^{VI} absorbe a 290 nm, interfiriendo con las mediciones de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$.

A muy bajas [sacárido], la desproporción del Cr^{IV} en Cr^{VI} y Cr^{III} fue evidente por la aparición del espectro típico de la especie Cr^{VI} , la cual presenta una banda característica a 350 nm. Como se indicó en la sección 2.3.3.7, las condiciones experimentales fueron elegidas de forma tal que la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{sacárido}$ pudiera competir exitosamente con la desproporción del Cr^{IV} .

Las Figura 5.11 y 5.12 indican que para mezclas $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{GHL}$ y $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Galur}$, respectivamente, se logró un muy buen ajuste de los datos de Abs_{290} vs tiempo empleando la ec. 3.5. En el inserto de ambas figuras, se puede observar la evolución en el tiempo de los espectros que demuestra la identidad de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$, sin observarse desproporción de Cr^{IV} .

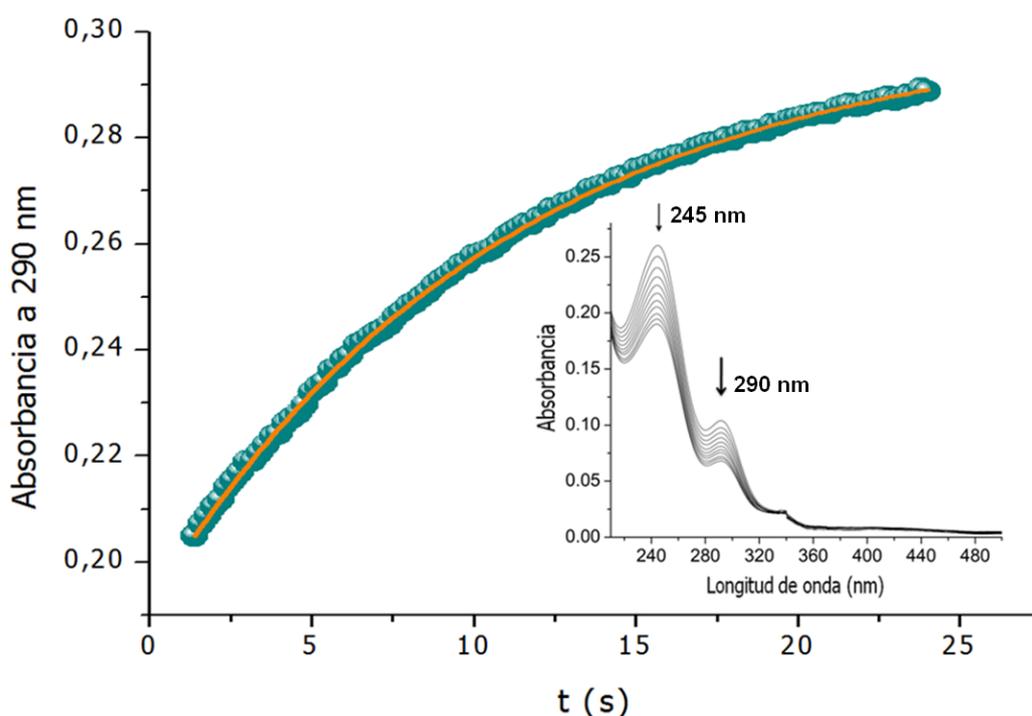


Figura 5.11. Incremento en la Abs_{290} debida a la formación de CrO_2^{2+} a partir de la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{GHL}$. El ajuste experimental de los datos fue realizado utilizando la ec. 3.5. Condiciones: $[\text{H}^+] = 0,30 \text{ M}$, $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $[\text{GHL}] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{IV}}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Inserto: evolución en el tiempo de las mezclas $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{GHL}$.

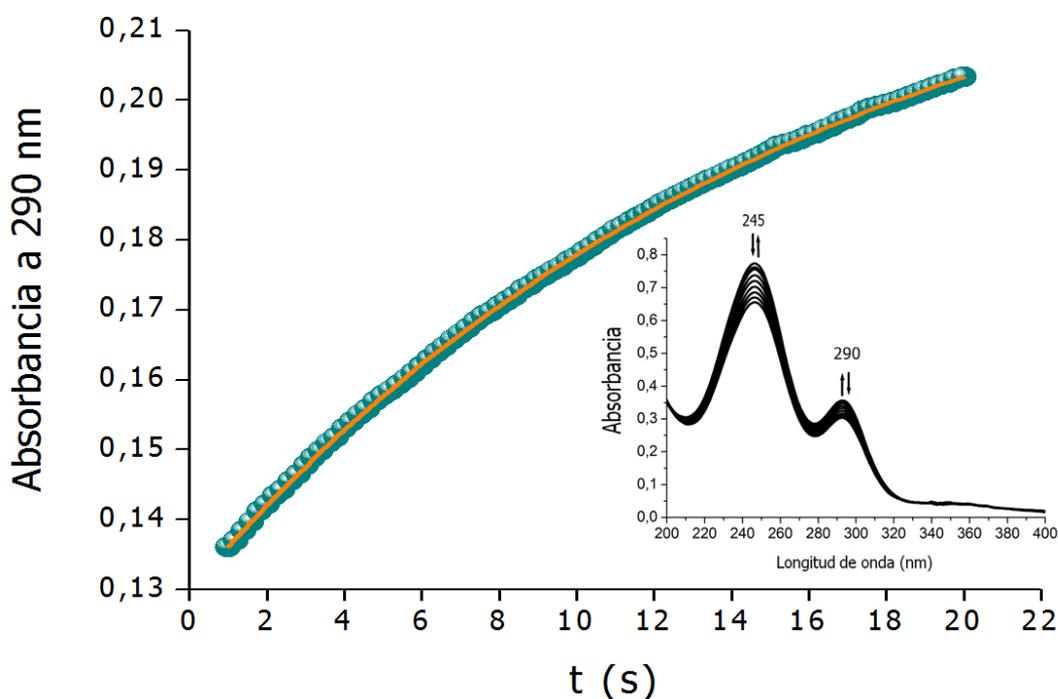


Figura 5.12. Incremento en la Abs_{290} debida a la formación de CrO_2^{2+} a partir de la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Galur}$. El ajuste experimental de los datos fue realizado utilizando la ec. 3.5. Condiciones: $[\text{H}^+] = 0,25 \text{ M}$; $[\text{O}_2] = 1,26 \text{ mM}$, $[\text{Galur}] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{IV}}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Inserto: evolución en el tiempo de las mezclas $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Galur}$.

Para ambos sacáridos, se determinó que el aumento de la Abs_{290} sigue una cinética de primer orden con respecto a la $[\text{Cr}^{\text{IV}}]$ y $[\text{sacárido}]$. Los valores de constante de velocidad experimental, $k_{4\text{exp}}$ fueron *calculados por ajuste de los datos de absorbancia a 290 nm vs tiempo, empleando un 80 % de los datos experimentales, de acuerdo a la ec. 3.5.*

5.2.1. Sistema Cr^{IV}/GHL

Los valores de k_{4exp} para la reacción Cr^{VI}/GHL, (siendo el sustrato **GHL**, considerado un sacárido neutro) fueron *independientes* de la [H⁺] en el rango (0,1 – 0,6) M. Esta independencia de la velocidad de oxidación **GHL** con la [H⁺] resultó igual a la demostrada previamente para otros sustratos neutros presentados en esta tesis [95,112]. Cabe destacar que la oxidación de alcoholes por Cr^{IV} presenta la misma falta de dependencia con la acidez [39]. La Tabla 5.1 nos permite apreciar los valores de k_{4exp} para diferentes concentraciones de **GHL**.

Tabla 5.1. Valores observados de constantes de velocidad de pseudo-primer orden para la desaparición de Cr^{IV}_(ac), k_{4exp} a diferentes [GHL].^[a]

[GHL] (M)	$k_{4exp}^{[b]} / s^{-1}$
0,002	0,067 ± 0,0070
0,003	0,093 ± 0,010
0,004	0,12 ± 0,012
0,005	0,15 ± 0,015
0,006	0,17 ± 0,018

^[a] T = 15 °C; [Cr^{IV}] = 7,5 × 10⁻⁵ M; I = 1,0 M.

^[b] Valores obtenidos de múltiples determinaciones. Las constantes de velocidad, k_{4exp} , se obtuvieron empleando la ec. 3.5 y el programa Sigma Plot 8.0.

El gráfico de $k_{4\text{exp}}$ vs **[GHL]**, Figura 5.13, responde a una relación lineal sin ordenada al origen, ec. 5.6:

$$k_{4\text{exp}} = k_4 [\text{GHL}] \quad (5.6)$$

El valor de k_4 , la *constante bimolecular de velocidad*, se determinó a partir de la pendiente del gráfico $k_{4\text{exp}}$ vs **[GHL]**.

$$k_4 = 31,0 (\pm 3,1) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

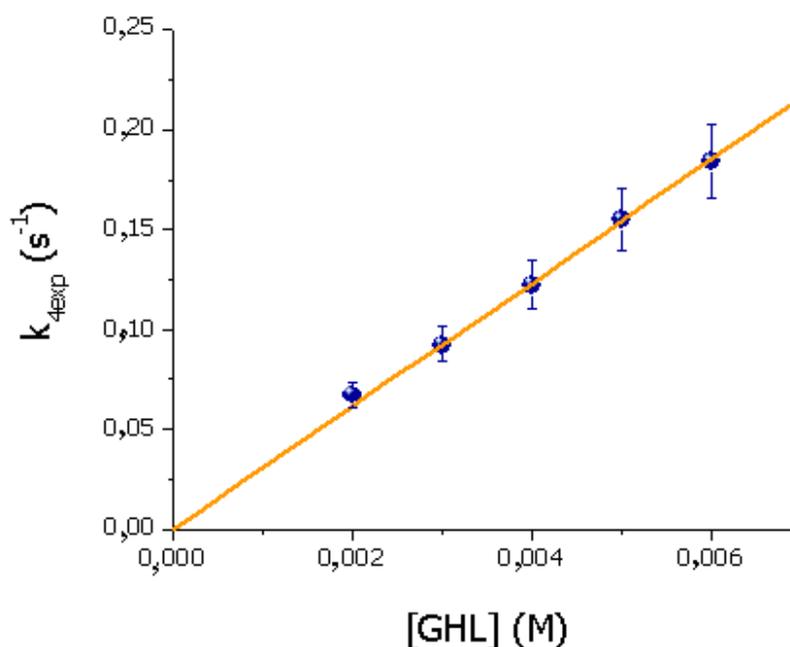


Figura 5.13. Efecto de la **[GHL]** sobre las constantes de velocidad de pseudo primer orden observadas para la desaparición de Cr^{IV} , $k_{4\text{exp}}$. Condiciones: $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0$, $[\text{H}^+] = (0,1 - 0,6) \text{ M}$.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos:

- a) independencia de la velocidad de la reacción Cr^{IV}/**GHL** con la [H⁺] para el rango de acidez estudiado, y
- b) la dependencia de k_{4exp} con la [**GHL**],

la *ley de velocidad experimental para la reacción redox Cr^{IV}/GHL*, queda expresada mediante la ec. 5.7:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \frac{d[\text{CrO}_2^{2+}]}{dt} = k_4 [\text{GHL}] [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (5.7)$$

5.2.2. Sistema Cr^{IV}/Galur

Galur es un sacárido ácido y para la reacción Cr^{IV}/**Galur**, el valor de k_{4exp} varía linealmente con la concentración de sacárido. Sin embargo, existe influencia de la acidez del medio, como se puede apreciar en la Figura 5.14. Al graficar k_{4exp} vs [**Galur**], a *diferente concentraciones* de [H⁺], se obtiene una familia de rectas con diferentes pendientes y sin ordenada al origen, ec. 5.8.

$$k_{4exp} = k_{4H} [\text{Galur}] \quad (5.8)$$

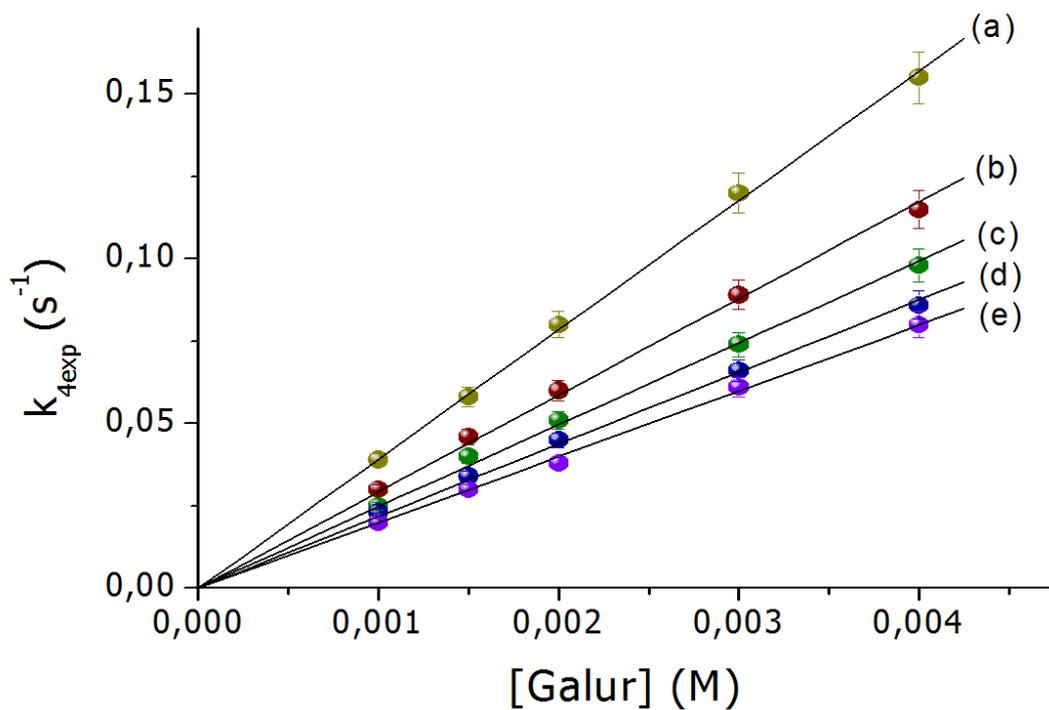


Figura 5.14. Efecto de la $[\text{Galur}]$ sobre $k_{4\text{exp}}$. Condiciones: $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 1,0$, $[\text{Cr}^{\text{IV}}] = 0,075\text{ mM}$ y $[\text{H}^+]$: (a) 0,10, (b) 0,15, (c) 0,20, (d) 0,25 y (e) 0,30 M.

A medida que aumenta la $[\text{H}^+]$, disminuyen los valores de las pendientes de cada una de las rectas, lo que indica claramente una inhibición de la velocidad de la reacción con la acidez del medio de reacción. Los valores de $k_{4\text{exp}}$ para cada $[\text{H}^+]$ y $[\text{Galur}]$ se detallan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Valores de constante de pseudo primer orden observados, k_{4exp} , para diferentes $[H^+]$ y $[Galur]$.^[a]

$[H^+]$ (M)	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
--					
$[Galur]$ (M)	$k_{4exp} \times 10^2$ ^[b] /s ⁻¹				
0,001	3,9 ± 0,20	3,0 ± 0,10	2,5 ± 0,12	2,3 ± 0,11	2,0 ± 0,10
0,0015	5,8 ± 0,30	4,6 ± 0,23	4,0 ± 0,20	3,4 ± 0,17	3,0 ± 0,15
0,002	8,0 ± 0,40	6,0 ± 0,30	5,1 ± 0,25	4,5 ± 0,22	3,8 ± 0,19
0,003	12 ± 0,60	8,9 ± 0,44	7,4 ± 0,37	6,6 ± 0,33	6,1 ± 0,30
0,004	15 ± 0,70	11 ± 0,55	9,8 ± 0,49	8,6 ± 0,43	8,0 ± 0,40

^[a]T = 15 °C; [Cr^{IV}] = 0,075 mM; I = 1,0 M.

^[b] Valores obtenidos de múltiples determinaciones. Las constantes de velocidad, k_{4exp} , se obtuvieron empleando la ec. 3.5 y el programa Sigma Plot 8.0.

Para cada $[H^+]$, se *calculó el valor de la constante de velocidad de desaparición de Cr^{IV}, k_{4H} , como la pendiente de cada recta obtenida al graficar k_{4exp} vs $[Galur]$* , Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Valores de constante de velocidad de desaparición de Cr^{IV}, k_{4H} , para las diferentes $[H^+]$.^[a]

$[H^+]$ (M)	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
$k_{4H} \times 10$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	3,86 ± 0,39	2,87 ± 0,29	2,48 ± 0,25	2,19 ± 0,22	1,99 ± 0,20

^[a]T = 15 °C, [Cr^{IV}] = 0,075 mM, I = 1,0 M.

En la Figura 5.15 podemos observar el comportamiento de k_{4H} frente a la $[H^+]$, para la reacción Cr^{IV}/Galur. Como se puede observar, la *constante bimolecular de velocidad*, k_4 , varía linealmente con la $[H^+]^{-1}$ con una ordenada positiva, k_4^I y una pendiente, k_4^{II} , Figura 5.15 y ec. 5.9.

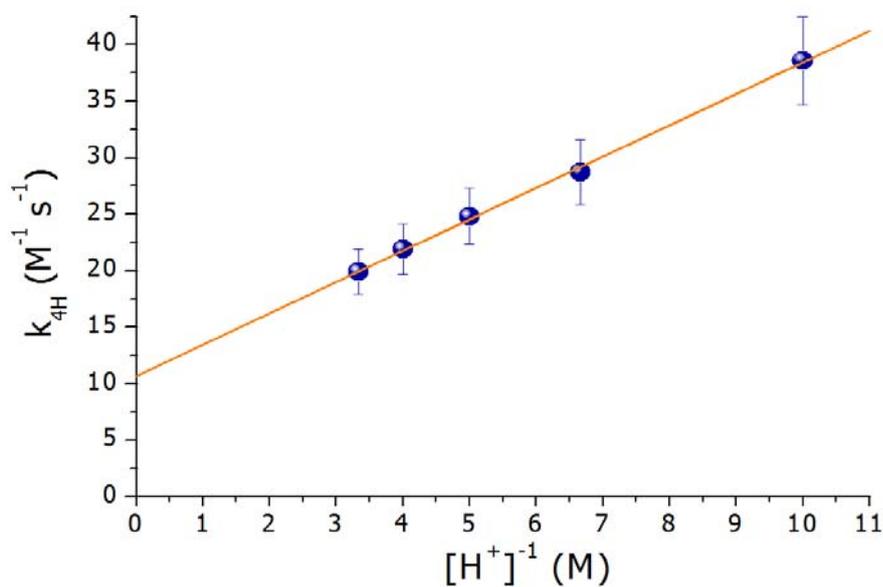


Figura 5.15. Dependencia lineal de k_{4H} con $[H^+]^{-1}$. Condiciones: $T = 15\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0$ y $[Cr^{IV}] = 0,075\text{ mM}$.

$$k_{4H} = k_4^I + k_4^{II} [H^+]^{-1} \quad (5.9)$$

Donde

$$k_4^I = 10,30 (\pm 0,50) M^{-1} s^{-1}$$

$$k_4^{II} = 2,90 (\pm 0,14) s^{-1}$$

Para obtener, el valor de k_4 independizada de **[Galur]** y $[H^+]$, se combinaron las ecuaciones 5.9 y 5.10, obteniéndose la ec. 5.11:

$$k_4 = k_{4H} [\text{Galur}] \quad (5.10)$$

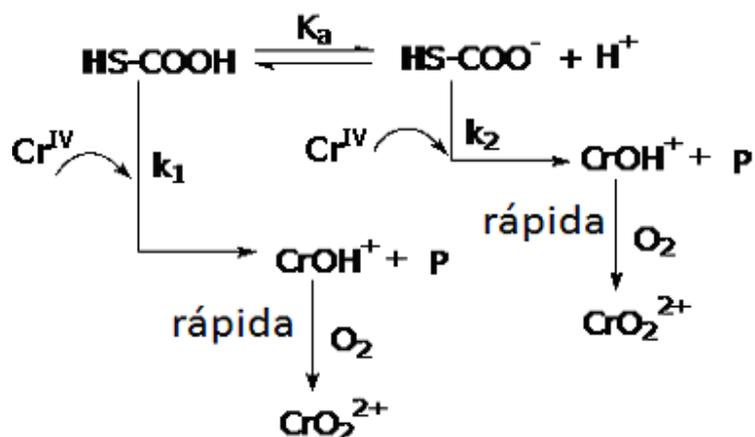
$$k_4 = (k_4^I + k_4^{II} [\text{H}^+]^{-1}) [\text{Galur}] \quad (5.11)$$

La *ley de velocidad experimental* para la desaparición de Cr^{IV}, la oxidación de sacáridos ácidos, se encuentra expresada en la ec. 5.12:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \frac{d[\text{CrO}_2^{2+}]}{dt} = (k_4^I + k_4^{II} [\text{H}^+]^{-1}) [\text{Galur}] [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (5.12)$$

La forma de la ley de velocidad experimental de la ec. 5.12 para la oxidación de **Galur** por Cr^{IV} tiene una forma similar que la encontrada para otros sustratos ácidos [96,112].

Al igual que para el estudio del sistema Cr^{IV}/ácido **D-glucónico**, detallado en la sección 3.4, la ley de velocidad para la oxidación de **Galur** por Cr^{IV} se dedujo aplicando el *equilibrio ácido-base* entre el ácido carboxílico y su base conjugada, Esquema 5.1.



Esquema 5.1. Mecanismo propuesto para la reacción de Cr^{IV} con ácido D-glucónico.

De acuerdo a este esquema, *hay dos especies capaces de reaccionar con el Cr^{IV} en pasos paralelos lentos, generando Cr^{II} y producto orgánico oxidado (**P**)*. Las constantes k_1 y k_2 del Esquema 5.1 representan, las constantes de velocidad para la oxidación del ácido carboxílico, HS-COOH (Galur) y su base conjugada, HS-COO⁻ (galacturonato), respectivamente. Teniendo en cuenta las dos etapas lentas paralelas se llega a la ec. 5.13:

$$k_4 = k_1 [\text{HS} - \text{COOH}] + k_2 [\text{HS} - \text{COO}^-] \quad (5.13)$$

Para obtener k_4 , se debe tener en cuenta la expresión de la constante de equilibrio, K_a , ec. 5.14,

$$K_a = \frac{[H^+][HS - COO^-]}{[HS - COOH]} \quad (5.14)$$

Considerando que en todo momento, la concentración total de sustrato se puede expresar según la ec. 5.15:

$$[HS - COOH]_T = [HS - COOH] + [HS - COO^-] \quad (5.15)$$

y realizando los correspondientes operaciones matemáticas, la ec. 5.13 se transforma en la ec. 5.16:

$$k_4 = \left[\frac{[H^+] k_1 + k_2 K_a}{[H^+] + K_a} \right] [HS - COOH] \quad (5.16)$$

Considerando que K_a es igual a $4,0 \times 10^{-4}$ [119], $[H^+] \gg K_a$, la ec. 5.16 se convierte en la ec. 5.17:

$$k_4 = (k_1 + k_2 K_a [H^+]^{-1}) [HS - COOH]_T \quad (5.17)$$

La *ley de velocidad para la desaparición de Cr^{IV}* toma la forma de la ec. 5.18, en concordancia con la *ley de velocidad experimental* para esta reacción, ec. 3.5, donde $k_1 = k_4^I$ y $(k_2 K_a) = k_4^{II}$.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \frac{d[\text{CrO}_2^{2+}]}{dt} = (k_1 + k_2 K_a [\text{H}^+]^{-1}) [\text{HS} - \text{COOH}]_T [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (5.18)$$

La ec. 5.18 corrobora que la velocidad de oxidación de sacáridos ácidos por Cr^{IV}, *es fuertemente inhibida al aumentar la [H⁺]* [38,62].

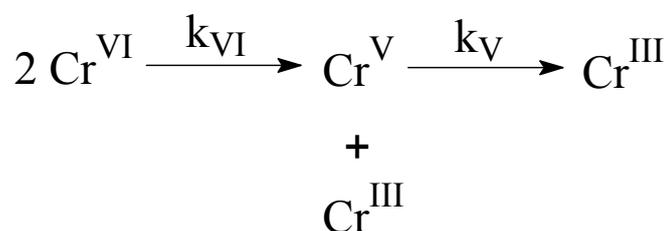
La obtención de las leyes de velocidad de oxidación de estos sacáridos por Cr^{IV} es de suma importancia a la hora de decidir si éste intermediario redox se encuentra *involucrado en etapas de reacción rápidas o lentas*. En este trabajo se determina la presencia del intermediario redox Cr^{IV} por espectrofotometría y se establece la ley de velocidad experimental de la reacción Cr^{IV}/sacárido. Estas leyes nos permiten *comparar las velocidades de reacción y decidir en base a resultados cinéticos, la participación o no del Cr^{IV} en etapas determinantes del proceso global de oxidación Cr^{VI}/sacárido*.

5.3. Estudio de la reacción global de oxidación

Cr^{VI}/sacárido

5.3.1. Estudio de la reacción de oxidación Cr^{VI}/GHL

Como se mencionó previamente en la sección 4.2.1, los espectros de las mezclas de reacción Cr^{VI}/GHL en medio HClO_{4(ac)}, muestran una banda de absorbancia a 350 nm y un hombro a 420 - 500 nm, característicos de la especie Cr^{VI} en medio ácido. Los perfiles cinéticos obtenidos pudieron ser descritos apropiadamente por el set de reacciones consecutivas de primer orden que se muestra en la Esquema 5.2.



Esquema 5.2. Pasos lentos propuestos en la reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} en presencia de GHL.

Este esquema de reacción propone la *formación* de *especies* de Cr^V como intermediario del proceso. Debe destacarse que las especies de Cr^V absorben a 350 nm, valor de longitud de onda a la que absorbe el Cr^{VI}; siendo la $\lambda = 350 \text{ nm}$, la seleccionada para el seguimiento cinético de las reacciones de *oxidación crómica de sacáridos*. Cualquier valor de absorbancia a **350 nm** provendrá en parte de la absorbancia de la especie Cr^{VI} y en parte de la

absorbancia de la especie Cr^V. Por este motivo, la contribución del Cr^V debe ser tomada en cuenta al interpretar los decaimientos en los valores de absorbancia a 350 nm, especialmente cuando las velocidades de decaimiento de ambas especies, Cr^{VI} y Cr^V, son similares [66]. De esta manera, a cualquier tiempo durante la reacción redox, la absorbancia a 350 nm está dada por la ec. 5.19:

$$\text{Abs}_{350} = \varepsilon^{\text{VI}} [\text{Cr}^{\text{VI}}] + \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (5.19)$$

Combinando la ec. 5.19 con las expresiones de velocidad [111,134] derivadas del Esquema 5.2, (deducción de la ec. 5.20 ver Anexo 1), se obtiene la siguiente expresión:

$$\text{Abs}_{350} = \text{Abs}_0 e^{-2k_6 \text{exp} t} + k_6 \text{exp} \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{(e^{-k_5 \text{exp} t} - e^{-2k_6 \text{exp} t})}{2k_6 \text{exp} - k_5 \text{exp}} \quad (5.20)$$

En la ec. 5.20, ε^{V} se refiere al valor de absorptividad molar de la especie oxo-Cr^V-GHL a **350 nm**, cuyo valor es de $2,3 \pm (0,20) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (sección 2.3.7). $k_6 \text{exp}$ y $k_5 \text{exp}$ son las *constantes de velocidad de desaparición de Cr^{VI} y Cr^V*, respectivamente, y fueron evaluadas usando un ajuste no lineal empleando la ec. 5.20. Debe destacarse que en la ec. 5.20, $k_6 \text{exp}$ aparece en

el numerador del término pre-exponencial y **2** k_{6exp} aparece en el denominador y en el término exponencial. Esto ocurre debido a que, de acuerdo a la reacción propuesta en el Esquema 5.2 solo la mitad del Cr^{VI} produce Cr^{III} a través de intermediarios de Cr^{V} .

Para la determinación del orden de reacción respecto de Cr^{VI} y Cr^{V} , las constantes de velocidad fueron calculadas para varias $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0$ a valores de temperatura, **[GHL]**, $[\text{H}^+]$ e I constantes. Los valores de k_{6exp} y k_{5exp} obtenidos permanecen constantes al variar la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0$.

Las constantes de velocidad, k_{6exp} y k_{5exp} , calculadas para varias **[GHL]** a $[\text{H}^+]$ fija se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Valores de constante de pseudo – primer - orden para la desaparición de Cr^{VI} y Cr^V (k_{6exp} y k_{5exp}) a diferentes $[H^+]$ y $[GHL]$. ^[a]

[GHL] (M)	0,036	0,060	0,084	0,12	0,15
[H⁺] (M)	$10^3 \times k_{6exp}^{[b]} / s^{-1}$				
0,20	0,061 ± 0,060	0,094 ± 0,010	0,12 ± 0,010	0,17 ± 0,017	0,24 ± 0,024
0,40	0,26 ± 0,026	0,41 ± 0,041	0,54 ± 0,054	0,83 ± 0,083	1,1 ± 0,11
0,60	0,51 ± 0,051	1,0 ± 0,10	1,3 ± 0,13	1,7 ± 0,017	2,1 ± 0,21
0,80	0,97 ± 0,097	1,7 ± 0,17	2,2 ± 0,22	3,1 ± 0,31	3,6 ± 0,36
1,00	1,6 ± 0,16	2,4 ± 0,24	3,6 ± 0,36	5,0 ± 0,5	5,9 ± 0,59
[H⁺] (M)	0,036	0,060	0,084	0,12	0,15
	$10^3 \times k_{5exp}^{[b]} / s^{-1}$				
0,20	0,25 ± 0,025	0,31 ± 0,031	0,39 ± 0,039	0,50 ± 0,050	0,60 ± 0,060
0,40	0,36 ± 0,036	0,49 ± 0,049	0,58 ± 0,058	0,72 ± 0,072	0,87 ± 0,087
0,60	0,52 ± 0,052	0,75 ± 0,075	0,96 ± 0,096	1,2 ± 0,12	1,5 ± 0,15
0,80	0,70 ± 0,070	1,0 ± 0,10	1,4 ± 0,14	1,9 ± 0,19	2,2 ± 0,22
1,00	0,90 ± 0,090	1,4 ± 0,14	1,8 ± 0,18	2,5 ± 0,25	3,1 ± 0,31

^[a] Condiciones: T = 33 °C, $[Cr^{VI}] = 6,0 \times 10^{-4}$ M, I = 1,0 M.

^[b] valores obtenidos de múltiples determinaciones. Las constantes de velocidad fueron obtenidas empleando la ec. 5.20, y el programa Sigma Plot 8.0.

En el rango de $[H^+]$ empleado en este trabajo, la gráfica de k_{6exp} vs $[GHL]$ dio lugar a una familia de rectas, sin ordenada al origen, cuyas pendientes

aumentaron con el incremento de la $[H^+]$. A partir de las pendientes de estas rectas se determinaron los valores de k_{6H} , Figura 5.16 y ec. 5.21.

$$k_{6\text{exp}} = k_{6H} [\text{GHL}] \quad (5.21)$$

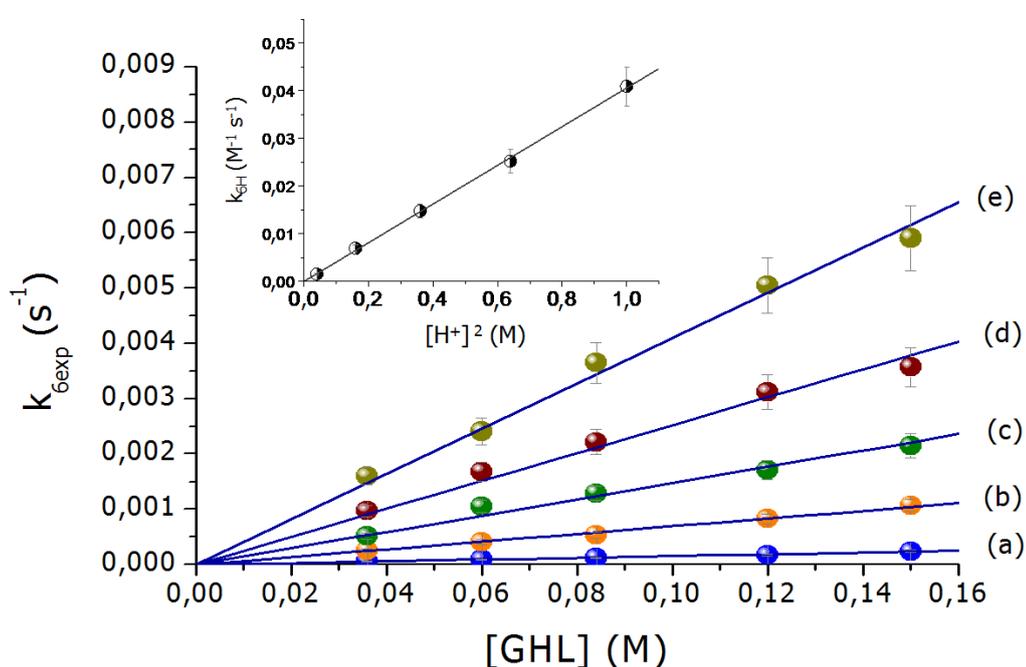


Figura 5.16. Efecto de la $[\text{GHL}]$ sobre las constantes de velocidad de pseudo primer orden observadas para la desaparición de Cr^{VI}, $k_{6\text{exp}}$. Condiciones: $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0$ y $[H^+]$ (a) 0,20, (b) 0,40, (c) 0,60, (d) 0,80, (e) 1,0 M. Inserto: dependencia de k_{6H} con $[H^+]$.

La constante, k_{6H} , presenta una dependencia de segundo orden con la $[H^+]$ dada por la ec. 5.22, sin ordenada al origen, inserto Figura 5.16.

$$k_{6H} = k_6 [H^+]^2 \quad (5.22)$$

Entonces, $k_{6\text{exp}}$ resulta en la ec. 5.23:

$$k_{6\text{exp}} = k_6 [\text{H}^+]^2 [\text{GHL}] \quad (5.23)$$

donde

$$k_6 = 0,040 (\pm 0,04) \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La ley de velocidad experimental queda expresada por la ec. 5.24:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_6 [\text{H}^+]^2 [\text{GHL}] [\text{Cr}^{\text{VI}}]_t \quad (5.24)$$

A $[\text{H}^+]$ constante, los gráficos de $k_{5\text{exp}}$ vs $[\text{GHL}]$ mostraron una dependencia lineal con la $[\text{GHL}]$, con un valor positivo de ordenada al origen, ec. 5.25 y Figura 5.17, de la cual se pudo calcular la *constante bimolecular de velocidad*, k_{5H} .

$$k_{5\text{exp}} = k_{5H}^{\text{I}} + k_{5H}^{\text{II}} [\text{GHL}] \quad (5.25)$$

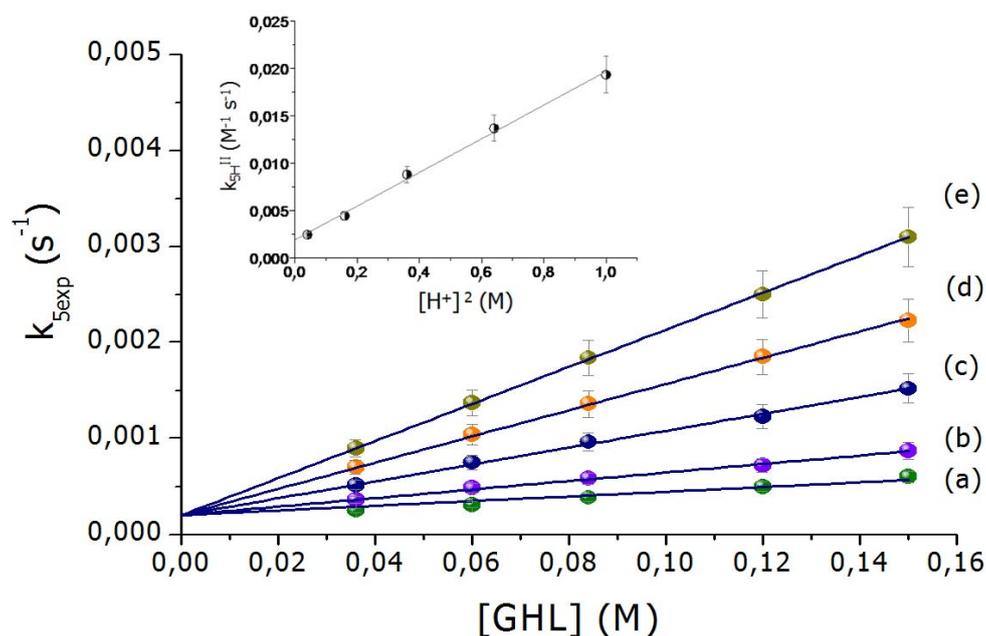


Figura 5.17. Efecto de la [GHL] sobre las constantes de velocidad de pseudo primer orden observadas para la desaparición de Cr^{V} , $k_{5\text{exp}}$. Condiciones: $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 1,0$ y $[\text{H}^+]$ (a) 0,20, (b) 0,40, (c) 0,60, (d) 0,80, (e) 1,0 M. Inserto: dependencia de $k_{5\text{H}^{\text{II}}}$ con $[\text{H}^+]$.

Como se puede observar en la Figura 5.17, para cada concentración de protones se obtienen rectas con la misma ordenada al origen pero sus pendientes aumentan con el aumento de la acidez. A partir de las pendientes de cada recta se obtienen los valores de $k_{5\text{H}}$. Las gráficas de $k_{5\text{H}}$ vs $[\text{H}^+]$ permiten observar una *dependencia cuadrática* con una *ordenada positiva*, ec. 5.26 e inserto Figura 5.17.

$$k_{5\text{H}} = k_5^{\text{I}} + k_5^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 \quad (5.26)$$

Reemplazando la ec. 5.26 en la ec. 5.25, se llega a la expresión dada por la ec. 5.27:

$$k_{5\text{exp}} = k_{5\text{H}}^{\text{I}} + \left(k_5^{\text{I}} + k_5^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 \right) [\text{GHL}] \quad (5.27)$$

$$k_{5\text{exp}} = k_{5\text{H}}^{\text{I}} + k_5^{\text{I}} [\text{GHL}] + k_5^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 [\text{GHL}]$$

donde

$$k_{5\text{H}}^{\text{I}} = 2,0 (\pm 0,2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_5^{\text{I}} = 1,9 (\pm 0,20) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_5^{\text{II}} = 1,8 (\pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La ley de velocidad experimental, queda expresada por la ec. 5.28:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \left(k_{5\text{H}}^{\text{I}} + \left(k_5^{\text{I}} + k_5^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 \right) [\text{GHL}] \right) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} \quad (5.28)$$

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \left(k_{5\text{H}}^{\text{I}} + k_5^{\text{I}} [\text{GHL}] + k_5^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 [\text{GHL}] \right) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}$$

Las constantes de velocidad para la desaparición de Cr^{VI} y Cr^V están dadas por las ec. 5.23 y 5.27 respectivamente.

Los valores de las constantes de velocidad k_{6exp} y k_{5exp} fueron obtenidos en forma independiente mediante espectroscopía RPE. La señal de RPE de las especies oxo- Cr^{V} -**GHL**, crece y decae a 20 °C, Figura 5.18. Esta señal fue monitoreada por RPE con *alta modulación de amplitud* (2,0 G) en las condiciones que se mencionan al pie de la Figura 5.18. Se obtuvieron señales de RPE con buenas relaciones intensidad/ruido utilizando $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ más elevadas que las empleadas en los estudios cinéticos. Por otra parte, *el valor alto modulación de amplitud empleada evita el desdoblamiento de la señal, lo que simplifica el cálculo del área o de la altura de la señal de RPE.*

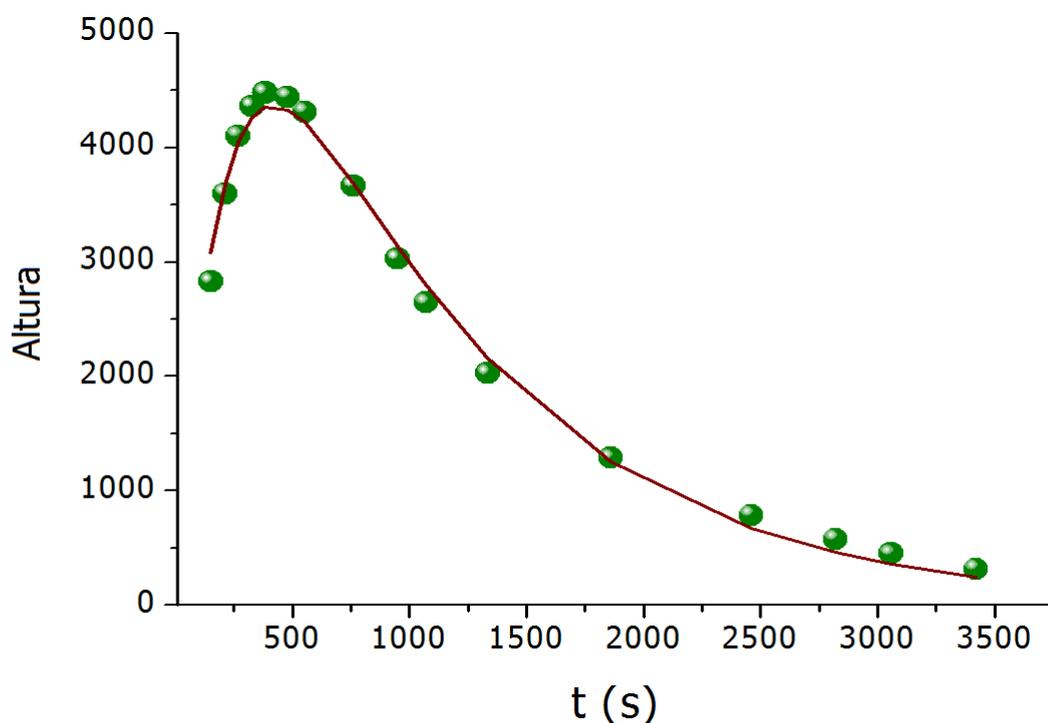


Figura 5.18. Gráfico alturas pico a pico de la señal de RPE para especies oxo- Cr^{V} -GHL vs tiempo para mezclas de reacción Cr^{VI} /GHL. Condiciones: $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{GHL}] = 0,51$

M, [H⁺] = 0,3 M, [Cr^{VI}] = 1,0 × 10⁻³ M, modulación de amplitud = 2,0 G. Los datos experimentales fueron ajustados utilizando la ec. 5.29.

Los datos de RPE fueron ajustados usando la ec. 5.29 derivada del Esquema 5.2 (deducción de la ec. 5.29 ver Anexo 1) para el Cr^V total presente en la mezcla de reacción a cualquier tiempo.

$$\text{Altura} = A k_6 \frac{(e^{-k_{5 \text{ exp}} t} - e^{-2k_{6 \text{ exp}} t})}{2k_{6 \text{ exp}} - k_{5 \text{ exp}}} \quad (5.29)$$

El valor de **A** depende de los parámetros utilizados para la adquisición de los datos de RPE: potencia aplicada, ganancia, modulación de amplitud y del instrumental utilizado.

Seguimiento de la cinética de la reacción redox a 570 nm

El espectro de absorción de las mezclas Cr^{VI}/**GHL** evidencia que la especie al finalizar la reacción redox no es al especie [Cr(H₂O)₆]³⁺_(ac). Todas las mezclas presentan bandas a 408 nm ($\epsilon = 18,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 574 nm ($\epsilon = 15,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con intensidades mayores a las del a [Cr(OH₂)₆]³⁺_(ac).

Además, los datos cinéticos obtenidos a 570 nm, Figura 5.19, indican que la absorbancia crece a intensidades mayores a las esperadas para la especie [Cr(OH₂)₆]³⁺. Este alto valor de absorbancia decae en un tiempo muy corto. Los altos valores de absorbancia a 570 nm pueden deberse a la presencia de

especies de Cr^V (dado que presentan una banda débil de transición electrónica del tipo *d-d* a dicho valor de longitud de onda) y/o a intermediarios de Cr^{III}-**GHL** que luego hidrolizan al producto final, [Cr(OH₂)₆]³⁺_(ac).

Los datos de absorbancia vs tiempo, a 570 nm, Figura 5.19, pudieron ser adecuadamente ajustados *considerando la presencia de intermediarios Cr^V, además de especies Cr^{III}-sacárido*. De esta forma, la *absorbancia total* a **570 nm** a cualquier tiempo está dada por la ec. 5.30:

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{V}}] + \varepsilon^{\text{III}} [\text{Cr}^{\text{III}}] \quad (5.30)$$

Combinando la ec. 5.30 con la expresión de velocidad derivada del Esquema 5.2, para las [Cr^{III}] y [Cr^V] presentes en la mezcla de reacción, se obtiene la ec. 5.31 (deducción ec. 5.31 ver Anexo 1):

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{III}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \left[1 - e^{-2k_6 \text{exp} t} + (\varepsilon^{\text{V}} - \varepsilon^{\text{III}}) k_{6 \text{exp}} \frac{(e^{-2k_6 \text{exp} t} - e^{-k_5 \text{exp} t})}{k_{5 \text{exp}} - 2k_{6 \text{exp}}} \right] \quad (5.31)$$

Un buen ajuste de los datos experimentales se obtuvo empleando la ec. 5.31 con $\varepsilon^{\text{V}} = 62 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\varepsilon^{\text{III}} = 15,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Figura 5.19. Los valores de ε^{V} y ε^{III} empleados fueron razonables para los complejos oxo-Cr^V-sacárido y Cr^{III}-

sacárido a **570 nm**, respectivamente. Se obtuvieron los mismos valores de k_{5exp} y k_{6exp} cuando se emplearon las ecuaciones 5.23, 5.27 o 5.31. Estos resultados indican que las *especies intermediarias de Cr^{V} podrían ser responsables del crecimiento y decaimiento de la absorbancia a 570 nm a tiempos cortos*, posteriormente, las especies de Cr^{III} -sacáridos se descomponen lentamente a $[\text{Cr}(\text{OH}_2)_6]^{3+}_{(\text{ac})}$, con el consiguiente desplazamiento de las bandas de absorción a valores de longitud de onda de 574 y 410 nm, según se indicó anteriormente, al comienzo del presente capítulo.

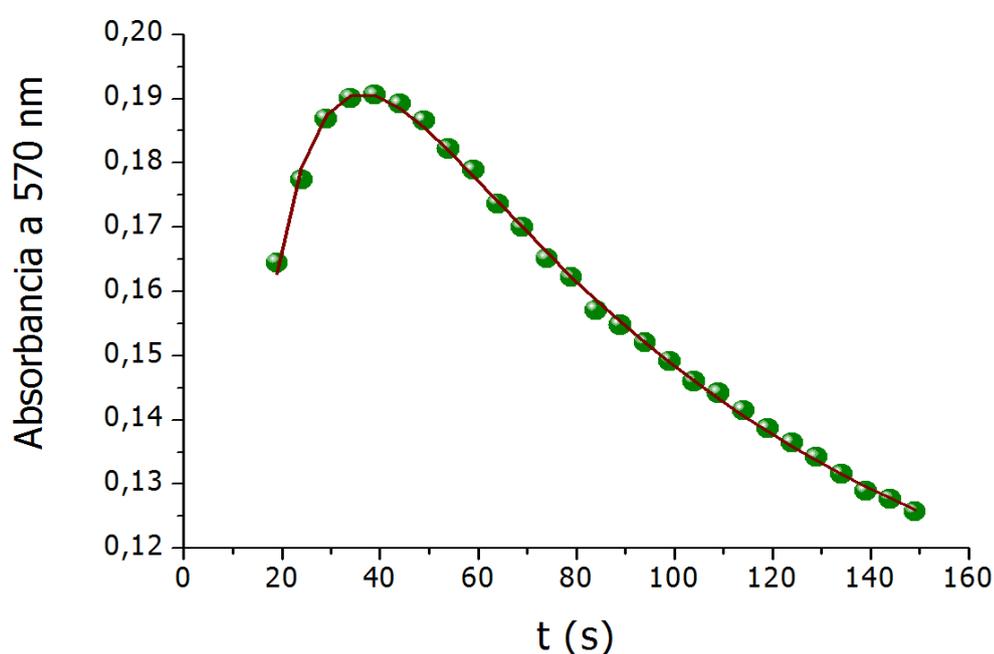


Figura 5.19. Curvas de absorbancia experimental vs tiempo para la reacción Cr^{VI} /GHL a 570 nm. Los datos experimentales fueron ajustados con la ec. 5.31. Condiciones: $[\text{GHL}] = 1,4 \text{ M}$, $[\text{HClO}_4] = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 6,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $I = 1,0$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bajo las condiciones cinéticas de medición ($[\text{GHL}] \gg [\text{Cr}^{\text{VI}}]$), solo se identificaron por HPLC como productos de reacción, ácido D-glucónico y ácido fórmico. Las técnicas de espectroscopia RPE y UV-vis indicaron que el Cr^{III} era la especie final de la reacción de oxido – reducción, en la mezcla de reacción.

5.3.2. Estudio de la reacción de oxidación Cr^{VI} /Galur

La evolución en el tiempo de la absorbancia a 350 nm de las mezclas Cr^{VI} /Galur descrita en la sección 5.2.1, exhibió una disminución de la absorbancia que no pudo describirse por medio de un decaimiento exponencial simple. Estos perfiles cinéticos fueron apropiadamente descritos mediante la serie de reacciones de primer orden consecutivas del Esquema 5.2, en la que se propone la formación de Cr^{V} como intermediario del proceso redox.

De esta manera, para el análisis de los datos de absorbancia de la mezclas de reacción Cr^{VI} /Galur, a **350** nm, se debe tener en cuenta la contribución de las especies de Cr^{V} y de Cr^{VI} . Debido a esto, en cualquier momento de la reacción redox, los valores de absorbancia a **350** nm obtenidos, están dados por la ec. 5.32.

$$\text{Abs}_{350} = \varepsilon^{\text{VI}} [\text{Cr}^{\text{VI}}] + \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (5.32)$$

Combinando la ec. 5.32 con la ley de velocidad derivada de las reacciones de primer orden consecutivas [136] del Esquema 5.2 (ver deducción de ec. 5.3 Anexo 1), se llega a la misma expresión matemática obtenida en la ec. 5.33.

$$\text{Abs}_{350} = \text{Abs}_0 e^{-2k_{6\text{exp}} t} + k_{6\text{exp}} \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{(e^{-k_{5\text{exp}} t} - e^{-2k_{6\text{exp}} t})}{2k_{6\text{exp}} - k_{5\text{exp}}} \quad (5.33)$$

Nuevamente, $k_{6\text{exp}}$ y $k_{5\text{exp}}$ se refieren a las constantes de velocidad de desaparición de Cr^{VI} y Cr^V, respectivamente, mientras que ε^{V} refiere a la absorptividad molar del complejo oxo-Cr^V-Galur a 350 nm ($\varepsilon^{\text{V}} = 2,3 (\pm 0,23) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Este valor fue determinado por espectroscopia UV-vis (sección 2.3.10) de la reacción de intercambio de ligandos entre $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]^-$ con un exceso de **Galur**, como se detalla en la sección 2.3.10. La formación del complejo Cr^V-**Galur** fue confirmada por espectroscopia RPE.

Las constantes de velocidad $k_{5\text{exp}}$ y $k_{6\text{exp}}$ fueron evaluados a partir del ajuste de los datos experimentales, empleando la ec 5.33.

La Tabla 5.5 muestra los valores de $k_{6\text{exp}}$ y $k_{5\text{exp}}$ obtenidos para varias concentraciones de **Galur** en HClO_{4(ac)}.

Tabla 5.5. Valores observados para las constantes de velocidad de pseudo primer orden (k_{6exp} y k_{5exp}) para diferentes $[H^+]$ y $[Galur]$ ^[a]

$[H^+]$ (M)	0,20	0,40	0,63	0,80	0,97
$[Galur] \times 10$ (M)			10^3 $k_{6exp}(s^{-1})^{[b]}$		
0,48	$0,092 \pm 0,010$	$0,20 \pm 0,020$	$0,52 \pm 0,050$	$1,0 \pm 0,10$	$1,6 \pm 0,20$
0,96	$0,18 \pm 0,020$	$0,47 \pm 0,050$	$1,1 \pm 0,10$	$2,3 \pm 0,20$	$3,4 \pm 0,30$
1,44	$0,27 \pm 0,030$	$0,78 \pm 0,080$	$1,9 \pm 0,20$	$3,6 \pm 0,40$	$5,4 \pm 0,50$
1,92	$0,40 \pm 0,040$	$1,0 \pm 0,10$	$2,6 \pm 0,30$	$4,6 \pm 0,50$	$7,1 \pm 0,70$
2,40	$0,50 \pm 0,050$	$1,2 \pm 0,10$	$3,1 \pm 0,30$	$5,8 \pm 0,60$	$8,7 \pm 0,90$
3,00	$0,54 \pm 0,050$	$1,5 \pm 0,10$	$4,0 \pm 0,40$	$7,0 \pm 0,70$	$10 \pm 1,0$
3,60	-	-	-	$8,4 \pm 0,80$	$12 \pm 1,0$
			10^3 $k_{5exp}(s^{-1})^{[b]}$		
0,48	$0,26 \pm 0,030$	$0,39 \pm 0,040$	$0,55 \pm 0,060$	$0,77 \pm 0,080$	$0,95 \pm 0,010$
0,96	$0,52 \pm 0,050$	$0,73 \pm 0,070$	$1,1 \pm 0,10$	$1,5 \pm 0,10$	$1,8 \pm 0,20$
1,44	$0,74 \pm 0,070$	$1,1 \pm 0,10$	$1,6 \pm 0,20$	$2,3 \pm 0,20$	$2,8 \pm 0,30$
1,92	$0,94 \pm 0,090$	$1,4 \pm 0,20$	$2,0 \pm 0,20$	$3,0 \pm 0,30$	$3,6 \pm 0,30$
2,40	$1,1 \pm 0,10$	$1,7 \pm 0,20$	$2,6 \pm 0,30$	$3,6 \pm 0,40$	$4,5 \pm 0,40$
3,00	$1,4 \pm 0,20$	$2,2 \pm 0,20$	$3,2 \pm 0,30$	$4,5 \pm 0,50$	$5,8 \pm 0,60$
3,60	-	-	-	$5,4 \pm 0,50$	$7,0 \pm 0,70$

^[a] T = 33 °C, $[Cr^{VI}] = 0,6$ mM, I = 1,0 M.

^[b] valores obtenidos de múltiples determinaciones. Las constantes de velocidad fueron obtenidas usando la ec. 5.33, y el programa Sigma Plot 8.0.

A partir de la Figura 5.20 se puede apreciar una relación lineal de $k_{6\text{exp}}$ con la $[\text{Galur}]$. Al aumentar la $[\text{H}^+]$ se aprecia un aumento del valor de $k_{6\text{exp}}$ como lo reflejan el aumento de las pendientes de las rectas de la Figura 5.20. Las constantes de velocidad independizadas de la $[\text{Galur}]$, $k_{6\text{H}}$ se obtienen a partir de las pendientes de la recta del *inserto* de la Figura 5.20.

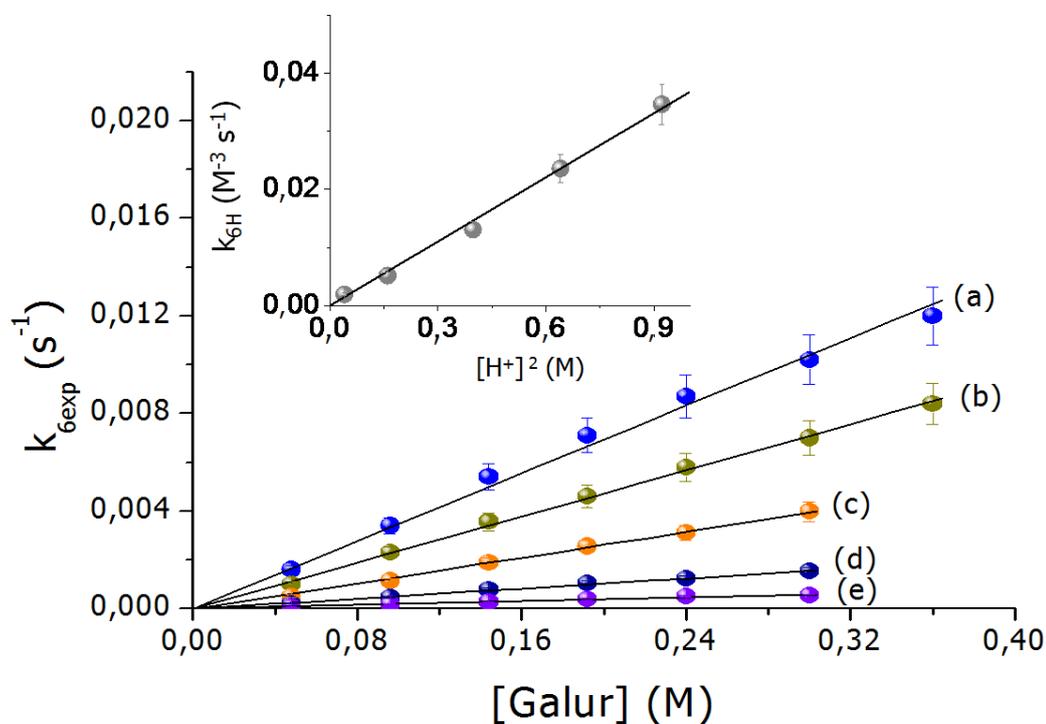


Figura 5.20. Efecto de la $[\text{Galur}]$ sobre $k_{6\text{exp}}$. Condiciones: $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 1,0\text{ M}$ y $[\text{H}^+]$: (a) 0,97, (b) 0,80, (c) 0,63, (d) 0,40 y (e) 0,20 M. Inserto: Dependencia cuadrática de $k_{6\text{H}}$ con $[\text{H}^+]$.

En el rango de $[\text{H}^+]$ empleado en este trabajo, $k_{6\text{exp}}$ depende linealmente con la $[\text{Galur}]$ (Figura 5.20). A partir de las pendientes de las rectas se pudieron

determinar las constantes de velocidad independizadas de la [Galur], k_{6H} , de esta manera k_{6exp} queda expresada como la ec. 5.34.

$$k_{6exp} = k_{6H} [\text{Galur}] \quad (5.34)$$

La constante bimolecular de velocidad, k_{6H} , depende cuadráticamente de la $[\text{H}^+]$, como se muestra en el inserto de la Figura 5.20, y queda expresada en la ec. 5.35:

$$k_{6H} = k_6 [\text{H}^+]^2 \quad (5.35)$$

La combinación de las ec. 5.34 y 5.35 permiten la determinación de k_{6exp} a través de la ec. 5.36:

$$k_{6exp} = k_6 [\text{H}^+]^2 [\text{Galur}] \quad (5.36)$$

El valor de k_6 fue determinado como la pendiente de la recta mostrada en el inserto de la Figura 5.20.

$$k_6 = 0,0368 \pm 0,40 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La Ley de velocidad experimental, queda expresada a través de la ec. 5.37:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_6 [\text{H}^+]^2 [\text{Galur}] [\text{Cr}^{\text{VI}}] \quad (5.37)$$

A $[\text{H}^+]$ constante, los gráficos de $k_{5\text{exp}}$ vs [**Galur**] presenta una dependencia lineal, Figura 5.21, de la cual puede derivarse la *constante bimolecular de velocidad*, $k_{5\text{H}}^{\text{II}}$, ec 5.38:

$$k_{5\text{exp}} = k_{5\text{H}} [\text{Galur}] \quad (5.38)$$

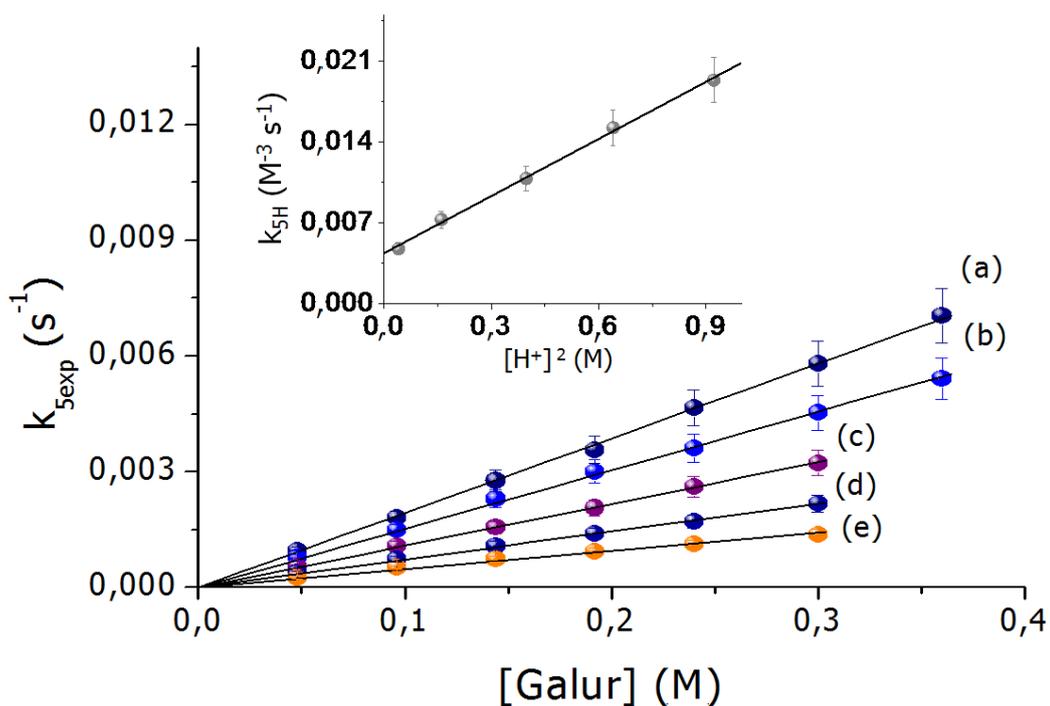


Figura 5.21. Efecto de la [Galur] sobre $k_{5\text{exp}}$. Condiciones: $T = 33\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0\text{ M}$ y $[H^+] =$ (a) 0,97, (b) 0,80, (c) 0,63, (d) 0,40 y (e) 0,20 M. Inserto: Dependencia cuadrática de $k_{5\text{H}}$ con $[H^+]$.

Una gráfica de $k_{5\text{H}}$ vs $[H^+]$ revela una dependencia cuadrática, inserto Figura 5.21 y ec. 5.39:

$$k_{5\text{H}} = k_5^{\text{I}} + k_5^{\text{II}} [H^+]^2 \quad (5.39)$$

Combinando las ec. 5.38 y 5.39, se llega a la ec. 5.40:

$$k_5 = (k_5^I + k_5^{II} [H^+]^2) [\text{Galur}] \quad (5.40)$$

$$k_5 = k_5^I [\text{Galur}] + k_5^{II} [H^+]^2 [\text{Galur}]$$

donde

$$k_5^I = 0,0044 (\pm 0,4) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_5^{II} = 0,0165 (\pm 0,17) \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La ley de velocidad experimental puede ser expresada por la ec. 5.41:

$$-\frac{d[\text{Cr}^V]}{dt} = ((k_5^I + k_5^{II} [H^+]^2) [\text{Galur}]) [\text{Cr}^V] \quad (5.41)$$

$$-\frac{d[\text{Cr}^V]}{dt} = (k_5^I [\text{Galur}] + k_5^{II} [H^+]^2 [\text{Galur}]) [\text{Cr}^V]$$

Las constantes de velocidad k_{6exp} y k_{5exp} pueden también ser obtenidas en forma independiente, empleando espectroscopia RPE. Como se informó previamente [55], los derivados oxo-Cr^V-Galur exhiben una clara señal de RPE a temperatura ambiente, que consiste en una fuerte señal central a $g_{iso} = 1,9785$ flanqueada por cuatro señales débiles. Mientras que la señal central proviene de los complejos oxo-Cr^V-Galur debido al isótopo de ⁵²Cr^V con spin nuclear cero, el cuarteto se corresponde con las especies oxo-⁵³Cr^V-Galur ($I = 3/2$). La señal central muestra una subestructura debida a las interacciones

superhiperfinas de especies de complejos oxo-Cr^V-**Galur**, como se detalló en el capítulo 4.

Estudios de caracterización de Complejos oxo-Cr^V-sacáridos por RPE

La naturaleza de estos complejos individuales se trató en detalle en el Capítulo 4, *Estudios de caracterización de Complejos oxo-Cr^V-sacáridos por RPE*. En esta sección se determina la cinética de formación y decaimiento del conjunto de las especies oxo-Cr^V-**Galur**, monitoreando la evolución en el tiempo del área de la señal de RPE. El área de la señal de RPE de los complejos oxo-Cr^V-Galur de una mezcla Cr^{VI}/**Galur** mostró, un decrecimiento luego de un incremento inicial, Figura 5.22. La dependencia con el tiempo de la señal de RPE, se ajustó empleando la ec 5.42, derivada del Esquema 5.2.

$$\text{Área} = A k_{6\text{exp}} \frac{(e^{-k_{5\text{exp}} t} - e^{-2k_{6\text{exp}} t})}{2k_{6\text{exp}} - k_{5\text{exp}}} \quad (5.42)$$

El parámetro **A** *depende* de la *potencia*, la *ganancia* y la *modulación de amplitud* del instrumental utilizado.

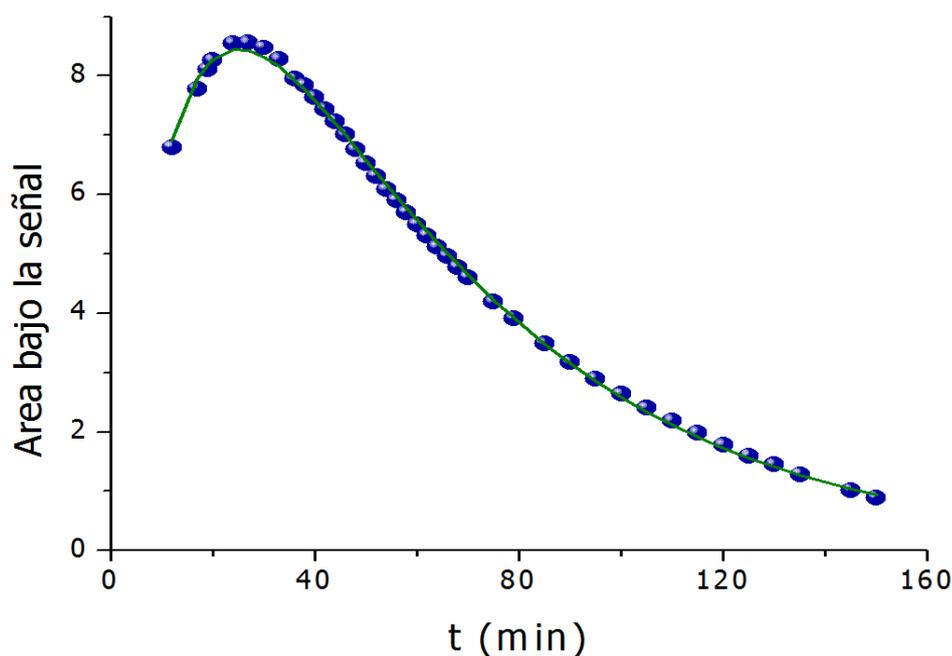


Figura 5.22. Área de la señal de RPE vs tiempo para la oxidación de Galur por Cr^{VI} . Condiciones: $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 0,047 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Galur}] = 0,973 \text{ M}$, $[\text{H}^+] = 0,10 \text{ M}$. Los espectros RPE fueron obtenidos con una modulación de amplitud de $2,0 \text{ G}$.

Los valores de k_{5exp} y k_{6exp} obtenidos por RPE están de acuerdo con aquellos valores obtenidos a partir de los datos cinéticos de absorción UV-vis, teniendo en cuenta el error experimental y la diferencia en la temperatura (valores de las constantes: $k_{6exp} = 1,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{5exp} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). *Estos resultados apoyan el conjunto de reacciones consecutivas de primer orden propuesto en el Esquema 5.2. El Cr^{IV} está involucrado en un paso rápido y solo se acumula Cr^{V} en las mezclas Cr^{VI} /Galur.*

En los estudios cinéticos basados en los cambios de la absorbancia a 570 nm con el tiempo, hemos considerado que, además de los complejo oxo- Cr^{V} -

Galur, también absorben a esta longitud de onda, las especies de Cr^{III}-**Galur**. De acuerdo con los resultados mencionados en la sección 5.2.2, el Cr^{IV} *no se acumula*, por lo que no puede contribuir a la absorción a 570 nm. En la Figura 5.23 se muestran los cambios de absorbancia calculados a 570 nm utilizando la ec. 5.44.

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{V}}[\text{Cr}^{\text{V}}] + \varepsilon^{\text{III}}[\text{Cr}^{\text{III}}] \quad (5.43)$$

Combinando la ec. 5.43 con la expresión de velocidad derivada del Esquema 5.2 para las [Cr^{III}] y [Cr^V] presentes en la mezcla, se llega a la siguiente expresión de la Abs₅₇₀, ec. 5.44 (deducción ec. 5.44 Anexo 1):

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{III}}[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \left[1 - e^{-2k_6 \text{exp} t} + (\varepsilon^{\text{V}} - \varepsilon^{\text{III}}) k_6 \text{exp} \frac{(e^{-2k_6 \text{exp} t} - e^{-k_5 \text{exp} t})}{k_5 \text{exp} - 2k_6 \text{exp}} \right] \quad (5.44)$$

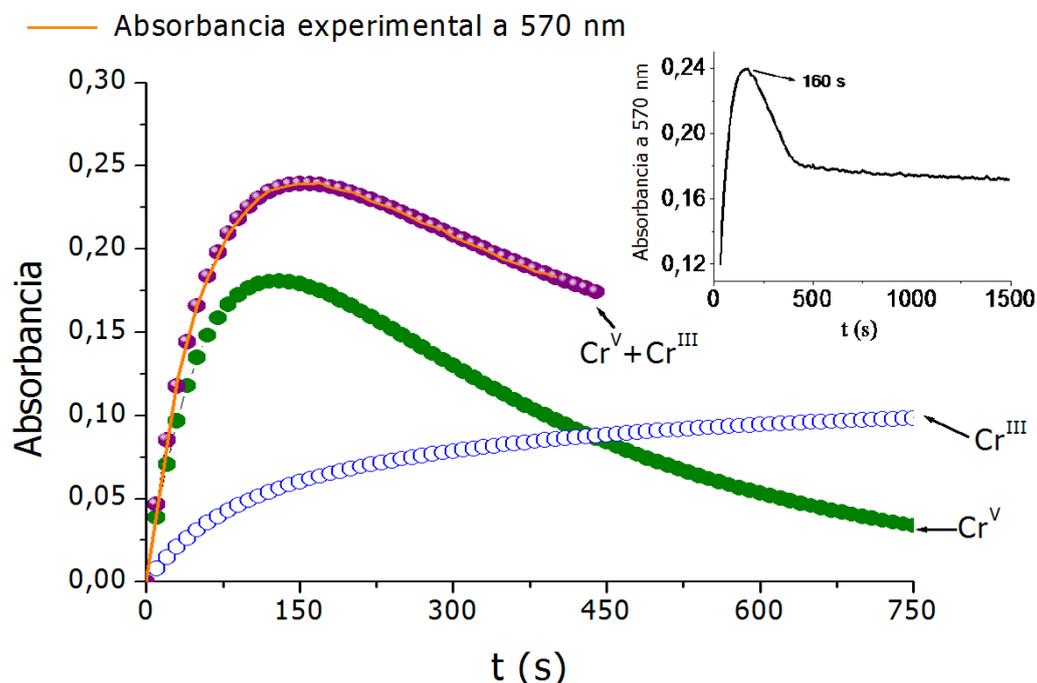


Figura 5.23. Cambios (calculados y experimentales) de la absorbancia en el tiempo a 570 nm de la reacción Cr^{VI} /Galur. Absorbancias experimentales: Línea negra sólida (inserto) y línea sólida naranja. Absorbancias calculadas: verde, Cr^{V} -Galur; azul, Cr^{III} -Galur; violeta, Cr^{V} -Galur + Cr^{III} -Galur. Condiciones: $[\text{H}^+] = 0,50 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Galur}] = 0,70 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 6,0 \text{ mM}$. Los perfiles cinéticos se calcularon usando la ec. 5.44, $k_5 = 4,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_6 = 7,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-3}$, $\epsilon^{\text{V}} = 89 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon^{\text{III}} = 17,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En la Figura 5.23, la absorbancia crece rápidamente a valores más altos que los esperados para la especie Cr^{III} en una primera etapa (\sim durante los primeros 150 segundos), lo que podría estar relacionado con la presencia de complejos oxo- Cr^{V} -Galur y/o Cr^{III} -Galur. El decaimiento posterior de la absorbancia, nos permite apreciar una fase rápida y una fase lenta (línea continua de color negro, inserto de la Figura 5.23). En los primeros 400 segundos luego de alcanzar el máximo, el decaimiento rápido probablemente

corresponde a la desaparición de especies oxo-Cr^V-**Galur**. La porción de decaimiento lento (500 - 1500 s, inserto Figura 5.23), dominante a tiempos más largos, podría corresponder a la lenta hidrólisis de complejos de Cr^{III}-ligando.

En la Figura 5.23, las absorbancias a 570 nm para las especies Cr^V-Galur y Cr^{III}-Galur fueron calculadas utilizando la ec. 5.43 como se indica al pie de la misma. Los valores de $\epsilon^V = 89 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon^{III} = 17,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ utilizados en los cálculos son razonables para complejos de Cr^V y Cr^{III} con sacáridos [66,91,111]. Los perfiles cinéticos calculados muestran que el tiempo de máxima intensidad (t_{max}) de la Abs₅₇₀ es muy cercano al tiempo calculado (**130 seg**) para alcanzar la máxima [Cr^V] en la mezcla de reacción (más de **34 %** del Cr total en la solución) (Figura 5.23).

Estos resultados nos permiten concluir, que las especies intermediarias de oxo-Cr^V-**Galur** deben ser responsables por el incremento y decaimiento de la absorbancia a 570 nm en el rango de tiempo muy corto. Luego, las especies de Cr^{III}-**Galur** resultantes se descomponen lentamente en la especie [Cr(H₂O)₆]³⁺_(ac).

5.3.3. Estudio de la reacción de oxidación Cr^{VI}/Glucar

Como se indicó en la sección 5.1.1, la reacción del sustrato **Glucar** con Cr^{VI} en medio ácido muestra, al comienzo de la reacción, una banda de

absorbancia a 350 nm y un hombro a 420 - 500 nm, característicos del Cr^{VI} en medio ácido. Al transcurrir el tiempo se observó la disminución de la banda a 350 nm y la aparición de dos nuevas a 400 y 540 nm relacionadas con especies Cr^{III} -**Glucar**. La relación Cr^{VI} / Glucar utilizada para observar la evolución en el tiempo de esta mezcla de reacción fue de 1/20, máxima relación posible de ser utilizada en el presente estudio cinético debido a la baja solubilidad de este sacárido.

Para determinar la influencia de la concentración de **Glucar** sobre la velocidad de oxidación es necesario aumentar la concentración de **Glucar**. Las *limitaciones* impuestas por la *baja solubilidad* del *sustrato* (sección 2.3.4.3.2) hace que la cinética de oxidación por Cr^{VI} de este sustrato no pueda ser estudiada utilizando la misma metodología empleada en los estudios cinéticos de Cr^{VI} /**GHL** y Cr^{VI} /**Galur**; por más que se disminuya la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$,. En la sección 2.3.4.3.2 se detalló el método utilizado para los estudios cinéticos de la reacción Cr^{VI} /**Glucar**.

La Figura 5.24 muestra el decaimiento de la concentración de Cr^{VI} para diferentes concentraciones de **Glucar** para una dada $[\text{H}^+]$. Para todas las concentraciones de protones utilizadas, los perfiles cinéticos se corresponden con un decaimiento exponencial. Los datos experimentales podrían ser ajustados, en principio, utilizando una ecuación exponencial simple.

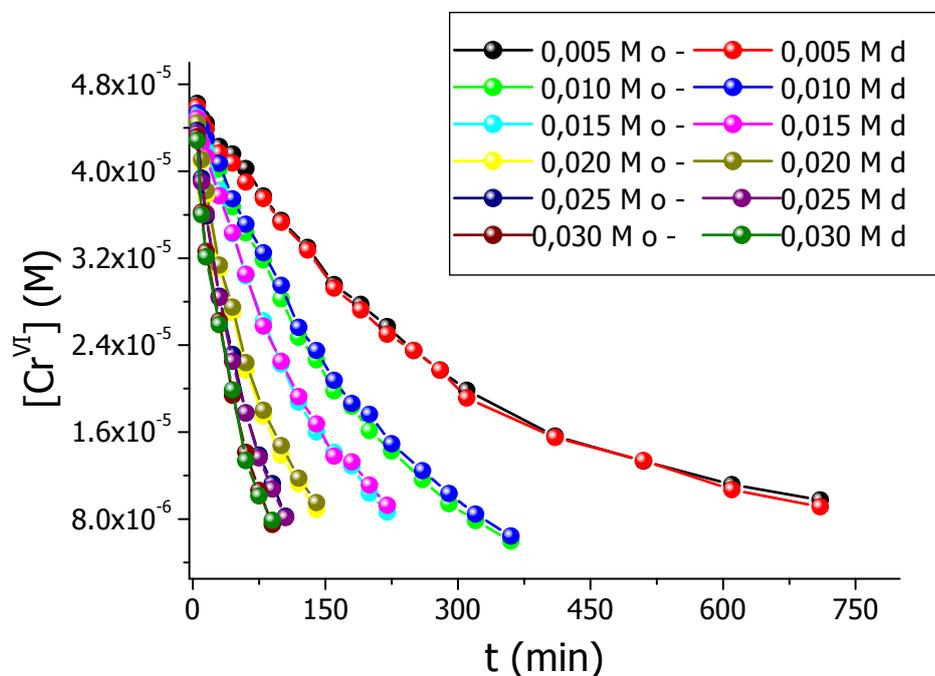


Figura 5.24. Perfiles cinéticos de mezclas de reacción Cr^{VI} /Glucar. Condiciones: $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 0,05$ mM, $I = 1,0$ M, $T = 33$ °C, $[\text{H}^+] = 0,30$ M. o = original; d = duplicado.

La posible presencia y acumulación de especies oxo- Cr^{V} -**Glucar**, debe ser evaluada en las mismas condiciones experimentales utilizadas en los estudios cinéticos. Se debe determinar, además, si estas especies participan de una etapa rápida o lenta. Los resultados de las mediciones de RPE de mezclas Cr^{VI} /**Glucar** (sección 4.2.3) indican la presencia de especies de oxo- Cr^{V} -**Glucar** en el rango de pH 1,0 – 6,0 y también a alta $[\text{H}^+]$ (0,2 M).

*Si las especies Cr^{V} -**Glucar** se acumulan en cantidades significativas, corresponde su inclusión en la ecuación de ajuste de los datos cinéticos de la reacción Cr^{VI} /**Glucar**.*

A fin de dilucidar este punto, se realizó un seguimiento cinético por RPE, de mezclas de reacción Cr^{VI} /**Glucar** preparadas en forma similar a las mezclas utilizadas en los estudios cinéticos espectrofotométricos. Se usaron concentraciones de sustrato y de protones dentro del rango empleado en los estudios cinéticos.

La Figura 5.25 muestra evolución en el tiempo de la altura pico a pico de las señales de las especies oxo- Cr^{V} -**Glucar** observadas, para una mezcla Cr^{VI} /**Glucar** (el Cr^{VI} es silente en RPE). Como se puede ver, a los 40 minutos de reacción se llega a la máxima concentración de especies Cr^{V} -**Glucar**, Figura 5.25 (a). Si lo comparamos con el decaimiento de la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$, determinado por espectrofotometría a 350 nm, para igual I, $[\text{H}^+]$ y [**Glucar**], Figura 5.25 (b), podemos notar que a los 40 minutos se ha consumido el 34 % del Cr^{VI} inicial. Esto "sugiere" que los primeros datos de absorbancia, adquiridos a 350 nm, serían el resultado de la contribución de Cr^{VI} y especies oxo- Cr^{V} -**Glucar**.

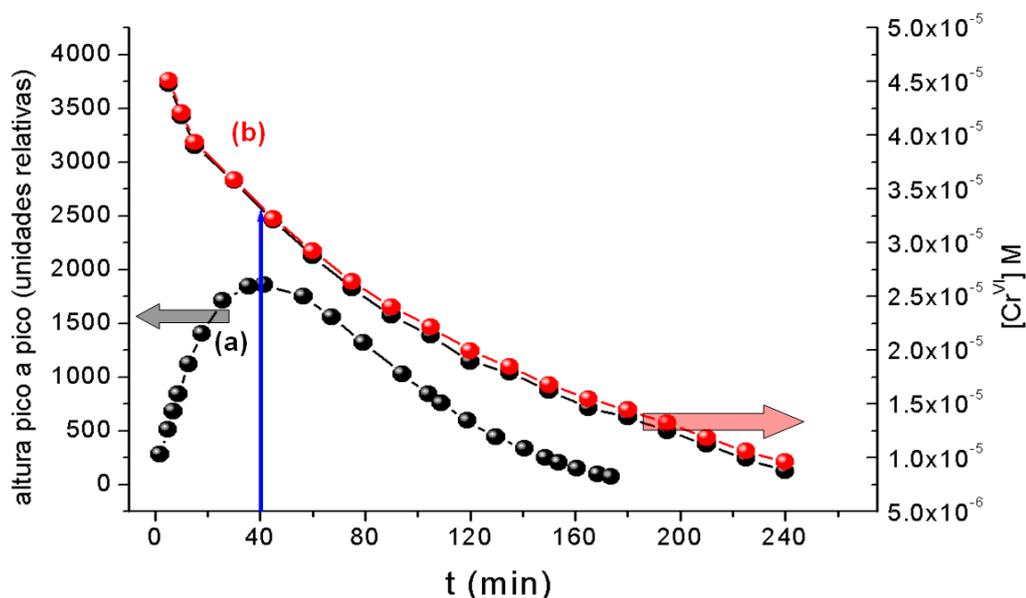


Figura 5.25. (a) Evolución en el tiempo de las especies Cr^{V} -Glucar observadas por RPE para una mezcla de reacción Cr^{VI} /Glucar. Condiciones: $[\text{Glucar}] = 20 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] = 0,2 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 14 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 0,05 \text{ mM}$. Los espectros RPE fueron obtenidos con una modulación de amplitud $2,0 \text{ G}$. (b) Seguimiento espectrofotométrico de la disminución de $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ en mezclas de Cr^{VI} /Glucar. Condiciones: $[\text{Glucar}] = 20 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] = 0,2 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 0,05 \text{ mM}$, $\lambda = 350 \text{ nm}$.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cambios en la concentración de las especies de Cr^{VI} y Cr^{V} -**Glucar** fueron evaluadas a diferentes temperaturas. La variación de las especies oxo- Cr^{V} - Glucar *se estudiaron por* RPE a **14 °C**, mientras que el consumo de Cr^{VI} se evaluó espectrofotométricamente a **33 °C**. Si las *cinéticas* por **RPE** se hubieran realizado a $33 \text{ }^\circ\text{C}$, el tiempo al cual se observaría la *máxima concentración* de especies oxo- Cr^{V} -**Glucar** sería *sustancialmente menor*. Es muy probable que la máxima concentración de especies oxo- Cr^{V} -Glucar se corresponda con

tiempos tan cortos que no contribuyan significativamente a la absorbancia a 350 nm.

Los resultados obtenidos demuestran que:

- a) las especies Cr^V-Glucar son intermediarios de la reacción Cr^{VI}/Glucar
- b) las especies Cr^V-Glucar pueden ser caracterizadas por RPE a baja [H⁺] debido a un aumento de su vida media
- c) a bajas concentraciones de protones y de temperatura se puede observar un aumento y una disminución de las especies de Cr^V-Glucar
- d) el perfil cinético de las especies oxo-Cr^V-Glucar obtenido por RPE a **14 °C**, Figura 5.26, puede ser ajustado adecuadamente con la ec. 5.34, derivada del esquema del Esquema 5.2.

$$h = A k_6 \frac{(e^{-k_{5 \text{ exp}} t} - e^{-2k_{6 \text{ exp}} t})}{2k_{6 \text{ exp}} - k_{5 \text{ exp}}} \quad (5.45)$$

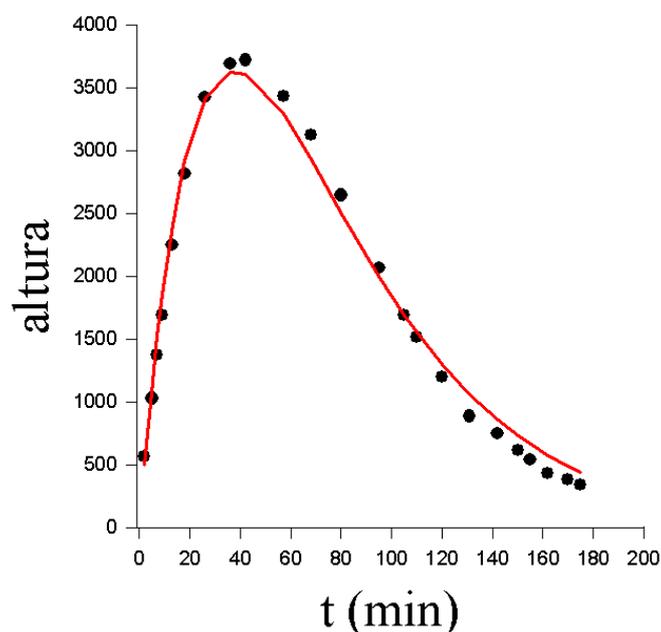


Figura 5.26. Ajuste del perfil cinético de las especies Cr^{V} -Glucar observadas para una mezcla de reacción Cr^{VI} /Glucar por RPE. Condiciones: $[\text{Glucar}] = 20 \text{ mM}$; $[\text{H}^+] = 0,2 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 14 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}] = 0,05 \text{ mM}$. Los espectros RPE fueron obtenidos con una modulación de amplitud $2,0 \text{ G}$. Los datos experimentales fueron ajustados empleando la ec. 5.45, derivada del Esquema 5.2.

Así, utilizando dos técnicas espectroscópicas diferentes se refuerza la validez del Esquema 5.2 propuesto anteriormente.

Para asegurar que los cambios de la absorbancia a 350 nm a $33 \text{ }^\circ\text{C}$ fuesen solo el resultado de la desaparición de Cr^{VI} en el tiempo se realizaron experimentos adicionales. Se sintetizaron en solución acuosa, especies oxo- Cr^{V} -**Glucar** mediante reacción de intercambio de ligando, entre el complejo Cr^{V} -**GHS** (**GHS**= glutatión) y el ligando Glucar. La síntesis del complejo Cr^{V} -**GHS** se obtuvo según el método descrito en la literatura (sección 2.3.12). La reacción de intercambio de ligandos entre el compuesto complejo

Cr^V-**GHS** y el sustrato orgánico Glucar, se supone completa y rápida, ya que la interacción *ácido duro-base dura* (Cr^V-O), según el *Principio de Dureza y Blandura de Pearson*, es más favorable que la interacción *ácido duro- base blanda* (Cr^V-S) [135].

La formación de las especies oxo-Cr^V-**Glucar** a partir de mezclas del complejo donador de Cr^V, fue rápida y completa, como lo demuestran los espectros de RPE que se muestran a continuación, Figura 5.27.

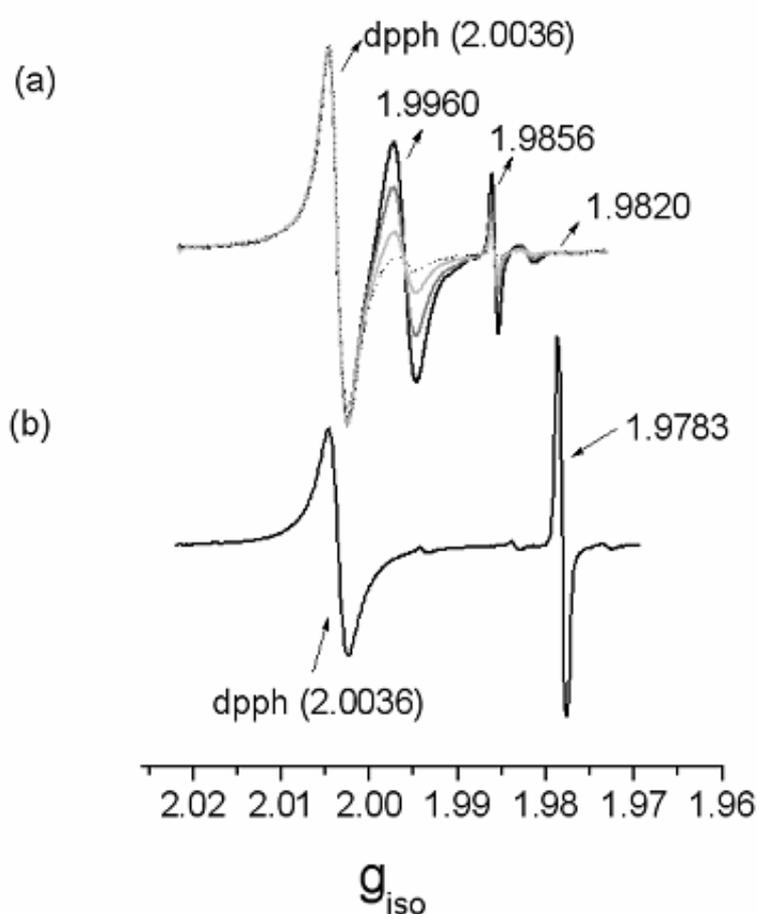


Figura 5.27. (a) Espectros secuenciales de RPE de las especies Cr^{V} -GSH. (b) Espectro de RPE de la especie final luego del intercambio de ligandos.

Cuando el compuesto complejo Cr^{V} -**GHS** se disuelve a $\text{pH} = 3,0$ en presencia de buffer ehba, se observan 3 señales atribuidas a diferentes especies Cr^{V} -**GHS**, Figura 5.28.a. Todas estas especies (Cr -**GHS**) presentan valores de g_{iso} superiores a 1,9800 típicas de este tipo de compuestos complejos.

Si se disuelve el complejo Cr^V-**GHS** en agua destilada (pH=7,0) o en ácido perclórico en el rango de valores de pH = 1,0 – 3,0 o [H⁺] = 0,2 M no se observa ninguna señal de RPE, debido a la *desproporción* del Cr^V. Sin embargo, si el complejo Cr^V-**GHS** es disuelto en solución de ácido perclórico en presencia de **Glucar** 20 mM se observa una señal con un valor de *g_{iso}* = 1,9783 cuyo decaimiento en el tiempo depende de la [H⁺], Figura 5.28.b. En el tiempo que se tarda en disolver el complejo y adquirir los datos de RPE (aproximadamente 2 - 3 minutos) las tres señales correspondientes al compuesto complejo Cr^V-GHS han sido reemplazadas por la señal correspondiente a especies oxo-Cr^V-Glucar. Este *resultado indica* que el *complejo* Cr^V-**GHS** es un donador eficiente de Cr^V para *generar especies oxo-Cr^V-Glucar*.

Teniendo en cuenta esto último, se realizó un estudio cinético de la reactividad de las especies oxo-Cr^V-**Glucar** por espectroscopia UV-vis a 350 nm y 33 °C. Las especies oxo-Cr^V-**Glucar** fueron generadas como se describió previamente utilizando el complejo K₃[Cr^{VO}(LH₂)₂] (LH₂ = **GHS**) y soluciones de **Glucar** 20 mM. La reacción de intercambio se supone completa, como lo evidenció el experimento de intercambio de ligandos por RPE; Figura 5.27 (a) y (b).

En la Figura 5.28 se pueden observar los cambios de la absorbancia a 350 nm obtenidos a 33 °C para una concentración de **Glucar** de 20 mM. En 400 segundos (6,7 minutos) se consume el 96 % de las especies oxo- Cr^{V} -**Glucar**.

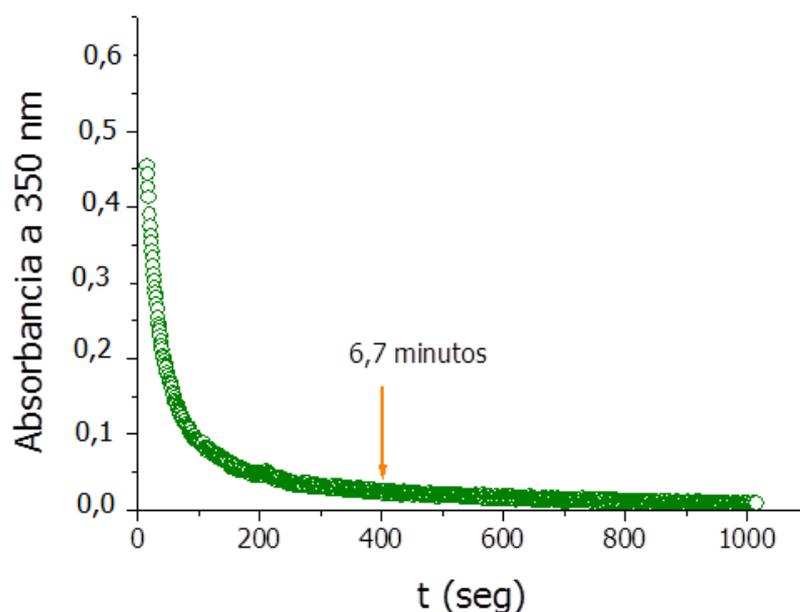


Figura 5.28. Perfil cinético mostrando la reactividad de las especies oxo-Glucar- Cr^{V} . Condiciones: [Glucar] 20 mM, $[\text{H}^+] = 0,2 \text{ M}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $[\text{Cr}^{\text{V}}] = 0,05 \text{ mM}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$.

La Figura 5.28 nos permite apreciar, que **más** del **95 %** el de las especies Cr^{V} -Glucar, se *consume antes de los primeros 10 minutos*, lo cuál quiere decir que, *si bien se forman especies oxo- Cr^{V} -Glucar como intermediarios de la reacción, el Cr^{V} , no se acumula en las mezclas de reacción Cr^{VI} /Glucar*. Esto último significa que *las especies de Cr^{V} no participan de etapas determinantes de la velocidad de reacción Cr^{VI} /Glucar*. Efectivamente, las especies oxo- Cr^{V} -**Glucar** se generan rápidamente durante la reacción Cr^{VI} /**Glucar**. Sin

embargo, solo se acumularían a temperaturas más bajas que la utilizada en el presente estudio cinético Cr^{VI}/**Glucar**.

Los datos del cambio de la absorbancia a 350 nm en función del tiempo para la reacción Cr^{VI}/**Glucar** pudieron ser ajustados adecuadamente con una ecuación exponencial simple, ec. 5.35:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}] = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-k_{6\text{exp}} t} \quad (5.46)$$

En la ec. 5.35, $k_{6\text{exp}}$ es la constante de velocidad de desaparición de Cr^{VI}, $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0$ es la concentración inicial de Cr^{VI}, $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ es la concentración de Cr^{VI} a un tiempo t . La Figura 5.29 muestra el efecto de la [**Glucar**] sobre $k_{6\text{exp}}$. La gráfica muestra un conjunto de rectas sin ordenada al origen y pendientes que aumentan con la $[\text{H}^+]$. El aumento de la velocidad de reacción con la [**Glucar**] y la de protones es evidente. Los valores de constante de velocidad de reacción para cada $[\text{H}^+]$ y [**Glucar**] se indican en la Tabla 5.6.

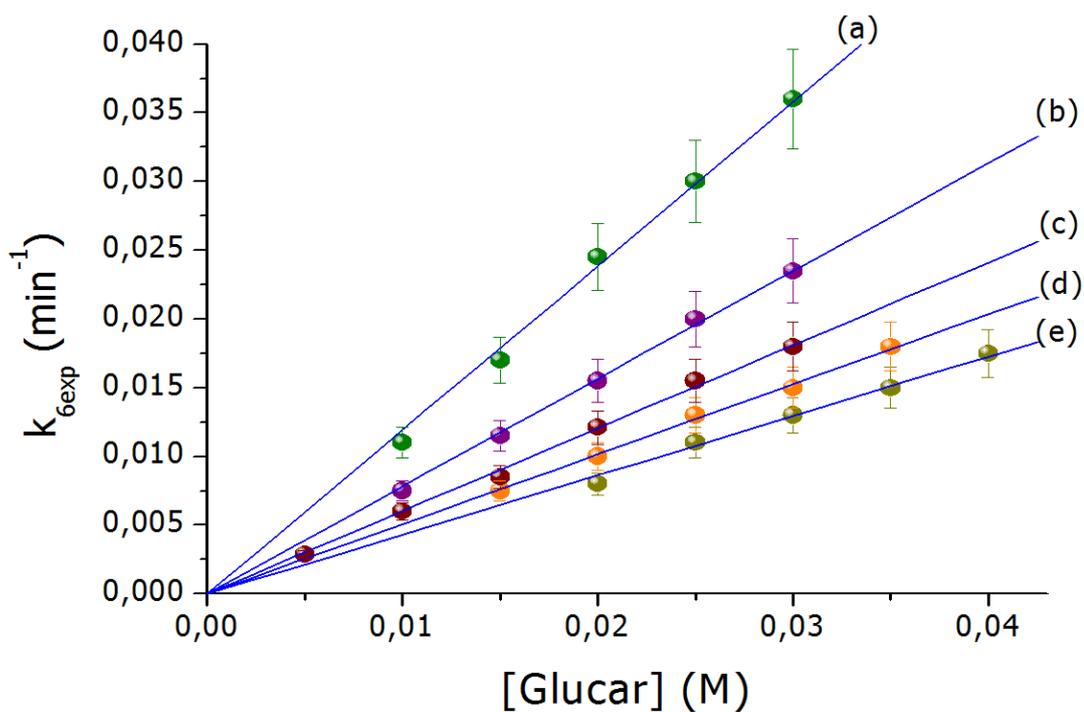


Figura 5.29. Efecto de la $[\text{Glucar}]$ sobre $k_{6\text{exp}}$. Condiciones: $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 = 0,05\text{ mM}$, $I = 1,0\text{ M}$ y $[\text{H}^+]$: (a) 0,50, (b) 0,40, (c) 0,30, (d) 0,20 y (e) 0,10 M.

Tabla 5.6. Valores observados para las constantes de velocidad de pseudo primer orden (k_{6exp}) para diferentes $[H^+]$ y $[Glucar]$ ^[a]

$[H^+]$ (M)	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
$[Glucar]$ (mM)	$10 \times k_{6exp}(s^{-1})^{[b]}$				
5	--	--	$0,50 \pm 0,05$	--	--
10	--	--	$1,00 \pm 0,1$	$1,25 \pm 0,13$	$1,83 \pm 0,18$
15	--	$1,25 \pm 0,13$	$1,42 \pm 0,15$	$1,83 \pm 0,17$	$2,83 \pm 0,33$
20	$0,05 \pm 0,01$	$1,67 \pm 0,17$	$2,00 \pm 0,20$	$0,17 \pm 0,25$	$4,00 \pm 0,50$
25	$1,83 \pm 0,18$	$2,17 \pm 0,22$	$2,50 \pm 0,33$	$10 \pm 0,33$	$5,00 \pm 0,50$
30	$2,17 \pm 0,22$	$2,50 \pm 0,25$	$0,17 \pm 0,33$	$3,33 \pm 0,40$	$6,00 \pm 0,06$
35	$2,50 \pm 0,25$	$3,00 \pm 0,33$	--	--	--
40	$2,92 \pm 0,33$	--	--	--	--

^[a] T = 33 °C, $[Cr^{VI}] = 0,05$ mM, I = 1,0 M.

^[b] valores obtenidos de múltiples determinaciones. Las constantes de velocidad fueron obtenidas empleando la ec. 5.46 y el programa Sigma Plot 8.0.

En el rango de valores de $[H^+]$ empleado en este trabajo, k_{6exp} depende linealmente de la $[Glucar]$ (Figura 5.29). Las pendientes de las rectas representan las constantes de velocidad independizadas de la $[Glucar]$, k_{6H} , a cada $[H^+]$, de manera que k_{6exp} puede expresarse según la ec. 5.47 como:

$$k_{6exp} = k_{6H} [Glucar] \quad (5.47)$$

La Figura 5.30 muestra la dependencia cuadrática de $k_{6\text{H}}$ con $[\text{H}^+]$.

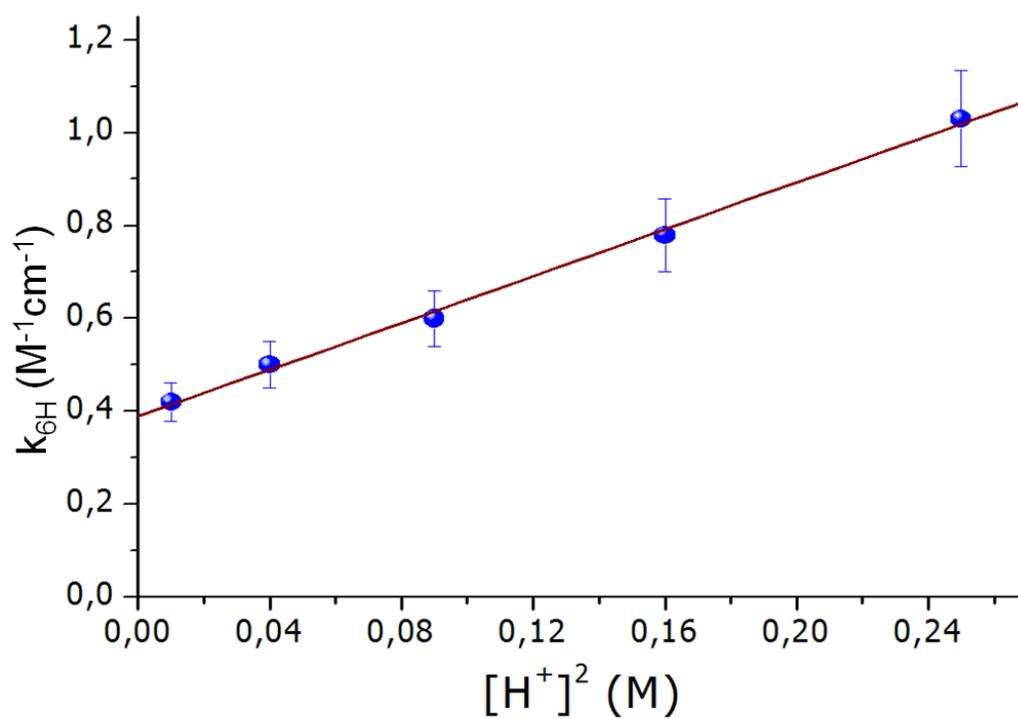


Figura 5.30. Dependencia cuadrática de $k_{6\text{H}}$ con $[\text{H}^+]$.

Los valores de constante de velocidad, $k_{6\text{H}}$, para cada $[\text{H}^+]$ se indican en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Valores determinados para las constantes de velocidad, k_{6H} , para diferentes $[H^+]$ ^[a]

$[H^+]$ (M)	$k_6 \times 10^3$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
0,10	7,17 ± 0,67
0,20	8,50 ± 0,83
0,30	10 ± 1,00
0,40	13 ± 1,33
0,50	17,17 ± 1,67

^[a] T = 33 °C, $[Cr^{VI}]_0 = 5,0 \times 10^{-5}$ M, I = 1,0 M.

La constante de velocidad, k_{6H} , puede ser expresada, entonces, a través de la ec. 5.37:

$$k_{6H} = k_6^I + k_6^{II} [H^+]^2 \quad (5.48)$$

Combinando las ec. 5.47 y 5.48 se obtiene la ec. 5.49:

$$k_{6\text{exp}} = (k_6^I + k_6^{II} [H^+]^2) [\text{Glucar}] \quad (5.49)$$

$$k_{6\text{exp}} = k_6^I [\text{Glucar}] + k_6^{II} [H^+]^2 [\text{Glucar}]$$

Donde

$$k_6^{\text{I}} = 0,00650 (\pm 0,17) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_6^{\text{II}} = 0,04167 (\pm 0,17) \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

La ley de velocidad experimental queda expresada mediante la ec. 5.50:

$$\begin{aligned} -\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} &= (k_6^{\text{I}} + k_6^{\text{II}} [\text{H}^+]^2) [\text{Glucar}] [\text{Cr}^{\text{VI}}] \\ -\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} &= (k_6^{\text{I}} [\text{Glucar}] + k_6^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 [\text{Glucar}]) [\text{Cr}^{\text{VI}}] \end{aligned} \quad (5.50)$$

Capítulo 6

Mecanismos de oxidación

de sacáridos por Cr

hipervalente

6.1. Consideraciones generales

Se sabe que la oxidación de alcoholes, ácidos aldónicos y urónicos por Cr^{VI} es precedida por la formación de ésteres de Cr^{VI} [55,66,67,101,136]. La formación de este tipo de compuestos constituye la primera etapa en el mecanismo de oxidación de sacáridos por Cr^{VI} . Para los tres sacáridos estudiados, las mezclas Cr^{VI} /sacárido exhibieron una banda de absorción con un valor de λ_{max} en el rango 340 - 390 nm, consistente con la presencia de ésteres de Cr^{VI} [101].

Por otra parte, la formación de intermediarios de Cr^{V} y/o Cr^{IV} durante la reacción redox con Cr^{VI} , ha sido previamente observada para numerosos sustratos [12,55,61,137]. Las etapas de reducción para la reacción de Cr^{VI} con aldosas [109], alditoles [138], ácidos aldónicos [139] y metilglicósidos [54], ha sido postulada como un *conjunto de reacciones en serie de dos etapas de pseudo primer orden*, como ocurre en el caso de las reacciones Cr^{VI} /sacárido aquí estudiadas.

La reactividad de las diferentes especies intermediarias de cromo debe ser cuidadosamente analizada para determinar si se encuentran involucradas en etapas determinantes de la velocidad de la reacción redox Cr^{VI} /sacárido.

En particular, para las reacciones de oxidación de los sustratos **Galur**, **GHL** y **Glucar** con Cr^{VI} , la presencia de la especie intermediaria Cr^{IV} en las mezclas de reacción ha sido verificada y su reactividad medida experimentalmente.

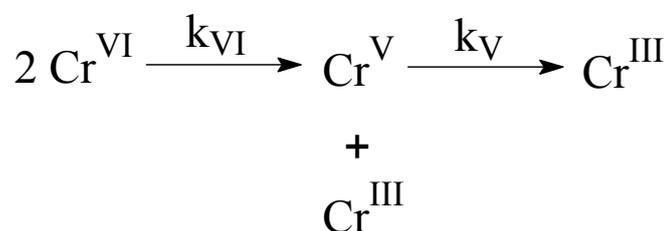
Como se indicó previamente (sección 5.1.1), los espectros de las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido en medio $\text{HClO}_{4(\text{ac})}$, presentaron bandas de absorción, con máximos a 350 nm, y hombros a 420 – 500 nm, típicamente características de la especie Cr^{VI} en medio ácido. Estudios espectroscópicos previos (UV-vis, RMN y Raman) han demostrado que el HCrO_4^- (ac) es la especie mayoritaria en soluciones diluidas de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (ac) en medio ácido [140,141,142], por lo cual, hemos considerado que *ésta es la especie mayoritaria de Cr^{VI} presente en las mezclas de reacción*. Los valores de absorbancia de estas bandas decayeron en el tiempo, paralelamente con la aparición de nuevas bandas a 540 - 570 nm y 410 - 430 nm, cuya intensidad también varió en el tiempo. Finalmente, en el espectro de absorción electrónica de todas las mezclas Cr^{VI} /sacárido se pudieron observar dos bandas de transición electrónica $d-d$ a 400 - 430 nm y 540 – 570 nm atribuibles a las transiciones ${}^4\text{A}_{2g} \rightarrow {}^4\text{T}_{1g}$ y ${}^4\text{A}_{2g} \rightarrow {}^4\text{T}_{2g}$ de especies de Cr^{III} coordinadas con ligandos oxigenados con simetría octahédrica [89]. Las bandas disminuyeron lentamente su intensidad, con desplazamientos de sus máximos de absorción, hasta alcanzar los valores típicos de las transiciones electrónicas $d-d$ de la especie $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (ac). Esto indica la *formación de complejos Cr^{III} -sacárido*, que se hidrolizan posteriormente, a la especie de $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (ac).

La *falta de punto isobéptico* en todas las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido estudiadas, fue indicativo de la *existencia de especies intermediarias* de cromo hipervalente, que deben estar presentes en concentraciones apreciables durante la reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} . Esto indicó que *la reducción del Cr^{VI} a Cr^{III} no ocurre en una sola etapa*.

Para explicar estos resultados deben, necesariamente, existir varias etapas de reducción en las cuales se generen especies intermediarias, como complejos Cr^{V} -sacárido y/o Cr^{III} -sacárido. *La alta reactividad del Cr^{V} frente a los sacáridos estudiados impide que esta especie; se acumule en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido*.

De esta forma, los perfiles cinéticos obtenidos, para los tres sacáridos en estudio, pueden ser descriptos apropiadamente por las reacciones consecutivas de primer orden, señaladas en el Esquema 6.1, que propone la formación de especies de Cr^{V} como intermediarias del proceso de reducción Cr^{VI} a Cr^{III} .

Existen numerosos precedentes sobre reacciones de Cr^{VI} con aldosas [138] y ácido aldónicos [44,139,143] en los que los datos cinéticos pudieron ajustarse considerando la contribución de intermediarios de Cr^{V} a la absorbancia a 350 nm. En el caso de los estudios cinéticos de las reacciones Cr^{VI} / **GHL**, Cr^{VI} / **Galur** y Cr^{VI} /**Glucar**, se detectaron especies de oxo- Cr^{V} -sacárido como intermediarios de reacción.



Esquema 6.1. Etapas propuestas para la reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} en presencia de sacáridos.

En el capítulo 4 se describió la detección y caracterización de especies de oxo- Cr^{V} -L en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sustrato orgánico, por espectroscopia de RPE. Estas especies de Cr^{V} absorben en el espectro UV-vis a 350 nm contribuyendo a la absorbancia total de la mezcla a esa longitud de onda, en mayor o menor grado según sea la magnitud del coeficiente de absorptividad molar (ϵ) y, particularmente, las velocidades relativas de formación y de descomposición de las especies Cr^{V} -sacáridos. Es así que conocer el ϵ de las especies de Cr^{V} resulta indispensable para el análisis de los datos cinéticos. Ante la imposibilidad de aislar las especies de Cr^{V} , algunos autores utilizan el coeficiente de absorptividad molar del bisquelato estable $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]^-$, aislado y caracterizado por Roček *et al.* [144]. En nuestro caso, decidimos estimar el ϵ de las especies oxo- Cr^{V} -**S**₂ –donde **S**: **GHL** o **Galur**- realizando experimentos de intercambio de ligando a partir de soluciones de $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{ehba})_2]^-$ en presencia de una alta concentración del ligando orgánico, como se describió en la sección 2.3.10.

La *presencia de radicales libres orgánicos* en mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido, fue estudiada mediante el test de polimerización con acrilonitrilo o acrilamida, obteniéndose para los tres sacáridos, resultados positivos. La detección de radicales libres orgánicos indica que, para que se formen los mismos, se debe presentar una *etapa redox mono electrónica*, durante la reacción redox Cr^{VI} /sacárido.

Los barridos periódicos de soluciones saturadas con O_2 , de las mezclas de reacción Cr^{VI} /**GHL** y Cr^{VI} /**Galur** en medio ácido, permitieron observar la aparición de dos bandas de absorción definidas a **290** y **245** nm, con una relación de intensidades $\text{Abs}_{245}/\text{Abs}_{290} = 2,2$. La mezcla de reacción Cr^{VI} /**Glucar** presentó una banda a **245** nm y un hombro poco definido a **290** nm, *ambas enmascaradas por la presencia de otra especie que absorbe a longitudes de onda similares*.

Las dos bandas a **245** y **290** nm, así como la relación de intensidad entre ambas, son características del compuesto $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ [39,90,91]. Estos resultados espectroscópicos demuestran que la *especie $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{Cr}^{\text{II}}$ son intermediarios redox* en las reacciones Cr^{VI} /sacárido, hecho que *puede considerarse como evidencia de la presencia de la especie Cr^{IV}* en el mecanismo de reducción del cromo hipervalente, como ha sido observado en la oxidación crómica de alcoholes [90].

La *presencia de complejos oxo-Cr^V-sacárido* pudo ser confirmada con gran sensibilidad, por espectroscopia de RPE, pudiendo caracterizarse los diferentes complejos oxo-Cr^V formados con cada sacárido.

La presencia de los intermediarios Cr^V y Cr^{VI}, y la detección de radicales libres orgánicos, sugieren que la reacción redox Cr^{VI}/sacárido ocurre a través de rutas mono y bielectrónicas.

La velocidad con que las diferentes especies de cromo hipervalente, oxidan a los sacáridos **GHL** y **Galur**, v_n ($n = 4, 5, 6$ para Cr^{IV}, Cr^V y Cr^{VI}, respectivamente - ec. 6.1, 6.2 y 6.3), pueden ser comparadas empleando los valores de k_n obtenidos experimentalmente, a partir, de las ec. 5.6, 5.22 y 5.18, para **GHL**; y 5.11, 5.33 y 5.29, para **Galur**. Las condiciones experimentales elegidas fueron: [sacárido] = 0,3 M, [H⁺] = 0,3 M y 0,6 M, [Cr^{IV}] = 0,07 mM, [Cr^{VI}]_T = [Cr^V]_T = 0,6 mM.

$$v_4 = k_4 [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (6.1)$$

$$v_5 = k_5 [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (6.2)$$

$$v_6 = k_6 [\text{Cr}^{\text{VI}}] \quad (6.3)$$

Debe recordarse que, para las dos reacciones estudiadas (Cr^{IV} / **GHL** y Cr^{IV} / **Galur**), k_4 fue determinada experimentalmente a **14 °C**, mientras que las otras constantes de velocidad (k_5 y k_6) fueron determinadas a **33 °C**.

En la Tabla 6.1 se pueden apreciar los valores de las velocidades de oxidación de cada sustrato por las diferentes especies de cromo hipervalente, así como sus respectivas relaciones.

Tabla 6.1. Valores de velocidad de oxidación para las reacciones Cr/ GHL y Cr/Galur. ^[a]

[H ⁺] (M)	Sacárido			
	GHL		Galur	
	Velocidad, v_n (M s ⁻¹)			
	0,3	0,6	0,3	0,6
v_4	$6,5 \times 10^{-4}$	$6,5 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$
v_5	$7,5 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-6}$
v_6	$6,5 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-6}$	6×10^{-7}	$2,4 \times 10^{-6}$
Relación				
[H ⁺] (M)	0,3	0,6	0,3	0,6
v_4/v_5	900/1	406/1	400/1	168/1
v_4/v_6	$10^4/1$	250/1	700/1	133/1
v_5/v_6	12/1	0,6/1	2/1	0,8/1

^[a] Condiciones: [sacárido] = 0,3 M; [H⁺] = 0,3 y 0,6 M, [Cr^{IV}] = 0,07 mM, [Cr^{VI}]_T = [Cr^V]_T = 0,6 mM.

Para ambos sacáridos, **GHL** y **Galur** se llegó a la conclusión de que las velocidades de reacción responden al siguiente orden: $v_4 \gg v_5 \geq v_6$. Esto indica claramente que, incluso a baja temperatura, el Cr^{IV} reacciona más

rápido que las especies Cr^{V} y Cr^{VI} . Esto último demuestra que, *aunque la especie Cr^{IV} se forme como intermediario durante la reacción de oxidación del sacárido por Cr^{VI} , este intermediario se encuentra involucrado en etapas rápidas y no se acumula en las mezclas de reacción; por ello no fue considerado en el ajuste de los datos cinéticos experimentales.*

Teniendo en cuenta:

- a) la ausencia de punto isobéptico en mezclas Cr^{VI} /sacárido,
- b) la detección y el rendimiento de la especie CrO_2^{2+} en mezclas Cr^{VI} /GHL y Cr^{IV} /Galur,
- c) la detección CrO_2^{2+} en mezclas Cr^{VI} /Glucar,
- d) la detección, caracterización y determinación de la velocidad de desaparición de las especies oxo- Cr^{V} -sacárido por RPE en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido,
- e) el resultado positivo del test de detección de radicales libres orgánicos por polimerización de acrilonitrilo o acrilamida,
- f) la reactividad del intermediario Cr^{IV} en las mezclas de reacción Cr^{IV} /sacárido, determinada a partir de los estudios cinéticos, para **GHL** y **Galur**,
- g) la determinación de los valores de las constantes de velocidad de oxidación de Cr^{VI} , Cr^{V} y Cr^{IV} y sus dependencias con la acidez y la concentración de sacárido,

h) la detección de ésteres de Cr^{VI} como intermediarios en un rango de valores de pH 6,5 – 7,1, y

i) la identificación de los productos de oxidación orgánicos.

se procede a proponer, los mecanismos de reacción más probables para la oxidación de los sacáridos estudiados en el presente trabajo de Tesis, por cromo hipervalente.

6.2. Mecanismo de reacción para la oxidación de GHL por cromo hipervalente

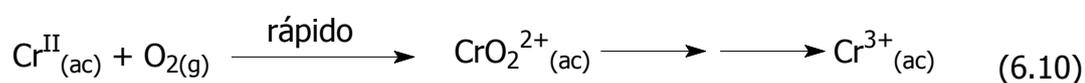
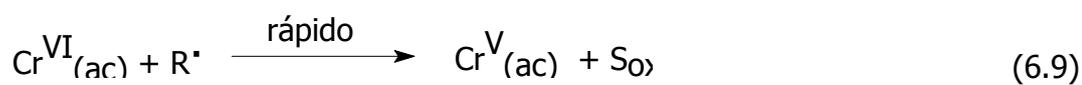
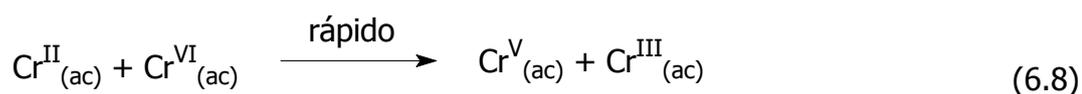
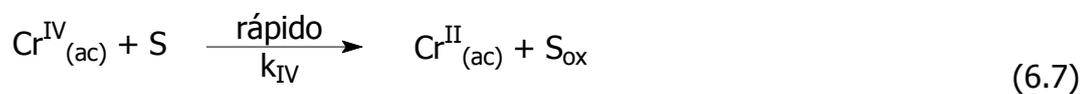
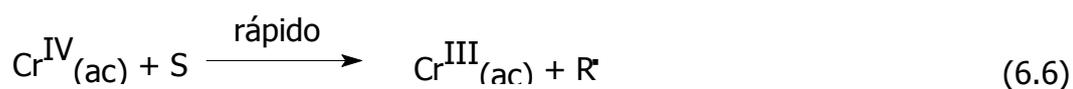
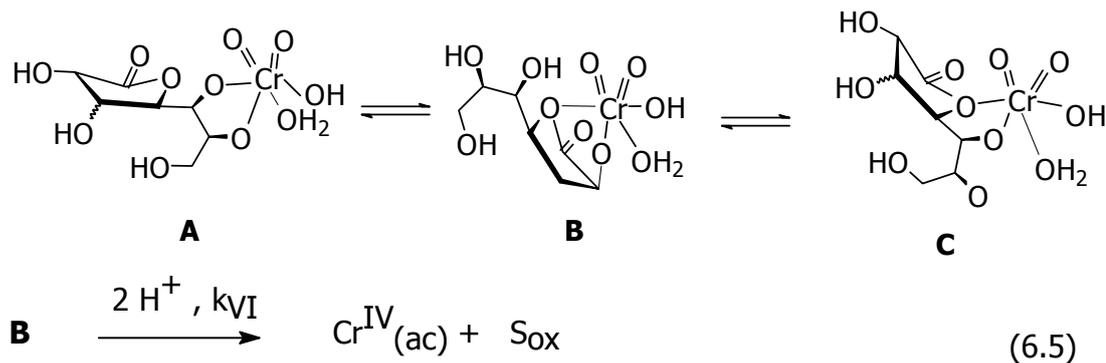
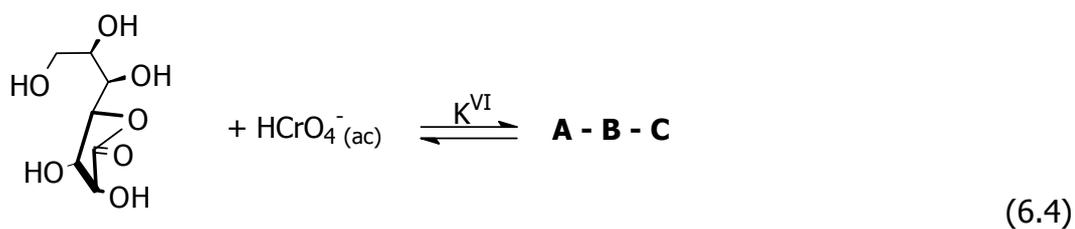
La reducción de **GHL** por Cr^{VI} es fuertemente dependiente de la acidez del medio de reacción. La reacción redox es rápida a $[\text{H}^+] > 0,1 \text{ M}$, lentificándose a medida que disminuye la acidez del medio de reacción. Por lo tanto, los estudios cinéticos de la reacción redox $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$ se realizaron en el rango de $[\text{H}^+]$ (0,2 – 1,09 M), donde la *especie de cromo predominante* es el ion HCrO_4^- [103]. Esta especie se propone entonces, como la forma reactiva del Cr^{VI} , lo cuál está de acuerdo con la dependencia de primer orden de la velocidad de reacción con la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$, para los tres sistemas estudiados, $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$, $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$ y $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Glucar}$.

La oxidación de alcoholes, ácidos aldónicos y urónicos por Cr^{VI} es precedida por la formación de esteres cromato [55,66101,136]. La observación de las bandas de absorbanza características de los oxo-ésteres de Cr^{VI} alrededor de

372 nm luego de mezclar **GHL** con Cr^{VI} bajo condiciones experimentales prefijadas, en las cuales la reacción redox es lenta, indica la formación rápida de intermediarios esteres de Cr^{VI} -sacáridos previo al proceso redox.

El primer paso del mecanismo propuesto en el Esquema 6.2 involucra la formación de monoquelatos Cr^{VI} -**GHL** con el ligando orgánico **GHL** actuando como ligando bidentado, ec. 6.4. Son posibles numerosos modos de coordinación para las especies Cr^{VI} -**GHL**. Dado que la oxidación de la **GHL** da lugar a la formación de *ácido D-glucónico* y *ácido fórmico* (sección 2.3.6), se propone que la especie **B** indicada en el Esquema 6.2 sería la especie reactiva, considerando que el complejo **B** se encontraría en equilibrio con otros isómeros Cr^{VI} -**GHL** (**A**, **C** o cualquier otro complejo posible).

El paso lento propuesto en el Esquema 6.2 para el consumo de Cr^{VI} involucra la *transferencia intramolecular de dos electrones hacia el intermediario Cr^{VI} -GHL* (**B**) activo para dar Cr^{IV} y los productos de oxidación orgánicos simbolizados como S_{ox} , *ácido D-glucónico* y *ácido fórmico*, ec. 6.5. Este paso requiere la adición de dos protones, lo que significa que la reacción redox Cr^{VI} /**GHL** se vé favorecida en medio ácido, como ha sido observado experimentalmente.



La ley de velocidad para el consumo de Cr^{VI} derivada de las ec. 6.4 y 6.5 está dada por la ec. 6.12, en la que $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}$ se refiere a la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ total en la mezcla de reacción y $[\text{S}]$ es la concentración de GHL.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = \frac{k_{\text{VI}} K^{\text{VI}} [\text{H}^+]^2 [\text{S}] [\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{1 + K^{\text{VI}} [\text{S}]} \quad (6.12)$$

Si $(K^{\text{VI}} [\text{S}]) \ll 1$, la ec. 6.12 se transforma en la ec. 6.13, en la que $(k_{\text{VI}} \times K^{\text{VI}}) = k_6$.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}} K^{\text{VI}} [\text{H}^+]^2 [\text{GHL}] [\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} \quad (6.13)$$

Esta ecuación concuerda con la *ley de velocidad experimental*, ec. 5.24. La formación de Cr^{IV} (ec, 6.5) resulta consistente con la observación de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ (sección 5.4.1.), producto de la reacción del Cr^{II} con O_2 , ec. 6.10), el cuál es considerado evidencia de la formación de Cr^{IV} [66,117]. Se propone que el Cr^{IV} reacciona con un exceso de sustrato por dos rutas alternativas rápidas, para dar Cr^{III} y radical orgánico, ec. 6.6; o Cr^{II} y sustrato oxidado, ec. 6.7.

La ec. 6.6 es sustentada experimentalmente, por la observación de la polimerización del acrilonitrilo cuando se lo adicionó a la mezcla de reacción

(sección 5.1.3). La formación de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$, representada por la ec. 6.10, permite postular un segundo camino paralelo. El Cr^{IV} es una especie muy reactiva que no se acumula en la mezcla de reacción. Como se demostró en la sección 5.1.4, durante la reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$ se produce un aumento en el porcentaje de la especie en el $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ al disminuir la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0$, llegando a un valor límite del **46 %**.

Este resultado sugiere que parte del Cr^{VI} está reaccionando por una vía que no involucran Cr^{II} , ya que el rendimiento esperado de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ debería aproximarse a 100 % si la reacción tuviera lugar exclusivamente a través de las siguientes etapas: $\text{Cr}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{II}}$ [38].

Considerando que las constantes de velocidad de la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{GHL}$ son independientes de la $[\text{H}^+]$ en el rango: (0,2 – 0,6) M de $\text{HClO}_4(\text{ac})$. En el Esquema 6.2 se propone que el Cr^{IV} reacciona con la GHL para formar Cr^{II} y S_{ox} , ec.6.7, y la ley de velocidad para la desaparición de Cr^{IV} adquiere la forma matemática expresada en la ec. 6.14, la cual está en concordancia con la *ley de velocidad experimental*, ec. 5.7.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \frac{d[\text{CrO}_2^{2+}]}{dt} = k_{\text{IV}} [\text{S}] [\text{Cr}^{\text{IV}}]_{\text{T}} \quad (6.14)$$

La especie Cr^{V} se produce por reacción rápida del Cr^{II} con Cr^{VI} , ec. 6.8, ($k = 2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [38]). Dado que la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ empleada en los experimentos

cinéticos es mayor que la utilizada para la detección de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$, permite que la especie Cr^{VI} pueda reaccionar con el Cr^{II} , minimizando la reacción indicada en la ec 6.10.

La especie oxidante Cr^{V} también se formaría en la mezcla de reacción por de oxidación del radical orgánico (R^\bullet) con Cr^{VI} ($k = 7,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [90]) ec. 6.9. Posiblemente esta sea una de las causas de la falla en la detección de radicales libres orgánicos por RPE.

Los datos cinéticos indicaron que la especie Cr^{V} formada en las etapas rápidas, ec. 6.8 y 6.9, puede oxidar al ligando orgánico **GHL**, a través de tres pasos competitivos lentos para dar los productos redox, ec 6.11.

En base en los resultados cinéticos (sección 5.3.1) y de RPE (sección 4.2.1), se propone que el Cr^{V} reacciona con **GHL** para formar un monoquelato oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}\text{-GHL}$ (K^{V}_1), en rápido equilibrio con el bisquelato oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}\text{-GHL}_2$ (K^{V}_2). Estos intermediarios de Cr^{V} originan los productos redox en presencia de otra molécula de GHL (k^{V}_1 y k^{V}_2) o vía un paso de catálisis ácida (k^{V}_3).

Los complejos $\text{Cr}^{\text{V}}\text{-S}$ y $\text{Cr}^{\text{V}}\text{-S}_2$, ec. 6.11, representan numerosos isómeros de unión, la estructura de los complejos predominantes (**I/II**) se discutió previamente (sección 4.2.1).

Se propone que el complejo $\text{Cr}^{\text{V}}\text{O-GHL}$ formado por la unión del grupo hidroxilo en C1 y O^{anillo} unido al grupo oxo- Cr^{V} se lo considere la especie oxo- Cr^{V} redox reactiva.

Si se considera al bisquelatos oxo-Cr^V-**GHL**₂ como la especie mayoritaria de Cr^V presentes en la mezcla de reacción, la ley de velocidad para la desaparición del Cr^V adquiera la forma matemática expresada en la ec. 6.15, en total acuerdo con la *ley de velocidad experimental*, ec. 5.28.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \left(\frac{k_{\text{v}}^{\text{III}}}{K_{\text{v}}^2} + (k_{\text{v}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{v}}^{\text{I}}) [\text{S}] \right) [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (6.15)$$

El primer término en la ec. 6.15 representa la relación *velocidad redox vs velocidad de sustitución* del monoquelato (Cr^V-**GHL**). A partir de la ec. 5.28, el valor obtenido para la relación $(k_{\text{v}}^{\text{III}}/K_{\text{v}}^2) = 2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, indicando que la reacción redox del monoquelato Cr^V-**GHL** para dar productos de reacción, es más lenta que su reacción con **GHL** para formar el bisquelato Cr^V-**GHL**₂.

Dado que todos los experimentos cinéticos se llevaron a cabo empleando un exceso de **GHL** respecto a la especie Cr^V, favorecería la formación de bisquelatos oxo-Cr^V. La reacción redox puede aún ocurrir a bajas [H⁺], vía las rutas independientes de ácido (k_{v}^{I} y $k_{\text{v}}^{\text{III}}$), como se observó en las mediciones de RPE.

Las leyes de velocidad experimental pueden ser utilizadas para calcular la evolución en el tiempo de la concentración de todas las especies de cromo involucradas en el proceso redox. Empleando las ec. 5.28 y 5.24, se obtiene la gráfica de la Figura 6.1. En esta figura 6.1 se puede apreciar que la

máxima concentración de Cr^{V} alcanza un 33 % respecto del cromo total justificando su inclusión en las ecuaciones de ajuste de los datos experimentales de la variación de la absorbancia a 350 nm.

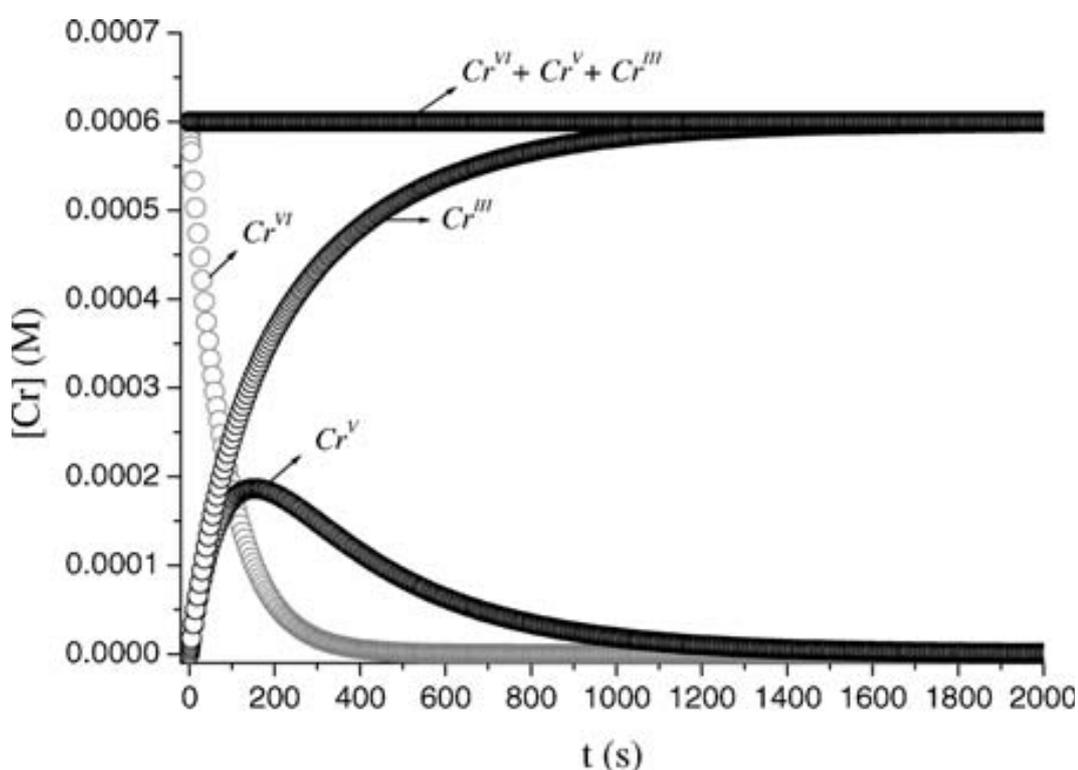
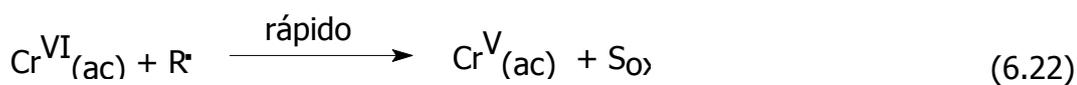
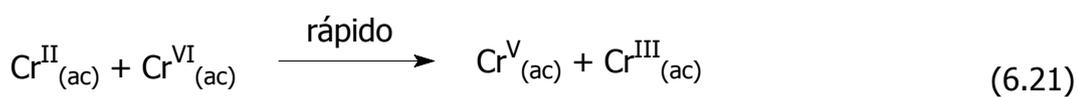
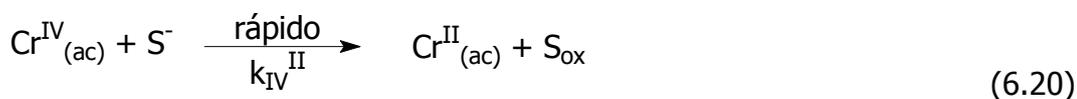
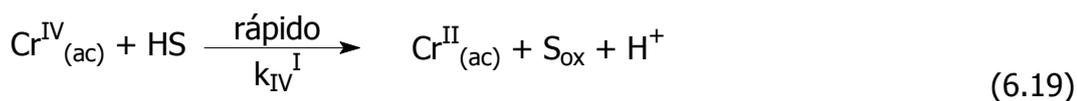
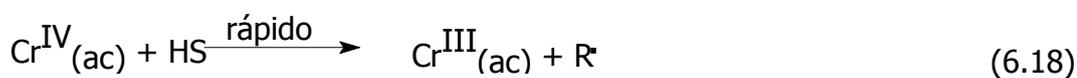
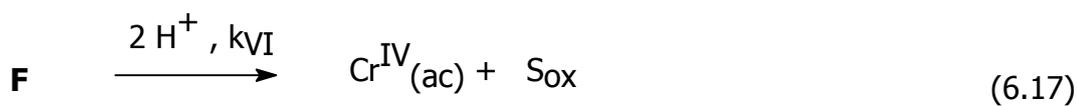
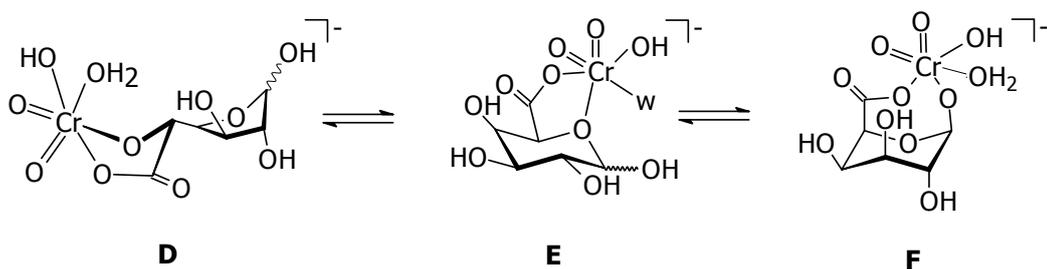
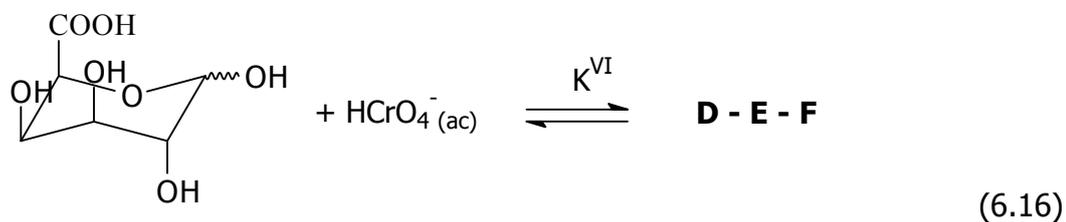


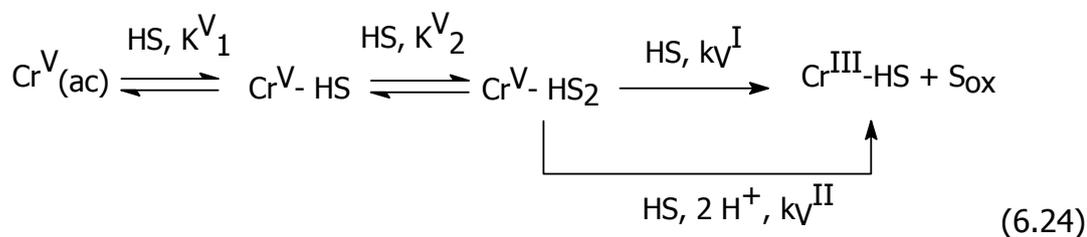
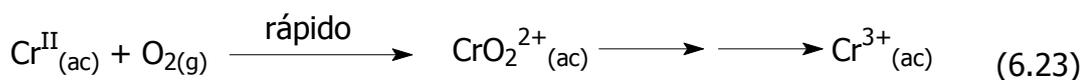
Figura 6.1. Perfiles cinéticos calculados para las diferentes especies de cromo. Las $[\text{Cr}]$ fueron calculadas usando los siguientes valores de constantes: $k_6 = 0,00590$, $k_5 = 0,0031$, $T = 33\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1,0$, $[\text{GHL}] = 0,15\text{ M}$, $[\text{H}^+] = 1,0\text{ M}$. $[\text{Cr}]_{\text{T}} = 6,0 \times 10^{-4}\text{ M}$. k_{VI} y k_{V} fueron calculados usando las ec. 5.23 y 5.27, respectivamente.

6.2. Mecanismo de reacción para la oxidación de Galur por cromo hipervalente

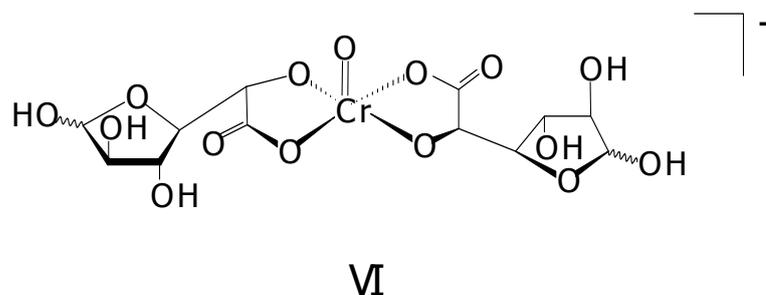
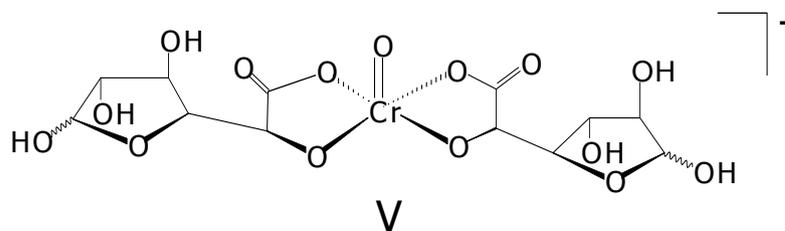
En un trabajo previo de la reacción de Cr hipervalente con **Galur** [55], la detección de bandas de absorbancia características de oxo-esteres de Cr^{VI} ,

alrededor de **360** y **387** nm, 2 min después de mezclar **Galur** y Cr^{VI} , bajo condiciones en las que la reacción redox es muy lenta, indicaron que, al menos tres esteres de Cr^{VI} (**D**, **E** y **F**) se formarían rápidamente, previo a los pasos de reacción redox. El primer paso del mecanismo consiste en la formación de monoquelatos Cr^{VI} -**Galur** (ec. 6.16, Esquema 6.3). Aunque son posibles diferentes modos de coordinación para los monoquelatos Cr^{VI} -**Galur**, el complejo con Cr^{VI} unido al grupo hidroxilo anomérico (**F**) es el único intermediario redox *activo*, ya que la oxidación de **Galur** ocurre solo en esta posición. Este complejo debe estar, a su vez, en rápido equilibrio con los otros isómeros de unión (**D** y **E**), ya que las bandas de absorbancia alrededor de 360 y 387 nm de los esteres, decaen con la misma velocidad [55].





Siendo $\text{Cr}^{\text{V}}\text{-HS}_2 = \mathbf{V}$ o \mathbf{VI}



Esquema 6.3. Mecanismo propuesto para la oxidación de Galur por Cr hipervalente en medio ácido. K^{VI} , K^{V}_1 y K^{V}_2 son las constantes de formación de las especies oxo- Cr^{VI} , oxo- Cr^{V} -monoquelato y oxo- Cr^{V} -bisquelato, respectivamente. HS = Galur, S = galacturonato, S_{ox} = Galar, R = radical orgánico

El segundo paso propuesto en la secuencia de reacciones del Esquema 6.3, es el consumo de Cr^{VI} en un paso lento que involucra la transferencia

intramolecular de dos electrones en el complejo activo $\text{Cr}^{\text{VI}}\text{-Galur}$ (**F**) para dar Cr^{IV} y S_{ox} ec. 6.17. De acuerdo a los datos cinéticos, la conversión del intermediario activo (**F**) en Cr^{IV} y S_{ox} requiere dos protones. Entonces, la reacción redox debería estar favorecida en medio ácido, como fue observado, ec. 6.17. A partir de las ecs. 6.16 y 6.17 del Esquema 6.3 llegamos a la ec. 6.25.

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = \frac{k_{\text{VI}} K^{\text{VI}} [\text{H}^+]^2}{1 + K^{\text{VI}}} \frac{[\text{HS}][\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{[\text{HS}]} \quad (6.25)$$

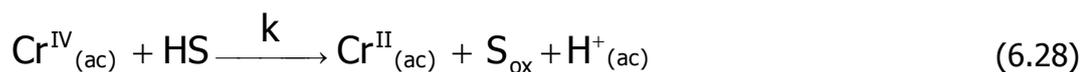
Si en la ec. 6.25 ($K^{\text{VI}} [\text{HS}] \ll 1$), entonces se obtiene la ec. 6.26:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}} K^{\text{VI}} [\text{H}^+]^2 [\text{HS}][\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} \quad (6.26)$$

donde $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}$ representa la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ total en la mezcla de reacción y $[\text{HS}]$ la concentración de **Galur**. Esta ecuación coincide con la ley de velocidad experimental, ec. 5.37, en la cuál $k_6 = (k_{\text{VI}} K^{\text{VI}})$. Como se mencionó previamente, el Cr^{IV} oxida a **Galur** mucho más rápido que el Cr^{VI} y el Cr^{V} (al menos en dos órdenes de magnitud) por lo que el Cr^{IV} participa solo de etapas redox rápidas. Esta especie no contribuye a la absorbancia a **350 nm**, y no fue considerada en la ecuación de ajuste de los datos experimentales.

El valor de k_4 y la ley de velocidad para el paso redox involucrando a la especie Cr^{IV} se determinó experimentalmente. Los datos cinéticos indican que la especie Cr^{IV} formada en la ec. 6.17 podría ser reducido mediante pasos competitivos, para dar diferentes productos redox, como se muestra en el Esquema 6.3. La primera ruta produce Cr^{III} y radical orgánico (ec. 6.18) y la otra ruta genera Cr^{II} y S_{ox} (ec. 6.19 y 6.20). Siendo la primera respaldada por la observación de la polimerización del acrilonitrilo [55]; y la segunda por la formación de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$ (producto de la reacción del Cr^{II} con O_2 (ec. 6.23), la cuál se toma como evidencia de la formación de Cr^{IV} [38]). La constante bimolecular de velocidad de reacción redox es inversamente proporcional a $[\text{H}^+]$ en el rango (0,1 – 0,3) M.

La *ley de velocidad teórica* puede ser deducida empleando conceptos de ácido base, el equilibrio ácido – base entre el acido (HS) y su base conjugada (S^-), ec. 6.27 – 6.31:





$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \left(\frac{k[\text{S}^-][\text{H}^+]}{K_a} + [\text{S}^-]k' \right) [\text{Cr}^{\text{IV}}] = \left(\frac{kK_a[\text{HS}]_{\text{T}}[\text{H}^+]}{(K_a + [\text{H}^+])K_a} + \frac{k'K_a[\text{HS}]_{\text{T}}}{K_a + [\text{H}^+]} \right) [\text{Cr}^{\text{IV}}] \quad (6.30)$$

si $[\text{H}^+] \gg K_a$ [119]

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{IV}}]}{dt} = \left(k + \frac{k'K_a}{[\text{H}^+]} \right) [\text{Cr}^{\text{IV}}][\text{HS}]_{\text{T}} \quad (6.31)$$

La *ley de velocidad teórica* obtenida en relación a la desaparición de Cr^{IV} (ec. 6.31), coincide con la *ley de velocidad experimentalmente* (ec. 5.12), en la que $k = k_{\text{IV}}^{\text{I}}$, $(k'K_a) = k_{\text{IV}}^{\text{II}}$ y $[\text{SH}]_{\text{T}}$ es la $[\text{Galur}]_{\text{T}}$.

La ec. 6.31 representa un paso rápido para el intermediario Cr^{IV} durante la oxidación crómica de **Galur**.

En el Esquema 6.3 se postula que el Cr^{V} es producido a través de dos vías: (1) por reacción rápida entre Cr^{II} y Cr^{VI} (ec. 6.21) [133,144], y (2) por reacción rápida del radical orgánico, con Cr^{VI} (ec. 6.22). La concentración de Cr^{VI} empleada en los estudios cinéticos fue 25 veces mayor a la empleada en

la detección de la especie $\text{CrO}_2^{2+}_{(\text{ac})}$ por lo tanto la reacción 6.21 compite exitosamente con la reacción representada por la ec. 6.23.

La reacción 6.22 (Radical/ Cr^{VI}) es tan rápida, que los radicales libres orgánicos no pudieron ser detectados por RPE. El mecanismo de reacción planteado en el Esquema 6.3 indica que el Cr^{V} formado en el paso rápido, puede oxidar a **Galur** en dos pasos competitivos lentos, para dar Cr^{III} y S_{ox} como producto final redox en ambos casos (ec. 6.24). De esta forma, sobre la base de los estudios cinéticos empleando espectroscopia RPE y de absorción óptica, se propone que el Cr^{V} reacciona con **Galur** para formar monoquelatos oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-(\text{Galur})$ (K_V^1) en una reacción rápida para luego formar bisquelatos oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-(\text{Galur})_2$ (K_V^2).

Los bisquelatos oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-(\text{Galur})_2$ dan lugar a los productos de reacción redox en presencia de otra molécula de **Galur**, directamente (k_V^1) o vía un paso catalizado por ácido (k_V^{H}). Los complejos oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-\text{HS}$ y oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-\text{HS}_2$ en la ec. 6.24 representan varios isómeros de unión, descritos en la sección 4.2.2, pero la selectividad para la oxidación de **Galur** requiere que solo el complejo con el grupo hidroxilo del carbono anomérico unido al Cr^{V} sea la especie redox reactiva.

El hecho de que **Galur** sea oxidado a mayor velocidad que el resto de las aldosas (sean piranosas o furanosas), las cuales también fueron oxidadas en la posición hemiacetálica formando especies oxo- $\text{Cr}^{\text{V}}-(\text{diolato})_2$ estables a pH

> 1 , sugiere que la especie redox reactiva oxo-Cr^V podría ser del tipo $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^1, \text{O}^6\text{-Galur})(\text{O}^6, \text{O}^5\text{-Galur})]^-$, con el C1-O y el carboxilato unidos al Cr^V. Los cálculos de DFT realizados permitieron llegar a la conclusión que los complejos de este tipo son menos estables que los complejos del tipo $[\text{Cr}^{\text{VO}}(\text{O}^6, \text{O}^5\text{-galactofuranuronato})_2]$. Los datos obtenidos por estudios espectroscópico RPE y cálculos teórico, DFT, permitieron llegar a la conclusión, que los bisquelatos oxo-Cr^V son las especies de Cr^V mayoritarias, observadas a $\text{pH} \leq 5$ y relación **Galur**:Cr^{VI} $> 30:1$. Los monoquelatos oxo-Cr^V-(**Galur**) solo son observados como especies minoritarias cuando la relación **Galur**:Cr^{VI} ≤ 10 y la $[\text{H}^+] > 0,25 \text{ M}$ [55]. Por lo tanto, la *ley de velocidad para la desaparición de Cr^V* puede ser descrita por la ec. 6.32:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \frac{K_1^{\text{V}} K_2^{\text{V}} [\text{HS}]^3 (k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{V}}^{\text{I}}) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{K_1^{\text{V}} [\text{HS}] + K_1^{\text{V}} K_2^{\text{V}} [\text{HS}]^2} \quad (6.32)$$

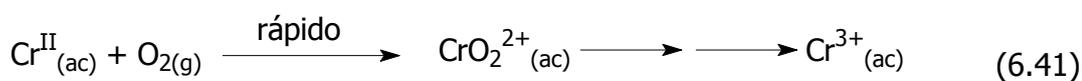
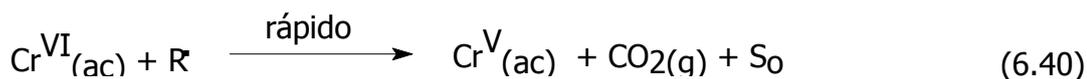
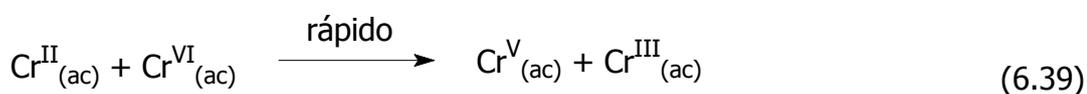
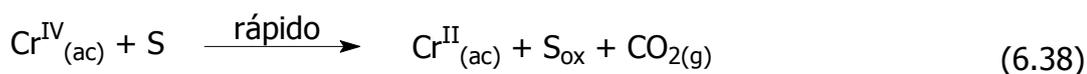
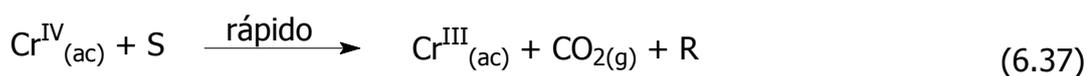
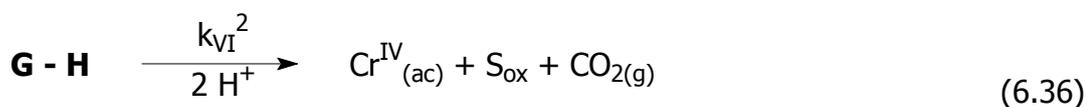
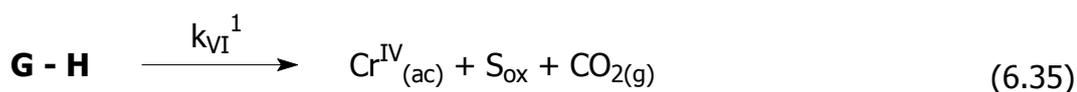
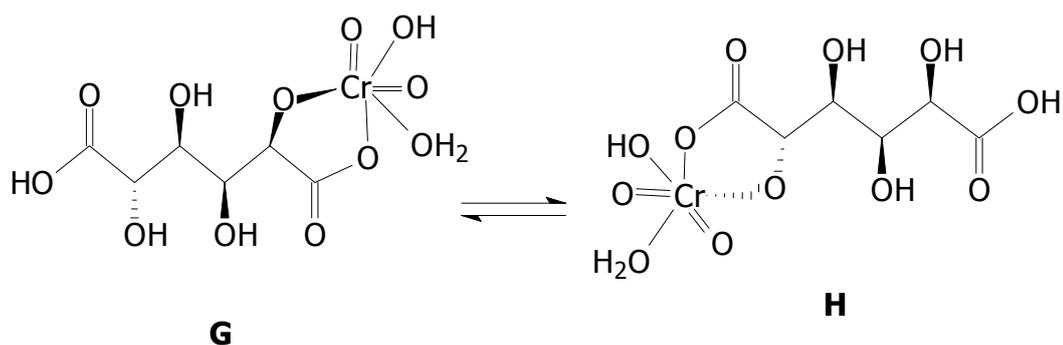
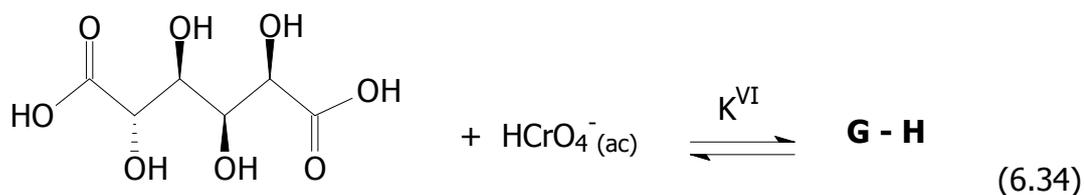
si $(K_1^{\text{V}} K_2^{\text{V}} [\text{HS}]^2) \gg (K_1^{\text{V}} [\text{HS}])$, entonces se llega a la ec. 6.33 que coincide con la ley de velocidad determinada experimentalmente, ec. 5.41:

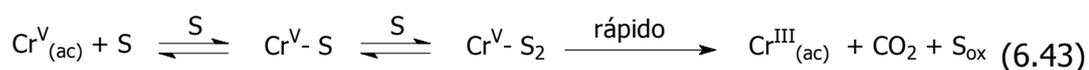
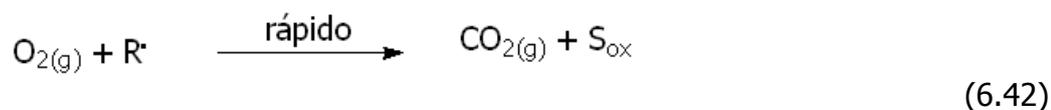
$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = ((k_{\text{V}}^{\text{I}} + k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2) [\text{HS}]) [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (6.33)$$

La reacción redox puede ocurrir aún a baja $[H^+]$, por la vía independiente de protones (k_V^H), como se comprobó en los experimentos de RPE (sección 4.2.2).

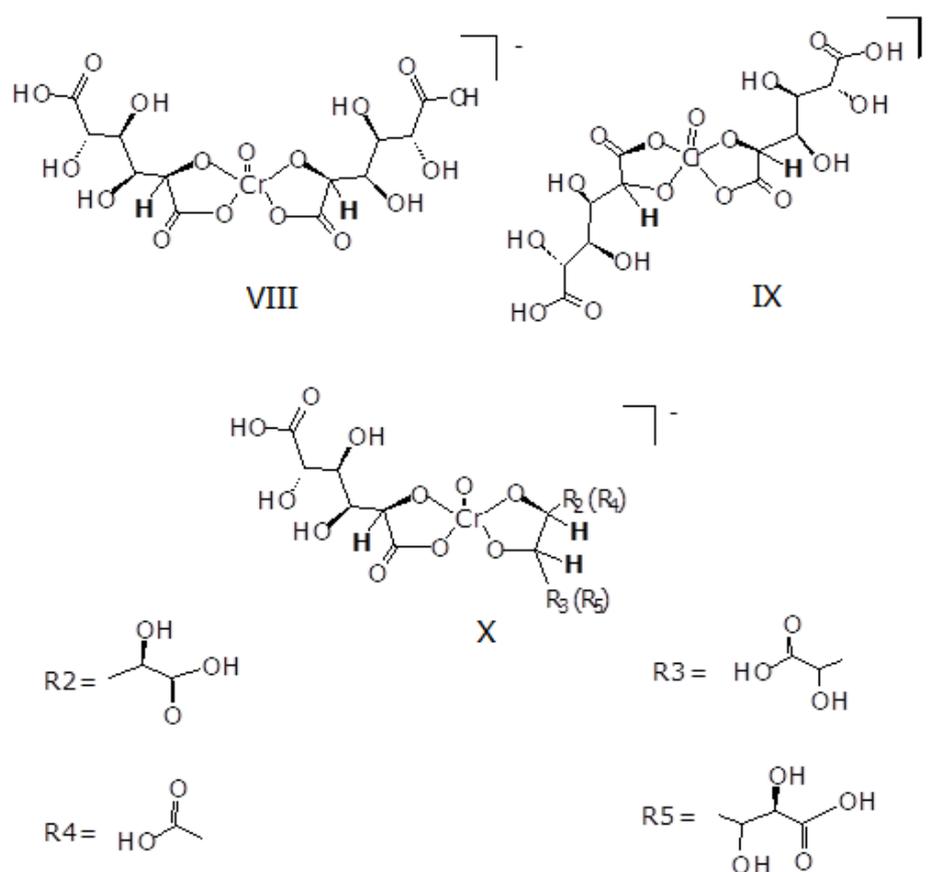
6.4. Mecanismo de reacción para la oxidación de Glucar por Cr hipervalente

Como ocurre con otros sustratos (alcoholes, ácidos aldónicos y urónicos [55,66,101,136]), la oxidación de **Glucar** por Cr^{VI} es precedida por la formación de ésteres de cromato (sección 5.1.2). La observación, pocos minutos después de mezclar el sacárido con el Cr^{VI} , de una banda de absorbancia a 380 nm, consistente con la atribuida a ésteres de Cr^{VI} [101], indica que varios complejos intermediarios de Cr^{VI} se forman rápidamente previo a los pasos redox. Es por esto que el primer paso del mecanismo propuesto en el Esquema 6.4 involucra la formación de monoquelatos Cr^{VI} -**Glucar**, especies **G** y **H**, Esquema 6.4, en estos complejos **Glucar** actúa como ligando bidentado, ec. 6.34. Si bien varias formas de coordinación son posibles para las especies Cr^{VI} -**Glucar**, se propone que las especies **G** y **H** serían las más factibles de ser consideradas especies reactivas en el Esquema 6.4.





Siendo $\text{Cr}^{\text{V}}-\text{S}_2 = \text{VI a X}$



Esquema 6.4. Mecanismo propuesto para la oxidación de Glucar por Cr hipervalente en medio ácido. K^{VI} , K^{V_1} y K^{V_2} es la constante de formación de las especies oxo- Cr^{VI} . S = Glucar, S_{ox} = ácido arabinarico, R = radical libre orgánico.

En el Esquema 6.4 se proponen dos pasos lentos paralelos, para la reducción de Cr^{VI} , ambos implican la transferencia intramolecular de dos electrones hacia el intermediario Cr^{VI} -**Glucar** activo para dar Cr^{IV} , S_{ox} y dióxido de carbono, ec. 6.35 y 6.36. Ambas rutas son sustentadas por la observación de intermediarios $\text{Cr}^{\text{II}}/\text{Cr}^{\text{IV}}$ (sección 5.1.4). Una de estas vías (ec. 6.35), es independiente y la otra dependiente de protones (ec. 6.36). La reacción redox se encuentra favorecida en medio ácido, como fue observado experimentalmente, sección 5.3.3.

La *ley de velocidad teórica* para el consumo de Cr^{VI} , ec. 6.44, derivada de las ec. 6.35 y 6.36, del Esquema 6.4 puede expresarse de la siguiente forma:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = \frac{(k_{\text{VI}}^{\text{I}} + k_{\text{VI}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2) K^{\text{VI}} [\text{S}] [\text{Cr}^{\text{VI}}]}{1 + K^{\text{VI}} [\text{S}]} \quad (6.44)$$

Si en la ec. 6.44 ($K^{\text{VI}} [\text{S}] \ll 1$), entonces se obtiene la ec. 6.45:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = (k_{\text{VI}}^{\text{I}} K^{\text{VI}} + k_{\text{VI}}^{\text{II}} K^{\text{VI}} [\text{H}^+]^2) [\text{S}] [\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} \quad (6.45)$$

donde $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}$ representa la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$ total en la mezcla de reacción, $(k_{\text{VI}}^{\text{I}} K^{\text{VI}}) = k_6^{\text{I}}$ y $(k_{\text{VI}}^{\text{II}} K^{\text{VI}}) = k_6^{\text{II}}$. Esta ecuación concuerda con la *ley de velocidad experimental*, ec. 5.50.

Si bien debido a la presencia de una interferencia, producida por una especie no identificada, sección 5.1.4, el estudio cinético de la reacción $\text{Cr}^{\text{IV}}/\mathbf{Glucar}$ no pudo realizarse, por analogía con los otros sacáridos estudiados en la presente tesis; de cualquier modo se propone que la especie Cr^{IV} formado en las ec. 6.35 y 6.36 podría ser oxidado por diferentes pasos competitivos rápidos, originando distintos productos redox, como muestra el Esquema 6.4. La primera ruta produce Cr^{III} , dióxido de carbono y radical libre orgánico (ec. 6.37), mientras que la segunda ruta genera Cr^{II} , S_{ox} y dióxido de carbono (ec. 6.38). La primera reacción se evidenció por la observación de la polimerización de acrilamida, cuando se adicionó a la mezcla de reacción [56], sección 5.1.3.

La segunda ruta está sustentada en la observación de la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$, el producto de la reacción del Cr^{II} con O_2 (ec. 6.41), la cual también se toma como evidencia de la formación de Cr^{IV} , sección 5.1.4. El Cr^{II} formado en la ec. 6.38 puede participar de dos reacciones rápidas paralelas: con el Cr^{VI} presente en el medio para dar Cr^{V} y Cr^{III} (ec. 6.39); y con el O_2 para producir la especie $\text{CrO}_2^{2+}(\text{ac})$, el cual se descompone lentamente a la especie $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}(\text{ac})$ (ec. 6.41). El Cr^{V} generado en las ec. 6.39 y 6.40 reacciona con **Glucar** en un paso rápido, para dar Cr^{III} , dióxido de carbono y S_{ox} , ec. 6.43.

La especie Cr^{V} se forma y se descompone rápidamente, de acuerdo a los resultados obtenidos por mediciones RPE y estudios espectrofotométricos UV-vis de intercambio de ligando (sección 5.3.3.). De acuerdo a los resultados de RPE (sección 4.2.3), proponemos que el Cr^{V} reacciona con **Glucar** para formar un monoquelato oxo- Cr^{V} -Glucar (K_V^1), en rápido equilibrio con especies bisquelato oxo- Cr^{V} -Glucar₂ (K_V^2). Estos intermediarios de Cr^{V} originan luego los productos redox. Finalmente, el radical libre orgánico reacciona con O_2 para dar *dióxido de carbono* y *ácido D-arabinárico*, ec. 6.42.

Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis pueden agruparse en las siguientes secciones:

(a) Estudios de oxidación de hidratos de carbono neutros y ácidos por acción de la especie de cromo hipervalente Cr^{IV} . Los sistemas Cr^{IV} /sacáridos neutros y Cr^{IV} /sacáridos ácidos, indican que los sacáridos de cada tipo seleccionados, responden a la misma ley de velocidad experimental, con la diferencia de que en el caso de la oxidación de sacáridos neutros el proceso es independiente de la acidez del medio de reacción.

El orden de reactividad para sacáridos neutros fue: *1-metil- α -D-glucopiranosa* \ll *1-metil- α -D-galactopiranosa* \sim *3-O-metil-D-glucopiranosa* \sim *6-desoxi-L-galactopiranosa* \sim *2-desoxi-D-glucopiranosa* \sim *D-glucopiranosa* \ll *D-galactopiranosa* \ll *D-glucitol*. La reacción Cr^{IV} /sacárido produce ácidos aldónicos y permite postular al **C1** como *sitio* más *reactivo* de las aldopiranosas estudiadas. Los valores de velocidad de oxidación de sacáridos por la especie Cr^{IV} confirman que las mismas son muy superiores a las velocidades de oxidación por las especies de cromo hipervalente Cr^{VI} o Cr^{V} con los sustratos orgánicos empleados.

Los cálculos realizados para obtener los valores de los parámetros de activación para los sacáridos D-glucopiranosa y D-galactopiranosa, indicaron que el *proceso oxidativo por la especie Cr^{IV} ocurre a través de un mecanismo*

concertado de reducción bieletrónica $Cr^{IV} \rightarrow Cr^{II}$ mediante la transferencia de hidruro.

Se propone para todos los sacáridos estudiados el mismo mecanismo de oxidación por Cr^{IV} en medio ácido la *reducción bieletrónica Cr^{IV} a Cr^{II} por transferencia de hidruros provenientes del sustrato orgánico.*

(b) Los estudios de RPE en solución acuosa de los sistemas Cr^{VI}/\mathbf{GHL} , Cr^{VI}/\mathbf{Galur} y Cr^{VI}/\mathbf{Glucar} , determinaron la presencia de complejos oxo- Cr^V -sacárido. Para los compuestos complejos oxo Cr^V - \mathbf{GHL} , en condiciones fuertemente acidas o en el rango de pH 1,0–4,0; los valores de A_{iso} y g_{iso} confirman la presencia de bisquelatos oxo- Cr^V pentacoordinados, con cuatro grupos alcoholato donores, donde la \mathbf{GHL} actúa como ligando bidentado para generar dos isómeros geométricos. Las señales no resueltas (minoritarias) se atribuyeron a especies monoquelato oxo- Cr^V pentacoordinadas.

En los estudios de RPE de onda continua a temperatura ambiente de los compuestos de coordinación oxo Cr^V -Galur indicaron que el *desdoblamiento hiperfino de protón no corresponde a protones intercambiables*, excluyendo la coordinación ecuatorial de moléculas de agua e indicando la presencia de bisquelatos oxo- Cr^V - \mathbf{Galur} .

La misma conclusión se obtuvo con estudios de RPE realizados a baja temperatura, RPE de 1H Davies ENDOR y cálculos DFT. Estos métodos corroboran solo la presencia de especies $[Cr^VO(O^6, O^5\text{-galactofuranuronato})_2]^-$.

Los espectros de RPE del sistema Cr^{VI} / Glucar realizados en un rango de valores de pH 1,0 – 3,2 mostraron la presencia de una única especie oxo- Cr^{V} -Glucar. Al aumentar el valor del pH en el rango 4,1 y 5,3 se observó un cambio en la coordinación ligando- Cr^{V} originando especies oxo- Cr^{V} -Glucar diferentes.

A pH bajos, el acoplamiento *shf* es el esperado para dos protones carbinólicos equivalentes acoplados al espín del electrón del Cr^{V} , de sitios 2-hidroxicarboxilato, de dos moléculas diferentes de **Glucar**, formando quelatos de cinco miembros. Los valores de g_{iso} y A_{iso} corresponden a complejos oxo- Cr^{V} pentacoordinados con dos grupos carboxilato y dos grupos alcoholato. A pH = 6,0 los parámetros espectrales indican la *presencia* de *complejos bisquelatos oxo- Cr^{V} pentacoordinados mixtos*, con una molécula de **Glucar** coordinando por dos grupos alcoholatos y la otra por su grupo 2-hidroxicarboxilato.

El estudio de la oxidación por Cr^{VI} de **Galur**, **GHL** y **Glucar**, verificó la presencia de especies intermediarias en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido, que incluyen radicales libres orgánicos, ésteres de Cr^{VI} , $\text{Cr}^{\text{IV/II}}$ y especies oxo- Cr^{V} -sacárido.

Los altos valores de los coeficientes de absortividad molar de las especies oxo- Cr^{V} -sacárido y sus tiempos de decaimiento indicaron que éstas deben

considerarse en la interpretación de los datos cinéticos solo en los sistemas $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$ y $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$.

Cuando se comparan las velocidades por la cual diferentes especies de Cr oxidan a los sacáridos estudiados, se observa que, *incluso a baja temperatura, el Cr^{IV} reacciona más rápido que las especies Cr^{V} y Cr^{VI} , demostrando que si bien el Cr^{IV} se forma durante la reacción de oxidación por Cr^{VI} , este intermediario se encuentra involucrado en etapas rápidas y no se acumula en las mezclas de reacción. Por ello no debe ser considerado en el ajuste de los datos cinéticos.*

Los resultados obtenidos permiten proponer que la reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} no ocurre en una sola etapa, sino que deben existir varias etapas de reducción en las cuales se generen estas especies intermediarias, un mecanismo de oxidación crómica que incluye rutas *mono y bieletrónicas*. Por otra parte, *estos estudios han permitido confirmar que en estudios cinéticos y mecanísticos de oxidación crómica de hidratos de carbono previamente realizados y en los cuales se postuló siempre la oxidación por la especie Cr^{IV} correspondía a una etapa rápida, ha sido confirmada experimentalmente.*

Resumen

Se sabe que los compuestos derivados del cromo, considerados contaminantes ambientales importantes, son altamente tóxicos y reconocidos agentes carcinogénicos debido a su alto grado de mutagenicidad [4]. Su capacidad para actuar como agente oxidante sobre biomoléculas, es la responsable de la mutagenicidad y carcinogenicidad del Cr^{VI} . Si bien la especie Cr^{VI} , no produce daño en el ADN *in vitro*, en ausencia de agentes reductores, se cree que la especie mutagénica sería alguno de los intermediarios reactivos tales como las especies Cr^{V} y Cr^{IV} producidas durante la reducción del Cr^{VI} a Cr^{III} .

Teniendo en cuenta todas estas posibles especies intermediarias, se ha postulado que la reducción de Cr^{VI} ocurre mediante un mecanismo complejo. Para probar esta hipótesis, se deben identificar y caracterizar tanto los productos como los intermediarios del proceso. Resultan de gran interés los hidratos de carbono o sus derivados, presentes en el medio celular vegetal y/o animal, tales como D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa y ácido D-glucurónico, los cuales podrían reaccionar con el Cr^{VI} , luego de su ingreso al citoplasma, estabilizándolo mediante la formación de complejos y/o actuando como agentes reductores, generando en el proceso redox, especies reactivas que produzcan daño celular.

El presente trabajo de tesis pretende profundizar el estudio del proceso de transferencia electrónica entre el elemento cromo hipervalente y los

diferentes grupos funcionales presentes en hidratos de carbono de importancia biológica; analizar la capacidad de coordinación y reactividad a partir de los diferentes estados de oxidación del elemento cromo ($\text{Cr}^{\text{VI/IV/III}}$), y finalmente integrar los resultados obtenidos, en la interpretación del proceso redox, cromo hipervalente - hidrato de carbono.

Para concretar estos objetivos, se realizaron distintas acciones, que incluyen:

🌿 Un estudio de la oxidación con cromo hipervalente de los sustratos, D-glucoheptono-1,4-lactona, ácido D-galacturónico y ácido D-glucárico.

🌿 Un estudio de la reactividad del Cr^{IV} frente a los diferentes hidratos de carbono (neutros y ácidos) para determinar si el proceso oxidativo por esta especie, siempre se encuentra o no, involucrado en etapas rápidas de reacción.

🌿 Se compararon los resultados obtenidos con los sustratos empleados en estudios anteriores [52-62] para lograr una interpretación más profunda del mecanismo de reacción redox.

Los resultados obtenidos, permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

🌿 Los sistemas Cr^{IV} /sacáridos neutros y Cr^{IV} /sacáridos ácidos, responden a la misma ley de velocidad experimental, con la diferencia de que en el caso de oxidación de sacáridos neutros el proceso es independiente de la acidez del medio de reacción. El orden de reactividad determinado para sacáridos neutros fue:

1-metil- α -D-glucopiranososa \ll *1-metil- α -D-galactopiranososa* \sim *3-O-metil-D-glucopiranososa* \sim *6-desoxi-L-galactopiranososa* \sim *2-desoxi-D-glucopiranososa* \sim *D-glucopiranososa* \ll *D-galactopiranososa* \ll *D-glucitol*.

Los valores de velocidad de oxidación de sacáridos por la especie Cr^{IV} confirman que las mismas son muy superiores a las velocidades de oxidación de las especies de cromo hipervalente Cr^{VI} o Cr^{V} con los sustratos orgánicos empleados.

Los cálculos realizados para obtener los valores de los parámetros de activación para los sacáridos D-glucopiranososa y D-galactopiranososa, indicaron que el *proceso oxidativo por la especie Cr^{IV} ocurre a través de un mecanismo concertado de reducción bielectrónica $\text{Cr}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Cr}^{\text{II}}$ mediante la transferencia de hidruro*.

Los estudios de RPE en solución acuosa de los sistemas Cr^{VI} /GHL, Cr^{VI} /**Galur** y Cr^{VI} /**Glucar**, determinaron la presencia de complejos oxo- Cr^{V} -sacárido, los que pudieron ser caracterizados, con la determinación de sus tiempos de vida media.

El estudio de la oxidación por Cr^{VI} de Galur, GHL y Glucar, verificó la presencia de especies intermediarias en las mezclas de reacción Cr^{VI} /sacárido, que incluyen radicales libres orgánicos, esteres de Cr^{VI} , especies: $\text{Cr}^{\text{IV/II}}$ y oxo- Cr^{V} -sacárido.

Las especies oxo-Cr^V-sacárido deben considerarse en la interpretación de los datos cinéticos solo en los sistemas Cr^{VI}/**Galur** y Cr^{VI}/**GHL**.

Al comparar las velocidades de reacción de las diferentes especies del elemento cromo con los sacáridos estudiados, incluso a baja temperatura, el Cr^{IV} reacciona más rápido que las especies Cr^V y Cr^{VI}, indicando que este intermediario se encuentra involucrado en etapas rápidas y no se acumula en las mezclas de reacción. Por ello *no* fueron considerado en el ajuste de los datos cinéticos.

En base a los datos experimentales y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se concluye:

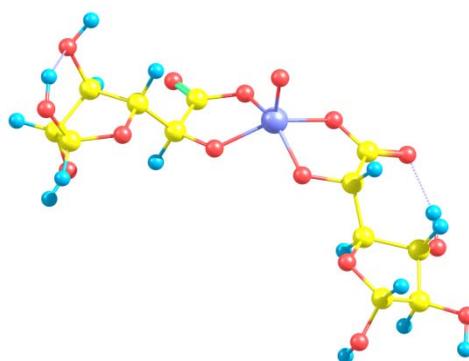
Opera el mismo mecanismo de oxidación por Cr^{IV} en medio ácido, para todos los sacáridos estudiados, el cual consiste en una *reducción bieletrónica Cr^{IV} a Cr^{II} por transferencia de hidruros provenientes del sustrato orgánico.*

La reducción de Cr^{VI} a Cr^{III} por parte de los ligandos orgánicos estudiados; no ocurre en una sola etapa, sino que tiene lugar en varias etapas de reducción que involucran vías de reducción: *mono y bieletrónicas, confirmando experimentalmente, los estudios cinéticos y mecanísticos de oxidación crómica de hidratos de carbono previamente realizados en el grupo de investigación donde se realizó el presente trabajo de Tesis Doctoral.*

El proceso de oxidación por la especie Cr^{IV} siempre se corresponde con una etapa rápida.

Figuras
Suplementarias

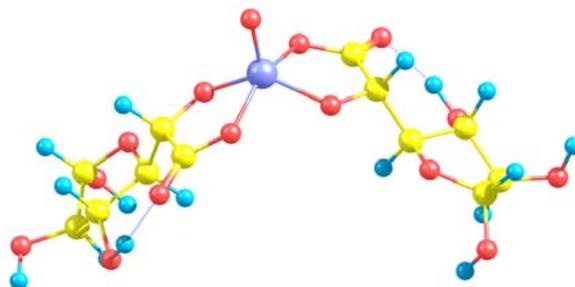
Figura S1. Coordenadas y energías totales de estructuras optimizadas.

[Cr^VO(O⁶,O⁵-galactofuranuronato)₂]⁻ - estructura I**Energía Total = -71827.13188 eV**

H	-2.758510	0.244294	-0.624621
H	3.386679	-0.566586	1.091619
O	-4.298821	-3.573716	-2.837159
O	-4.685058	0.007948	-2.050111
O	-5.254168	-3.064015	-0.288453
H	-4.963736	-3.429862	0.571100
C	-3.860382	-2.253331	-2.653754
O	4.894679	1.848466	-2.845840
O	0.310965	-2.380475	1.635480
O	2.855781	1.277031	3.203058
C	-2.630544	-0.263119	1.484441
O	-1.510911	-0.285164	2.197339
C	-2.367444	-0.590204	0.000613

O	-0.975692	-0.709975	-0.178455
O	0.981056	0.162908	2.684635
C	2.174778	0.629032	2.398982
O	1.491391	-0.255258	0.293496
C	2.619769	0.241348	0.972256
Cr	0.084104	-0.851287	1.298337
O	-3.730723	-0.007542	1.964122
C	3.270639	1.389636	0.183570
C	-3.090400	-1.883721	-0.452757
C	4.594074	1.930936	0.783925
C	5.292851	2.446545	-0.468632
C	4.907859	1.392598	-1.527591
O	3.610254	0.905836	-1.128972
H	4.812901	3.418139	-0.750759
H	4.343434	2.659097	-2.880794
H	5.641193	0.554602	-1.513004
H	5.195445	1.068200	1.169567
O	-2.700898	-2.176043	-1.810144
C	-4.636000	-1.782960	-0.470688
C	-4.916283	-1.384421	-1.926684
H	-5.014140	-1.033210	0.255020
H	-4.746285	0.239385	-2.998032
H	-5.946905	-1.672994	-2.232192

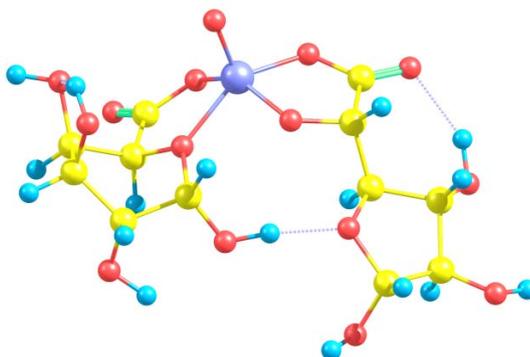
H	-3.569987	-1.858848	-3.649836
H	-4.698639	-3.834697	-1.969705
O	4.431807	2.929694	1.760663
O	6.683824	2.589880	-0.273073
H	2.539169	2.229285	0.106071
H	3.940028	2.471773	2.493102
H	7.055998	2.974839	-1.091462
H	-2.764153	-2.721043	0.205324

[Cr^VO(O⁶,O⁵-galactofuranonato)₂]⁻ - Estructura II**Energía Total = -71827.23735 eV**

H	1.202239	1.196082	0.292249
H	2.361564	3.059852	2.065712
O	-3.707554	-0.940116	3.492891
C	-5.149968	-0.881731	3.458944
H	3.531464	-0.097026	1.843139
O	3.009053	0.957365	-2.924058
O	1.562681	-2.783989	3.835509
O	2.182117	1.868516	3.360015
C	-1.951467	-2.438151	2.789182
O	-0.976651	-1.577729	3.334222
C	-1.294003	-3.229959	1.638892
O	0.001373	-3.024809	1.573162
O	1.092718	-0.072123	3.630937
C	1.893503	0.731308	2.969782
O	1.773644	-1.150115	1.502608
C	2.439062	0.080514	1.681059

Cr	0.769200	-1.817233	2.869956
C	2.286652	0.969915	0.436541
C	3.075141	2.301801	0.462898
C	3.231984	2.567015	-1.038662
C	3.458147	1.150952	-1.617788
O	2.806616	0.251452	-0.697134
O	2.437201	3.365071	1.123570
O	4.197460	3.524917	-1.413238
H	2.255426	2.949441	-1.414134
H	2.083726	1.276253	-2.979681
H	4.545073	0.908672	-1.645571
H	4.094316	2.100454	0.885953
O	-1.897581	-3.988858	0.871801
C	-3.195811	-1.650031	2.351362
C	-5.553933	-1.557238	2.137259
C	-4.386532	-2.507505	1.863330
H	-5.555411	-1.456519	4.320921
O	-5.609817	0.423399	3.635013
H	-5.549344	-0.783954	1.326958
O	-6.820755	-2.168996	2.263367
O	-4.346739	-2.900904	0.513175
H	-4.499786	-3.384416	2.550233
H	-5.380563	0.938472	2.832971

H	5.060208	3.241668	-1.047282
H	-2.272331	-3.185093	3.557447
H	-2.900559	-0.936010	1.544483
H	-3.540108	-3.477105	0.447200
H	-7.032654	-2.567508	1.395808

[Cr^VO(O^{ring},O⁶-galactopirauronato)(O⁵,O⁶-galactofuranuronato)] –**estructura III****Energía Total = -71838.60307 eV**

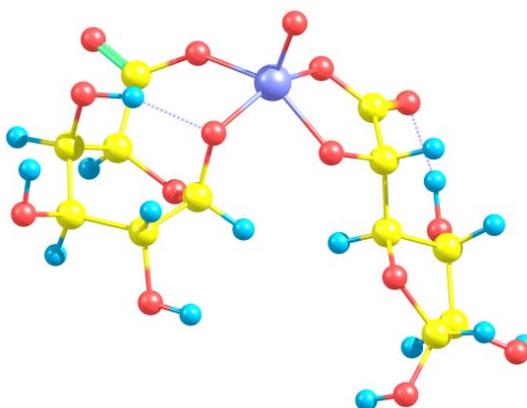
H	-4.842822	-1.655943	2.753190
C	-1.169599	-0.884391	-0.293064
H	3.184513	-1.258151	1.293382
O	2.081815	1.741104	-2.616184
O	-0.337949	-2.269080	3.282198
O	3.536220	0.572941	3.387536
C	-2.368401	0.737750	2.942869
O	-1.191271	0.404676	3.482644
C	-2.561189	0.186976	1.529700
O	-1.352978	-0.544348	1.202787
O	1.387919	-0.084714	3.573859
C	2.535183	0.053529	2.909602
O	1.133368	-1.016933	1.317481
C	2.419927	-0.466385	1.466709

Cr	-0.065733	-0.859414	2.655464
O	-3.197294	1.428861	3.506670
C	2.620999	0.677264	0.459771
C	4.079726	1.120714	0.244539
C	3.994089	1.748062	-1.155183
C	2.928091	0.916274	-1.888088
O	2.201060	0.199808	-0.831474
O	4.571298	2.041869	1.188910
O	5.196798	1.739473	-1.895512
H	3.587277	2.780678	-1.033549
H	1.631382	1.201927	-3.296867
H	3.394125	0.133923	-2.524414
H	4.722430	0.208713	0.169793
H	-2.654864	1.028582	0.813795
C	-3.772816	-0.739207	1.373128
C	-3.570708	-1.663646	0.112867
C	-2.583428	-1.059848	-0.897767
H	-4.668511	-0.101622	1.242965
O	-3.895150	-1.565244	2.530966
H	-0.612627	-1.835309	-0.232258
O	-0.526824	0.124660	-0.928777
H	-4.556538	-1.774851	-0.396884
O	-3.055616	-2.915804	0.519800

O	-3.107313	0.168397	-1.365185
H	-2.452171	-1.789995	-1.732170
H	0.475552	0.043446	-0.869690
H	-3.309912	-2.974018	1.474903
H	-2.360897	0.633646	-1.803105
H	2.005736	1.556377	0.767958
H	4.525878	1.593121	2.067206
H	5.803228	2.377127	-1.469520

**[Cr^VO(*O*¹,*O*⁶- galactopiranuronato)(*O*⁵,*O*⁵- galactofuranuronato)]⁻ –
estructura Iva. *S*-chiralidad sobre centro de C¹ .**

Energía Total = -71826.78924 eV



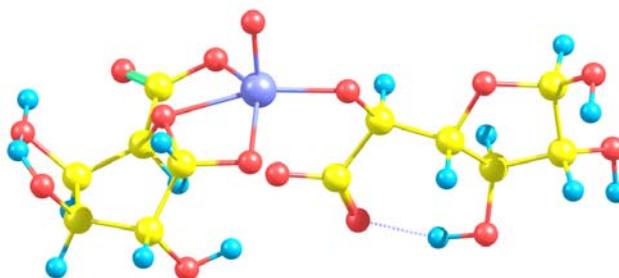
O	-1.171500	-0.515148	3.542011
O	-1.635496	0.370228	0.917425
H	-2.775821	-2.236410	1.832398
C	-1.382923	-0.879860	0.265746
H	3.355739	-1.051833	1.289356
O	2.844413	0.895833	-3.209754
O	0.439548	-2.801920	3.223790
O	3.223267	1.033678	3.180482
C	-2.339443	0.048952	3.298952
C	-2.741117	0.326437	1.833989
O	1.337550	-0.161392	3.391468
C	2.391690	0.244017	2.720049
O	1.291241	-1.151937	1.130949

C	2.458548	-0.385679	1.317023
Cr	0.153400	-1.420764	2.529805
O	-3.110739	0.364103	4.203196
C	2.606270	0.662101	0.201602
C	3.930674	1.459273	0.215161
C	4.026848	1.873362	-1.254769
C	3.488476	0.638828	-1.999707
O	2.607235	-0.018326	-1.063629
O	3.966952	2.575821	1.070875
O	5.322892	2.197710	-1.712896
H	3.311697	2.721410	-1.408401
H	2.160366	1.579758	-3.050792
H	4.326148	-0.048723	-2.251795
H	4.771935	0.749492	0.419817
H	-3.174931	1.346978	1.822301
C	-3.857980	-0.675135	1.424276
C	-3.917457	-0.811042	-0.105987
C	-2.558058	-1.294283	-0.666373
H	-4.825514	-0.275383	1.787411
O	-3.722100	-1.974477	2.007032
O	-1.147309	-1.869526	1.227038
H	-0.470949	-0.696982	-0.344787
H	-4.112677	0.185400	-0.556953

O	-4.988821	-1.666530	-0.475138
O	-2.409880	-0.726981	-1.961450
H	-2.567223	-2.407074	-0.712084
H	-4.936146	-2.411082	0.165296
H	-1.697956	-1.213772	-2.421403
H	1.745354	1.371028	0.266312
H	3.865740	2.196973	1.982686
H	5.608058	2.994877	-1.223529

**[Cr^VO(*O*¹,*O*⁶- galactopiranuronato)(*O*⁵,*O*⁵- galactofuranuronato)]⁻ –
estructura Ivb. *R*-quiralidad sobre centro C¹.**

Energía Total = -71825.34647 eV



O	-2.171265	-1.779966	1.140035
H	-4.087216	-1.858749	3.801036
C	-2.461024	-1.430282	-0.266889
H	2.619227	-0.002669	1.608528
O	5.902482	-0.390183	-2.033730
O	0.101919	-3.177740	0.746240
O	1.133298	2.385308	1.122516
C	-1.510191	-1.159695	3.271123
O	-0.318321	-1.487102	2.800697
C	-2.471276	-0.762211	2.147229
O	-0.220078	0.585661	1.116157
C	0.915492	1.161366	0.980389
O	1.466248	-1.057287	0.248440
C	2.053292	0.148906	0.653628
Cr	-0.174707	-1.617212	0.814641

O	-1.813043	-1.142102	4.464365
C	3.052203	0.630334	-0.409609
C	3.884423	1.876309	-0.027688
C	5.113231	1.684366	-0.918371
C	5.332385	0.162678	-0.885570
O	4.033423	-0.404501	-0.618339
O	3.264977	3.115949	-0.251343
O	6.280826	2.361462	-0.499462
H	4.818462	1.979047	-1.958164
H	5.395955	-0.070779	-2.809846
H	6.023702	-0.105600	-0.055812
H	4.222709	1.761072	1.035010
H	-2.103711	0.219303	1.783230
C	-3.971461	-0.623638	2.287349
C	-4.585246	-0.595085	0.823061
C	-3.530444	-0.315985	-0.294738
H	-4.171609	0.350785	2.784199
O	-4.606503	-1.686725	2.986936
H	-2.862620	-2.366739	-0.710048
O	-1.202902	-1.084047	-0.734337
H	-5.336842	0.226638	0.780399
O	-5.185636	-1.843680	0.526796
O	-2.957513	0.971414	-0.142085

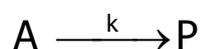
H	-4.067376	-0.397378	-1.268592
H	-5.228695	-2.311124	1.396280
H	-1.991115	0.868135	-0.315300
H	2.494868	0.836567	-1.355476
H	2.430142	3.059567	0.301596
H	6.084528	3.318610	-0.541479

Anexo 1

Deducción de

ecuaciones

Dada la reacción del reactivo A para dar producto P:



Se desea determinar el valor de constante de velocidad de esta reacción. Los experimentos realizados a tal fin, se llevan adelante mediante la medición de la variación de una propiedad en el tiempo relacionada con la concentración: la absorbancia, así se definen:

[] = concentración

P = propiedad (absorbancia)

t = tiempo

Entonces, la [A] se relaciona con la propiedad P de la siguiente manera:

$$A \text{ a } t_0 \rightarrow [A]_0 \rightarrow P_0 = \alpha [A]_0 \quad (1)$$

$$A \text{ a } t_\infty \rightarrow [A]_\infty \rightarrow P_\infty = \beta [A]_0 \quad (2)$$

$$A \text{ a } t_t \rightarrow [A]_t \rightarrow P_t = \alpha [A]_t + \beta [P] = \alpha ([A]_0 - [P]) + \beta [P] \quad (3)$$

a) Haciendo $(t_0 - t_\infty)$ (ec. 1 – ec. 2), se obtiene:

$$P_0 - P_\infty = \alpha [A]_0 - \beta [A]_0 = [A]_0 (\alpha - \beta) \quad (4)$$

y $[A]_0$ resulta:

$$[A]_0 = \frac{P_0 - P_\infty}{\alpha - \beta} \quad (5)$$

b) Haciendo $(t_t - t_\infty)$ (ec. 3 – ec. 2), se obtiene:

$$P_t - P_\infty = [\alpha ([A]_0 - [P]) + \beta [P]] - (\beta [A]_0) = \alpha [A]_0 - \alpha [P] + \beta [P] - \beta [A]_0$$

$$P_t - P_\infty = (\alpha - \beta) [A]_0 + [P] (\beta - \alpha) = (\alpha - \beta) ([A]_0 - [P]) = (\alpha - \beta) CA_t$$

y $[A]_t$ resulta:

$$[A]_t = \frac{P_t - P_\infty}{\alpha - \beta} \quad (6)$$

c) Haciendo $(t_0 - t_\infty)$ (ec. 1 – ec. 3), se obtiene:

$$P_0 - P_t = \alpha [A]_0 - \{\alpha ([A]_0 - [P]) + \beta [P]\} = \alpha [A]_0 - \{\alpha CA_t + \beta [P]\}$$

$$P_0 - P_t = \alpha [A]_0 - \alpha [A]_0 + \alpha [P] + \beta [P] = \alpha [P] + \beta [P] = (\alpha - \beta) [P]$$

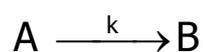
y [P] resulta:

$$[P] = \frac{P_0 - P_t}{\alpha - \beta} \quad (7)$$

Así, aplicando las ec. 5, 6 o 7 en la ecuación de medición, se logra expresar una concentración en función de propiedades mensurables.

Deducción de la ecuación de ajuste de los datos de absorbancia vs tiempo para la reacción Cr^{IV}/sacárido

Dada la reacción:



En este caso tenemos que:

A = [Cr^{IV}]; B = [CrO₂²⁺] y k es la constante de velocidad de la reacción Cr^{IV}/sacárido, entonces, la velocidad de desaparición de A se deduce como:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k [A] \quad (8)$$

Reordenando los términos:

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k dt \quad (9)$$

Integrando miembro a miembro, se llega a una expresión logarítmica (ec. 11)

o su forma exponencial (ec. 12):

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_0^t dt \quad (10)$$

$$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - k t \quad (11)$$

$$[A]_t = [A]_0 e^{-kt} \quad (12)$$

Reemplazando $[A]_t$ y $[A]_0$, por las ec. 5 y 6, y trabajando matemáticamente, se llega a la ec. 10:

$$\frac{P_t - P_\infty}{\alpha - \beta} = \frac{P_0 - P_\infty}{\alpha - \beta} e^{-kt}$$

$$P_t - P_\infty = (P_0 - P_\infty) e^{-kt}$$

$$P_t = P_\infty + (P_0 - P_\infty) e^{-kt} \quad (13)$$

En nuestros estudios cinéticos de la oxidación sacáridos por Cr^{IV} , la propiedad P medida es la absorbancia a 290 nm, Abs , resultando, la ec. 14, que es igual a la ec. 3.5:

$$\text{Abs}_t = \text{Abs}_\infty + (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_\infty) e^{-kt} \quad (14)$$

Deducción de la ecuación velocidad para la desaparición de la especie Cr^{VI}

Considerando la secuencia de reacciones propuesta en el esquema 5.2, la velocidad de desaparición de la especie Cr^{VI} está dada por:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = 2k_{6\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{VI}}] \quad (15)$$

Reordenando los términos:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{[\text{Cr}^{\text{VI}}]} = -2k_{6\text{exp}} dt \quad (16)$$

Integrando miembro a miembro, se llega a una expresión logarítmica (ec. 18) o su forma exponencial (ec. 19), que representa la velocidad de desaparición de Cr^{VI} :

$$\int_{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0}^{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_t} \frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{[\text{Cr}^{\text{VI}}]} = -2k_{6\text{exp}} \int_0^t dt \quad (17)$$

$$\ln [\text{Cr}^{\text{VI}}]_t = \ln [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 - 2k_{6\text{exp}} t \quad (18)$$

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_t = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-2k_{6\text{exp}} t} \quad (19)$$

Deducción de la ecuación velocidad para la desaparición de la especie Cr^V

Considerando la secuencia de reacciones propuesta en el esquema 5.2, que considera la velocidad de desaparición de la especie Cr^V como una etapa lenta, la misma está dada por:

$$-\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = k_{6\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{VI}}] - k_{5\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (20)$$

Reordenando los términos:

$$d[\text{Cr}^{\text{V}}] = k_{6\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{VI}}]dt - k_{5\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{V}}]dt \quad (21)$$

$$d[\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{5\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{V}}]dt = k_{6\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{VI}}] dt \quad (22)$$

Reemplazando $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0$ por la ec. 22:

$$d[\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{5\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{V}}]dt = k_{6\text{exp}}[\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-2k_{6\text{exp}}t} dt \quad (23)$$

Utilizando el factor de integración, $e^{k_{5\text{exp}}t}$, y reordenando:

$$e^{k_{5\text{exp}} t} d[\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{5\text{exp}} e^{k_{5\text{exp}} t} [\text{Cr}^{\text{V}}] dt = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-2k_{6\text{exp}} t} e^{k_{5\text{exp}} t} dt \quad (24)$$

$$e^{k_{5\text{exp}} t} d[\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{5\text{exp}} e^{k_{5\text{exp}} t} [\text{Cr}^{\text{V}}] dt = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{(k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}})t} dt \quad (25)$$

Si,

$$e^{k_{5\text{exp}} t} d[\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{5\text{exp}} e^{k_{5\text{exp}} t} [\text{Cr}^{\text{V}}] dt = d(\text{Cr}^{\text{V}} e^{k_{5\text{exp}} t}) \quad (26)$$

Entonces, la ec. 26, se vuelve:

$$d([\text{Cr}^{\text{V}}] e^{k_{5\text{exp}} t}) = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{(k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}})t} dt \quad (27)$$

Finalmente, integrando entre 0 y t:

$$\int_0^t d([\text{Cr}^{\text{V}}] e^{k_{5\text{exp}} t}) = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \int_0^t e^{(k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}})t} dt \quad (28)$$

$$[\text{Cr}^{\text{V}}] e^{k_{5\text{exp}} t} = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{e^{(k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}})t} - 1}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \quad (29)$$

$$[\text{Cr}^{\text{V}}] = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{(e^{(k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}})t} - 1)e^{k_{5\text{exp}} t}}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \quad (30)$$

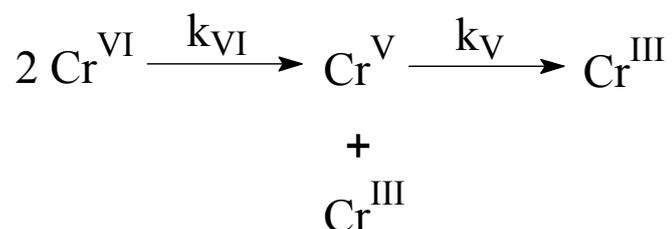
$$[\text{Cr}^{\text{V}}] = k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{e^{-2k_{6\text{exp}} t} - e^{-k_{5\text{exp}} t}}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \quad (31)$$

La ec. 31 representa la velocidad de desaparición de la especie Cr^{V} , según el esquema 5.2; y además, tiene la misma forma que las ec. 5.29, 5.42 y 5.45, utilizadas para el ajuste de los datos experimentales de RPE de GHL, Galur y Glucar, respectivamente.

**Deducción de la ecuación de ajuste de los datos de
absorbancia a 350 nm para la reacción Cr^{VI} /GHL y
 Cr^{VI} /Galur**

Considerando:

a) la secuencia de reacciones del esquema 5.2, en el que se propone la formación de especies de Cr^{V} como intermediario del proceso redox,



b) que las especies de Cr^{V} y Cr^{VI} absorben a 350 nm, valor de longitud de onda a la elegida para el seguimiento cinético de las reacciones de oxidación crómica de sacáridos.

Entonces, la absorbancia a 350 nm provendrá de la contribución de las especies de Cr^{VI} y Cr^{V} . A cualquier tiempo durante la reacción redox, la absorbancia a 350 nm está dada por la ec. 15:

$$\text{Abs}_{350} = \varepsilon^{\text{VI}} [\text{Cr}^{\text{VI}}] + \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (32)$$

La ec. 32 puede escribirse como:

$$\text{Abs}_{350} = \varepsilon^{\text{VI}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-2k_{6\text{exp}} t} + \varepsilon^{\text{V}} k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{e^{-2k_{6\text{exp}} t} - e^{-k_{5\text{exp}} t}}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \quad (33)$$

Donde ($\epsilon^{\text{VI}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]$) es la absorbancia inicial, debida a la especie Cr^{VI} y el segundo término refleja la absorbancia debida a la especie Cr^{V} . Así, la ec. 33 puede escribirse como:

$$\text{Abs}_{350} = \text{Abs}_0 e^{-2k_{6\text{exp}} t} + k_{6\text{exp}} \epsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{(e^{-k_{5\text{exp}} t} - e^{-2k_{6\text{exp}} t})}{2k_{6\text{exp}} - k_{5\text{exp}}} \quad (34)$$

El primer término refleja la velocidad de desaparición de la especie Cr^{VI} , debida a las dos rutas paralelas, mientras que el segundo término refleja los cambios en la concentración de la especie Cr^{V} en el tiempo. Dado que en el esquema 5.2 existen dos vías de consumo de Cr^{VI} , la constante de velocidad $k_{6\text{exp}}$, está multiplicada por un factor de dos en el primer término y en el denominador y el exponencial del segundo término.

La ec. 34 tiene la misma forma que las ec. 5.20 y 5.33, utilizadas para los ajustes de los datos experimentales de los cambios de absorbancia, a 350 nm, en el tiempo de las mezclas de reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$ y $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$, respectivamente.

**Deducción de la ecuación de ajuste de los datos de
absorbancia a 570 nm para el seguimiento de la especie**

Cr^{III}

Considerando:

- a) la secuencia de reacciones del esquema 5.2, en el que se propone la formación de especies de Cr^V como intermediario del proceso redox,
- b) que las especies de Cr^V y Cr^{III} absorben a 570 nm, entonces, la absorbancia a 570 nm provendrá en parte de la absorbancia de las especies de Cr^V y en parte de la absorbancia de las especies de Cr^{III}. A cualquier tiempo durante la reacción redox, la absorbancia a 570 nm está dada por la ec. 35:

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{III}} [\text{Cr}^{\text{III}}] + \varepsilon^{\text{V}} [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (35)$$

Reemplazando la [Cr^V], la ec. 35 puede escribirse como:

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{III}} [\text{Cr}^{\text{III}}] + \varepsilon^{\text{V}} k_{6 \text{ exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{e^{-2k_{6 \text{ exp}} t} - e^{-k_{5 \text{ exp}} t}}{k_{5 \text{ exp}} - 2k_{6 \text{ exp}}} \quad (36)$$

Considerando que:

$$[\text{Cr}^{\text{III}}]_t = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 - [\text{Cr}^{\text{VI}}] - [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (37)$$

Reemplazando $[\text{Cr}^{\text{V}}]$ y $[\text{Cr}^{\text{VI}}]$, y trabajando matemáticamente:

$$[\text{Cr}^{\text{III}}]_t = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 - [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 e^{-2k_{6\text{exp}} t} - k_{6\text{exp}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \frac{e^{-2k_{6\text{exp}} t} - e^{-k_{5\text{exp}} t}}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \quad (38)$$

$$[\text{Cr}^{\text{III}}]_t = [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \left(1 - e^{-2k_{6\text{exp}} t} - k_{6\text{exp}} \frac{e^{-2k_{6\text{exp}} t} - e^{-k_{5\text{exp}} t}}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \right) \quad (39)$$

Reemplazando en la ec. 36, y trabajando matemáticamente, se obtiene la ec. 40, la que tiene la misma forma que las ec. 5.31 y 5.44, utilizadas para el estudio cinético, a 570 nm, de las mezclas de reacción $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{GHL}$ y $\text{Cr}^{\text{VI}}/\text{Galur}$, respectivamente:

$$\text{Abs}_{570} = \varepsilon^{\text{III}} [\text{Cr}^{\text{VI}}]_0 \left(1 - e^{-2k_{6\text{exp}} t} + (\varepsilon^{\text{V}} - \varepsilon^{\text{III}}) k_{6\text{exp}} \frac{e^{-2k_{6\text{exp}} t} - e^{-k_{5\text{exp}} t}}{k_{5\text{exp}} - 2k_{6\text{exp}}} \right) \quad (40)$$

Siendo la constante de equilibrio, K^{VI} :

$$K^{VI} = \frac{[\text{ester}]}{[\text{GHL}] [\text{HCrO}_4^-]} \quad (42)$$

la concentración del ester crómico resulta:

$$[\text{ester}] = K^{VI} [\text{GHL}] [\text{HCrO}_4^-] \quad (43)$$

La velocidad de desaparición de Cr^{VI} , dada por:

$$\frac{d[\text{Cr}^{VI}]}{dt} = k_{VI} [\text{H}^+]^2 [\text{ester}] \quad (44)$$

Reemplazando por la $[\text{ester}]$, queda expresada como:

$$\frac{d[\text{Cr}^{VI}]}{dt} = k_{VI} [\text{H}^+]^2 K^{VI} [\text{GHL}] [\text{HCrO}_4^-] \quad (45)$$

En todo momento de la reacción, la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} = [\text{HCrO}_4^-] + [\text{ester}] \quad (46)$$

Reemplazando la $[\text{ester}]$, y trabajando matemáticamente, la $[\text{HCrO}_4^-]$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} = [\text{HCrO}_4^-] + K^{\text{VI}}[\text{GHL}] [\text{HCrO}_4^-] = [\text{HCrO}_4^-](1 + K^{\text{VI}}[\text{GHL}]) \quad (47)$$

$$[\text{HCrO}_4^-] = \frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{(1 + K^{\text{VI}}[\text{GHL}])} \quad (48)$$

Reemplazando en la ec. de velocidad, resulta:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}}[\text{H}^+]^2 K^{\text{VI}}[\text{GHL}] \frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{(1 + K^{\text{VI}}[\text{GHL}])} \quad (49)$$

Si $(K^{\text{VI}}[\text{GHL}]) \ll 1$, la ecuación se reduce a:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}} K^{\text{VI}}[\text{H}^+]^2 [\text{GHL}][\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} \quad (50)$$

La constante de equilibrio K_2^V es igual a:

$$K_2^V = \frac{[\text{Cr}^V - \text{S}_2]}{[\text{S}] [\text{Cr}^V - \text{S}]} \quad (54)$$

Entonces, la concentración del complejo bisquelato, $\text{Cr}^V\text{-S}_2$, resulta:

$$[\text{Cr}^V - \text{S}_2] = K_2^V [\text{S}] [\text{Cr}^V - \text{S}] \quad (55)$$

Reemplazando la concentración de la especie monoquelato, se llega a:

$$[\text{Cr}^V - \text{S}_2] = K_2^V K_1^V [\text{S}]^2 [\text{Cr}^V] \quad (56)$$

La velocidad de desaparición de Cr^V , dada por:

$$\frac{d[\text{Cr}^V]}{dt} = k_V^{\text{III}} [\text{S}] [\text{Cr}^V - \text{S}] + k_V^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 [\text{S}] [\text{Cr}^V - \text{S}_2] + k_V^{\text{I}} [\text{S}] [\text{Cr}^V - \text{S}] \quad (57)$$

Reemplazando la concentración de las especies bisquelato y monoquelato, se obtiene la ecuación:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = k_{\text{V}}^{\text{III}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^2 [\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^3 [\text{Cr}^{\text{V}}] + k_{\text{V}}^{\text{I}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^2 [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (58)$$

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = [\text{S}]^2 [\text{Cr}^{\text{V}}] (k_{\text{V}}^{\text{III}} K_1^{\text{V}} + k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}] + k_{\text{V}}^{\text{I}} K_1^{\text{V}} [\text{S}])$$

En todo momento de la reacción, la $[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} = [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{+}} + [\text{Cr}^{\text{V}} - \text{S}_2]_{\text{+}} + [\text{Cr}^{\text{V}} - \text{S}] \quad (59)$$

Reemplazando por las concentraciones de las especies mono y bisquelato y reordenando, se obtiene:

$$[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} = [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{+}} K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{S}] [\text{Cr}^{\text{V}}] \quad (60)$$

$$[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} = [\text{Cr}^{\text{V}}] (1 + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{S}])$$

Así, la $[\text{Cr}^{\text{V}}]$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{V}}] = \frac{[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{(1 + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{S}])} \quad (61)$$

Reemplazando en la ec. 60:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \frac{[\text{S}]^2 (k_{\text{V}}^{\text{III}} K_1^{\text{V}} + k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}] + k_{\text{V}}^{\text{I}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{(1 + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{S}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{S}])} \quad (62)$$

Considerando la selectividad para la oxidación de Galur, la ecuación se transforma en:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \frac{K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^3 (k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{V}}^{\text{I}}) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{HS}]} \quad (63)$$

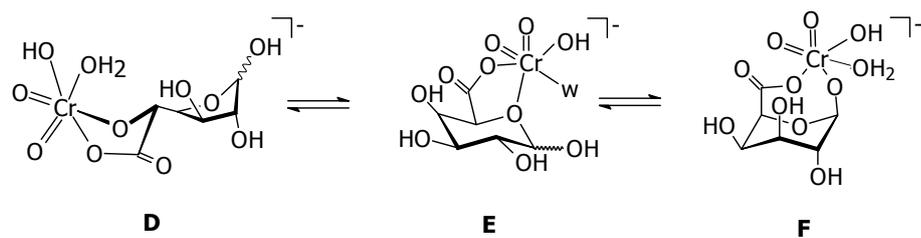
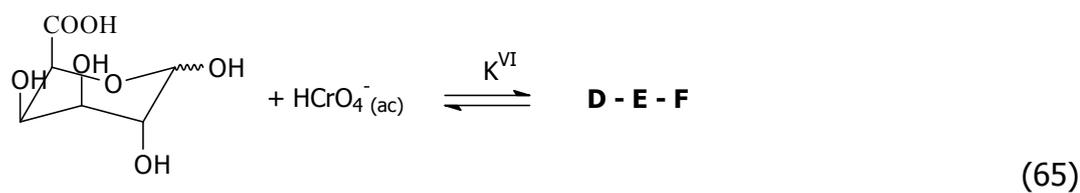
Si $(K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 \gg K_1^{\text{V}} [\text{HS}])$ la ecuación se reduce a:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = (k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{V}}^{\text{I}}) [\text{S}] [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} \quad (64)$$

B) Reacciones del mecanismo de oxidación Cr^{VI} /Galur

B.1) Velocidad de oxidación por Cr^{VI}

Dadas las siguientes reacciones, propuestas en el mecanismo de oxidación crómica de Galur:



Siendo la contante de equilibrio, K^{VI} :

$$K^{\text{VI}} = \frac{[\mathbf{F}]}{[\text{Galur}] [\text{HCrO}_4^-]} \quad (67)$$

la concentración de la especie F resulta:

$$[\mathbf{F}] = K^{\text{VI}} [\text{Galur}] [\text{HCrO}_4^-] \quad (68)$$

La velocidad de desaparición de Cr^{VI} , dada por:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}}[\text{H}^+]^2 [\text{F}] \quad (69)$$

Reemplazando por la $[\text{F}]$, queda expresada como:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}}[\text{H}^+]^2 K^{\text{VI}}[\text{Galur}] [\text{HCrO}_4^-] \quad (70)$$

En todo momento de la reacción, la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} = [\text{HCrO}_4^-] + [\text{F}] \quad (71)$$

Reemplazando la $[\text{F}]$, y trabajando matemáticamente, la $[\text{HCrO}_4^-]$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} = [\text{HCrO}_4^-] + K^{\text{VI}}[\text{Galur}] [\text{HCrO}_4^-] = [\text{HCrO}_4^-](1 + K^{\text{VI}}[\text{Galur}]) \quad (72)$$

$$[\text{HCrO}_4^-] = \frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{(1 + K^{\text{VI}}[\text{Galur}])} \quad (73)$$

Reemplazando en la ec. de velocidad, resulta:

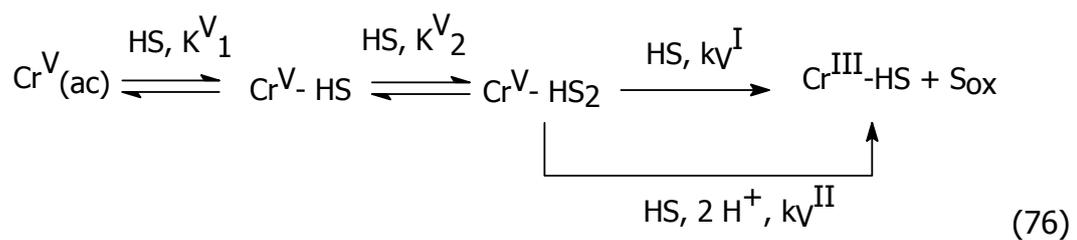
$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}}[\text{H}^+]^2 K^{\text{VI}}[\text{Galur}] \frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{(1 + K^{\text{VI}}[\text{Galur}])} \quad (74)$$

Si $(K^{\text{VI}}[\text{Galur}]) \ll 1$, la ecuación se reduce a:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}} K^{\text{VI}}[\text{H}^+]^2 [\text{Galur}][\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} \quad (75)$$

B.2) Velocidad de oxidación por Cr^V

Dadas las siguientes reacciones, propuestas en el mecanismo de oxidación crómica de Galur:



Siendo la constante de equilibrio, K_1^V :

$$K_1^V = \frac{[\text{Cr}^V - (\text{HS})]}{[\text{HS}] [\text{Cr}^V]} \quad (77)$$

la concentración de la especie monoquelato, $\text{Cr}^V - (\text{HS})$, resulta:

$$[\text{Cr}^V - (\text{HS})] = K_1^V [\text{HS}] [\text{Cr}^V] \quad (78)$$

La constante de equilibrio K_2^V es igual a:

$$K_2^V = \frac{[\text{Cr}^V - (\text{HS})_2]}{[\text{HS}] [\text{Cr}^V - (\text{HS})]} \quad (79)$$

Entonces, la concentración de la especie bisquelato, $\text{Cr}^V - (\text{HS})_2$ resulta:

$$[\text{Cr}^V - (\text{HS})_2] = K_2^V [\text{HS}] [\text{Cr}^V - (\text{HS})] \quad (80)$$

Reemplazando la concentración de la especie monoquelato, se llega a:

$$[\text{Cr}^V - (\text{HS})_2] = K_2^V K_1^V [\text{HS}]^2 [\text{Cr}^V] \quad (81)$$

La velocidad de desaparición de Cr^{V} , dada por:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} &= k_{\text{v}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 [\text{HS}] [\text{Cr}^{\text{V}} - (\text{HS})_2] + k_{\text{v}}^{\text{I}} [\text{HS}] [\text{Cr}^{\text{V}} - (\text{HS})_2] \\ \frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} &= [\text{Cr}^{\text{V}} - (\text{HS})_2] [\text{HS}] (k_{\text{v}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{v}}^{\text{I}}) \end{aligned} \quad (82)$$

Reemplazando la concentración del complejo bisquelato, se obtiene la ecuación:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^3 [\text{Cr}^{\text{V}}] (k_{\text{v}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{v}}^{\text{I}}) \quad (83)$$

En todo momento de la reacción, la $[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} = [\text{Cr}^{\text{V}}]_{+} + [\text{Cr}^{\text{V}} - (\text{HS})_2]_{+} + [\text{Cr}^{\text{V}} - (\text{HS})] \quad (84)$$

Reemplazando por las concentraciones de los complejos y reordenando, se obtiene:

$$\begin{aligned}
 [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} &= [\text{Cr}^{\text{V}}] + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 [\text{Cr}^{\text{V}}] + K_1^{\text{V}} [\text{HS}] [\text{Cr}^{\text{V}}] \\
 [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}} &= [\text{Cr}^{\text{V}}] (1 + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{HS}])
 \end{aligned}
 \tag{85}$$

Así, la $[\text{Cr}^{\text{V}}]$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{V}}] = \frac{[\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{(1 + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{HS}])}
 \tag{86}$$

Reemplazando en la ec. 85:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \frac{K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^3 (k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{V}}^{\text{I}}) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{(1 + K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{HS}])}
 \tag{87}$$

Considerando la selectividad para la oxidación de Galur, la ecuación se transforma en:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{V}}]}{dt} = \frac{K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^3 (k_{\text{V}}^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_{\text{V}}^{\text{I}}) [\text{Cr}^{\text{V}}]_{\text{T}}}{K_2^{\text{V}} K_1^{\text{V}} [\text{HS}]^2 + K_1^{\text{V}} [\text{HS}]}
 \tag{88}$$

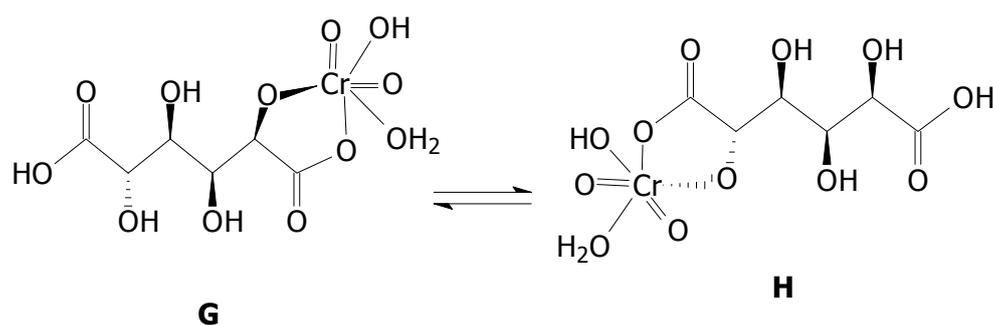
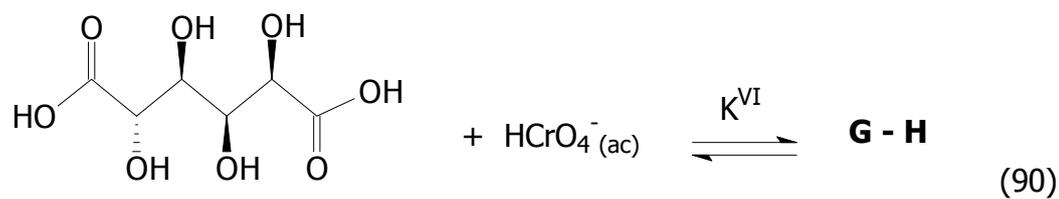
Si $(K_V^2 K_V^1 [\text{HS}]^2 \gg K_V^1 [\text{HS}])$ la ecuación se reduce a:

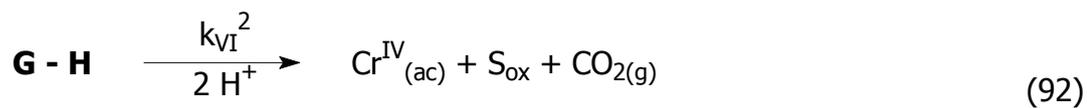
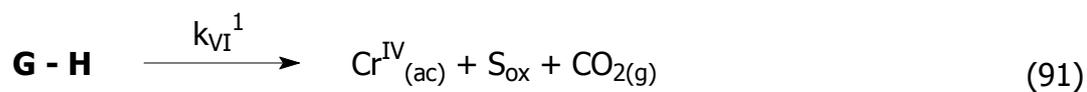
$$\frac{d[\text{Cr}^V]}{dt} = (k_V^{\text{II}} [\text{H}^+]^2 + k_V^{\text{I}}) [\text{HS}] [\text{Cr}^V]_{\text{T}} \quad (89)$$

C) Mecanismos de oxidación para la reacción Cr^{VI} /Glucar

Velocidad de oxidación por Cr^{VI}

Dadas las siguientes reacciones, propuestas en el mecanismo de oxidación crómica de Glucar:





Siendo la constante de equilibrio, K^{VI} :

$$K^{VI} = \frac{[\text{ester}]}{[\text{Glucar}] [\text{HCrO}_4^-]} \quad (93)$$

la concentración del ester crómico resulta:

$$[\text{ester}] = K^{VI} [\text{Glucar}] [\text{HCrO}_4^-] \quad (94)$$

La velocidad de desaparición de Cr^{VI} , dada por:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = k_{\text{VI}}^1 [\text{ester}] + k_{\text{VI}}^2 [\text{H}^+]^2 [\text{ester}]$$

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = [\text{ester}] (k_{\text{VI}}^1 + k_{\text{VI}}^2 [\text{H}^+]^2)$$
(95)

Reemplazando por la [ester], queda expresada como:

$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = K^{\text{VI}} [\text{Glucar}] [\text{HCrO}_4^-] (k_{\text{VI}}^1 + k_{\text{VI}}^2 [\text{H}^+]^2)$$
(96)

En todo momento de la reacción, la $[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} = [\text{HCrO}_4^-] + [\text{ester}]$$
(97)

Reemplazando la [ester], y trabajando matemáticamente, la $[\text{HCrO}_4^-]$ resulta:

$$[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} = [\text{HCrO}_4^-] + K^{\text{VI}} [\text{Glucar}] [\text{HCrO}_4^-] = [\text{HCrO}_4^-] (1 + K^{\text{VI}} [\text{Glucar}])$$
(98)

$$[\text{HCrO}_4^-] = \frac{[\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{(1 + K^{\text{VI}} [\text{Glucar}])}$$
(99)

Reemplazando en la ec. de velocidad, resulta:

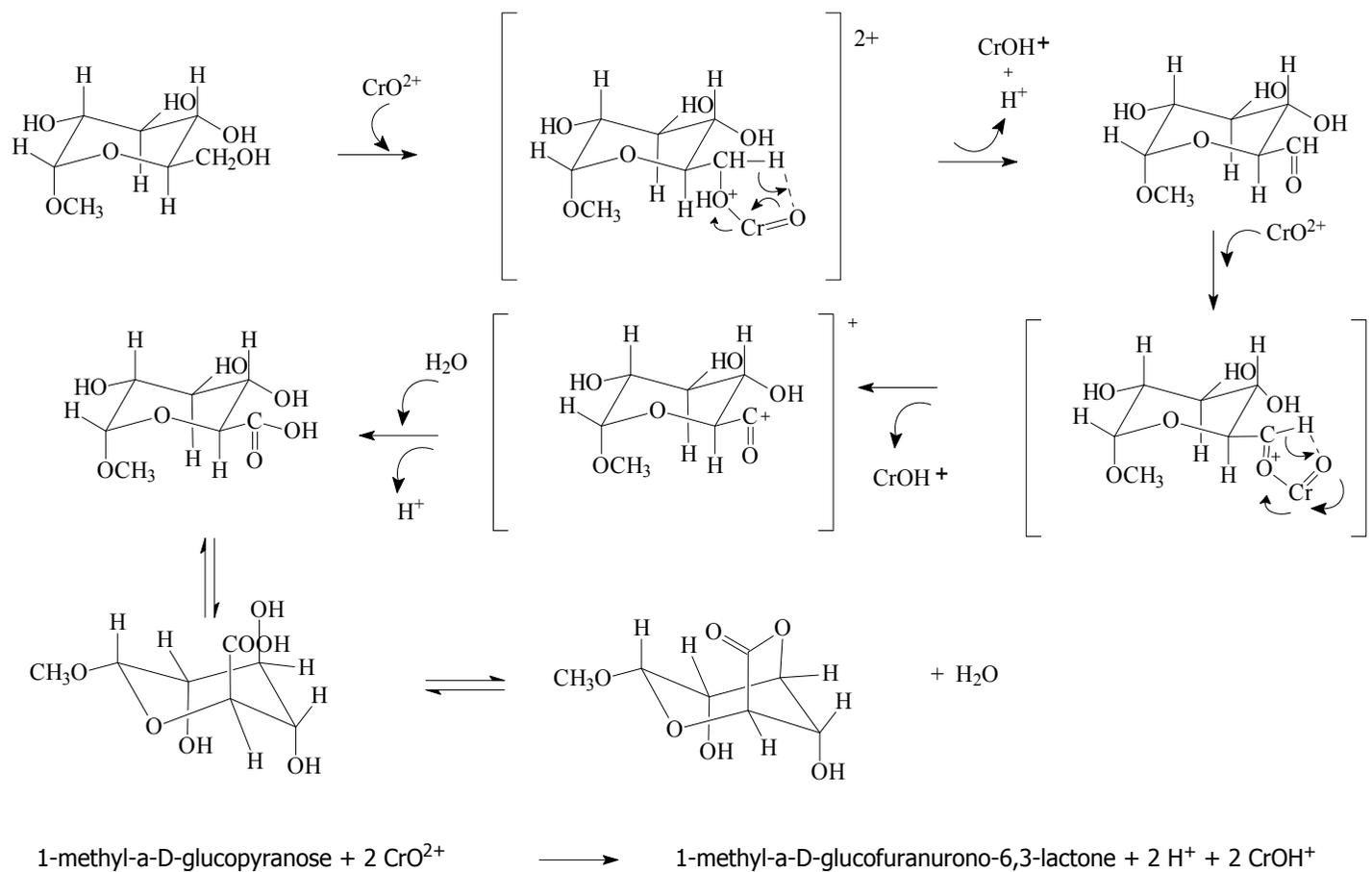
$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = \frac{K^{\text{VI}}[\text{Glucar}](k_{\text{VI}}^1 + k_{\text{VI}}^2 [\text{H}^+]^2) [\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}}}{(1 + K^{\text{VI}}[\text{Glucar}])} \quad (100)$$

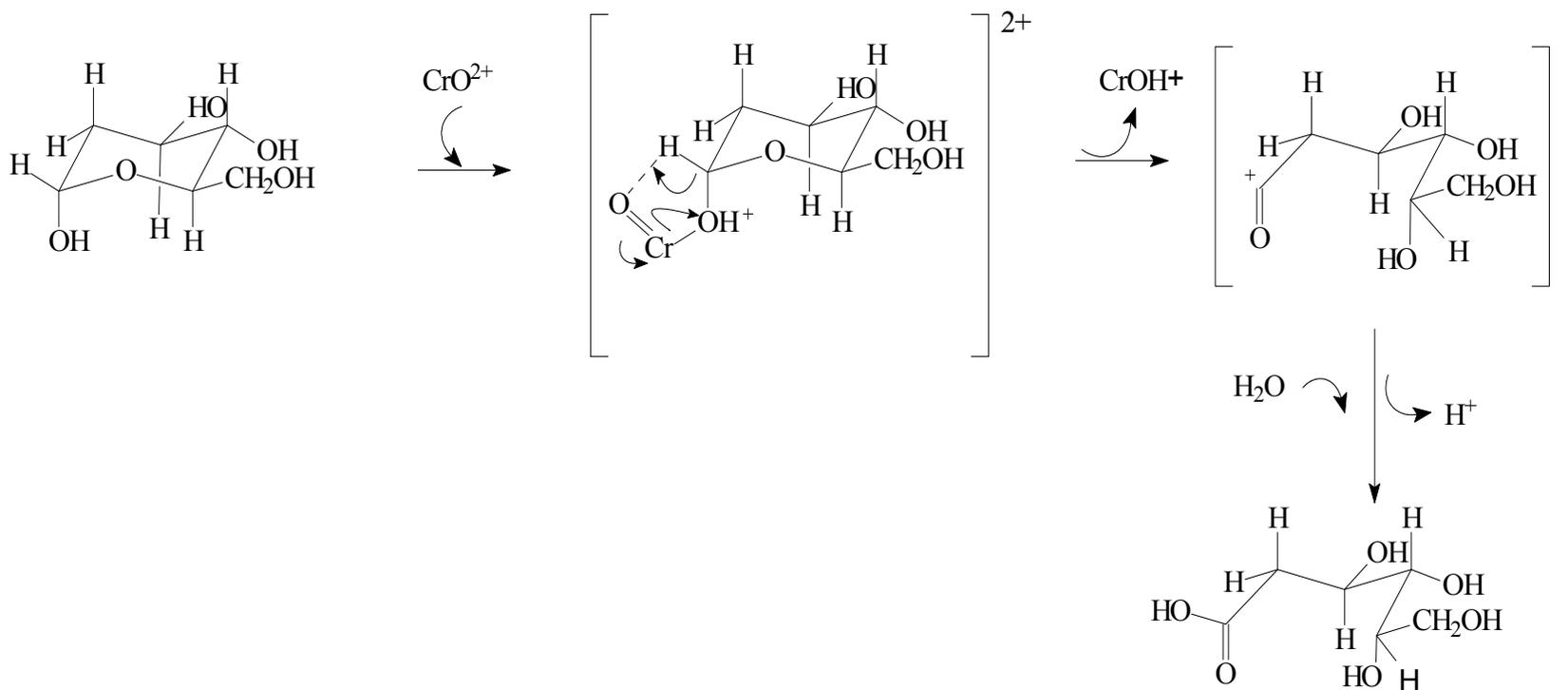
Si $(K^{\text{VI}} [\text{Glucar}]) \ll 1$, la ecuación se reduce a:

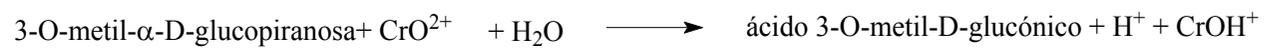
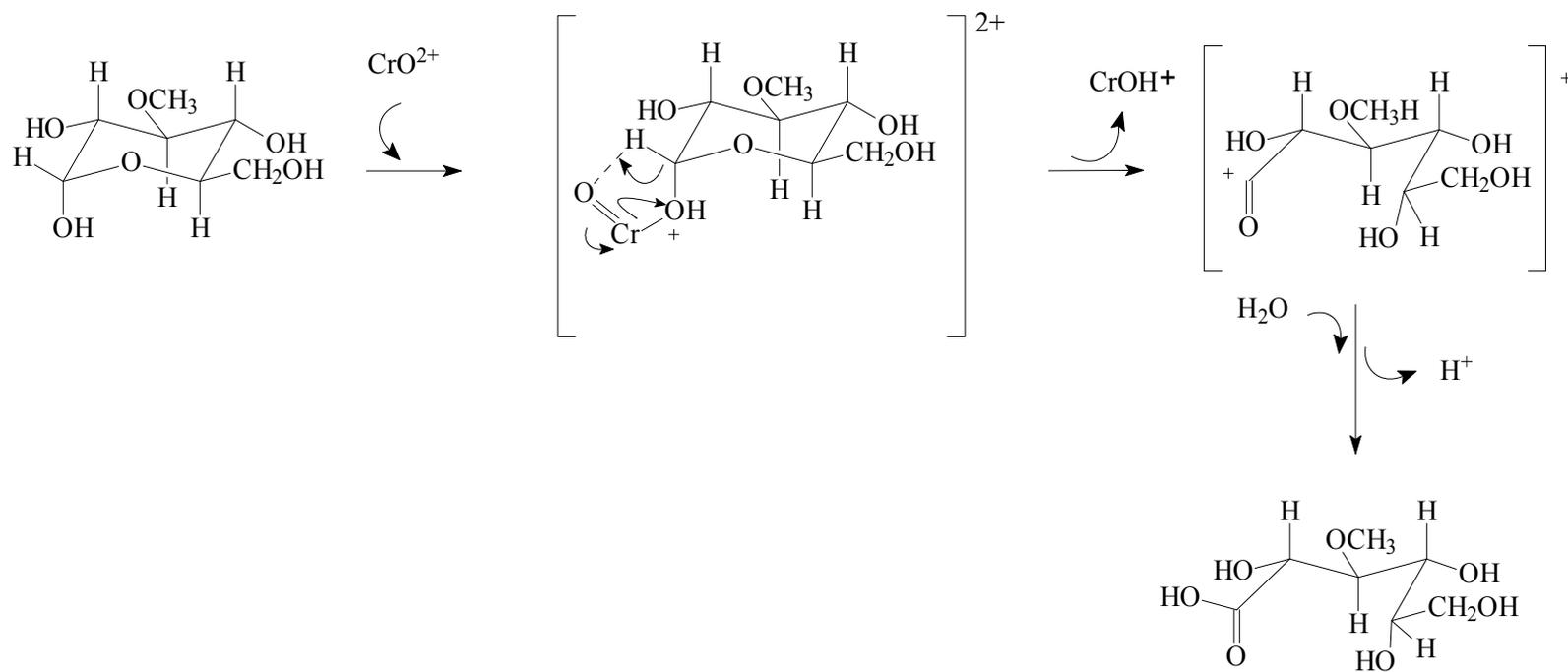
$$\frac{d[\text{Cr}^{\text{VI}}]}{dt} = (k_{\text{VI}}^1 + k_{\text{VI}}^2 [\text{H}^+]^2) [\text{Cr}^{\text{VI}}]_{\text{T}} \quad (101)$$

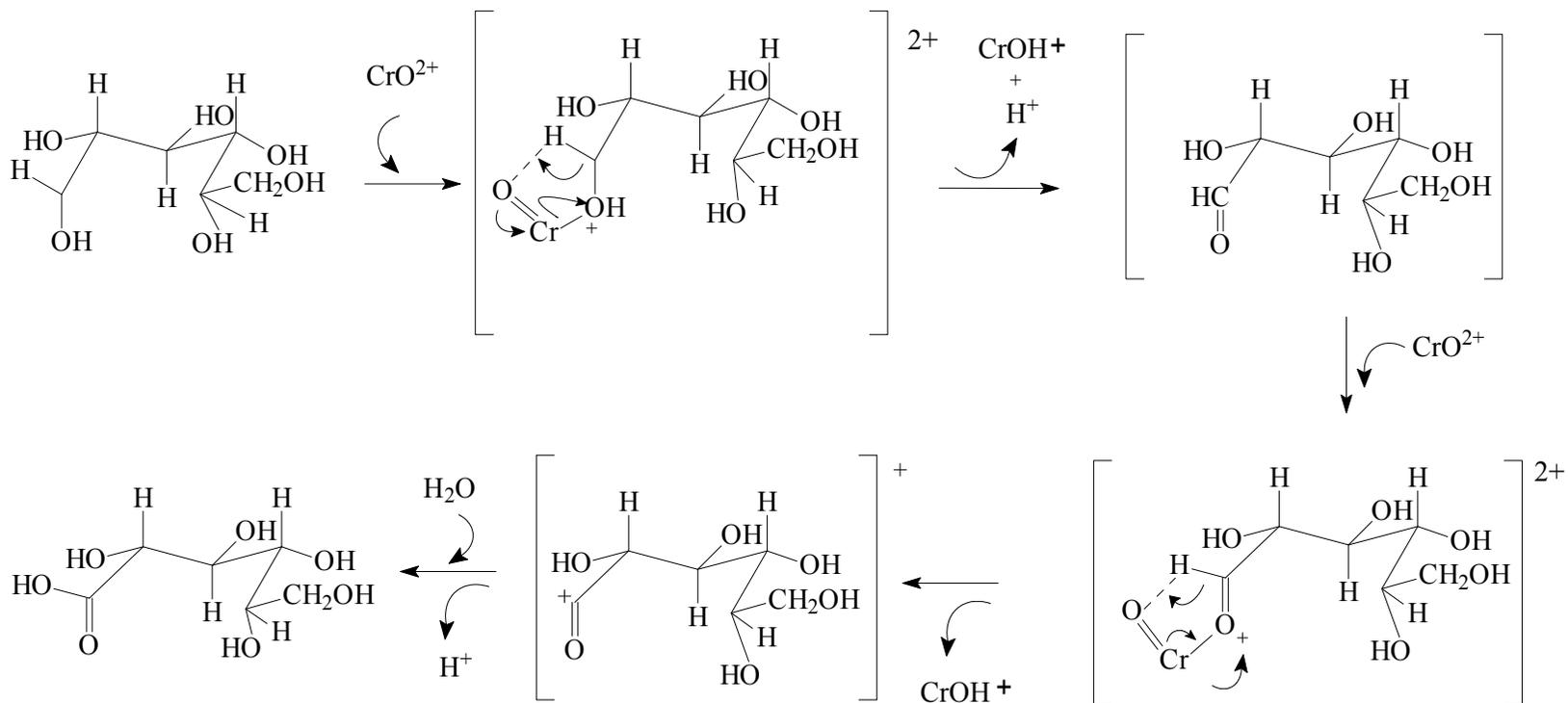
Anexo 2

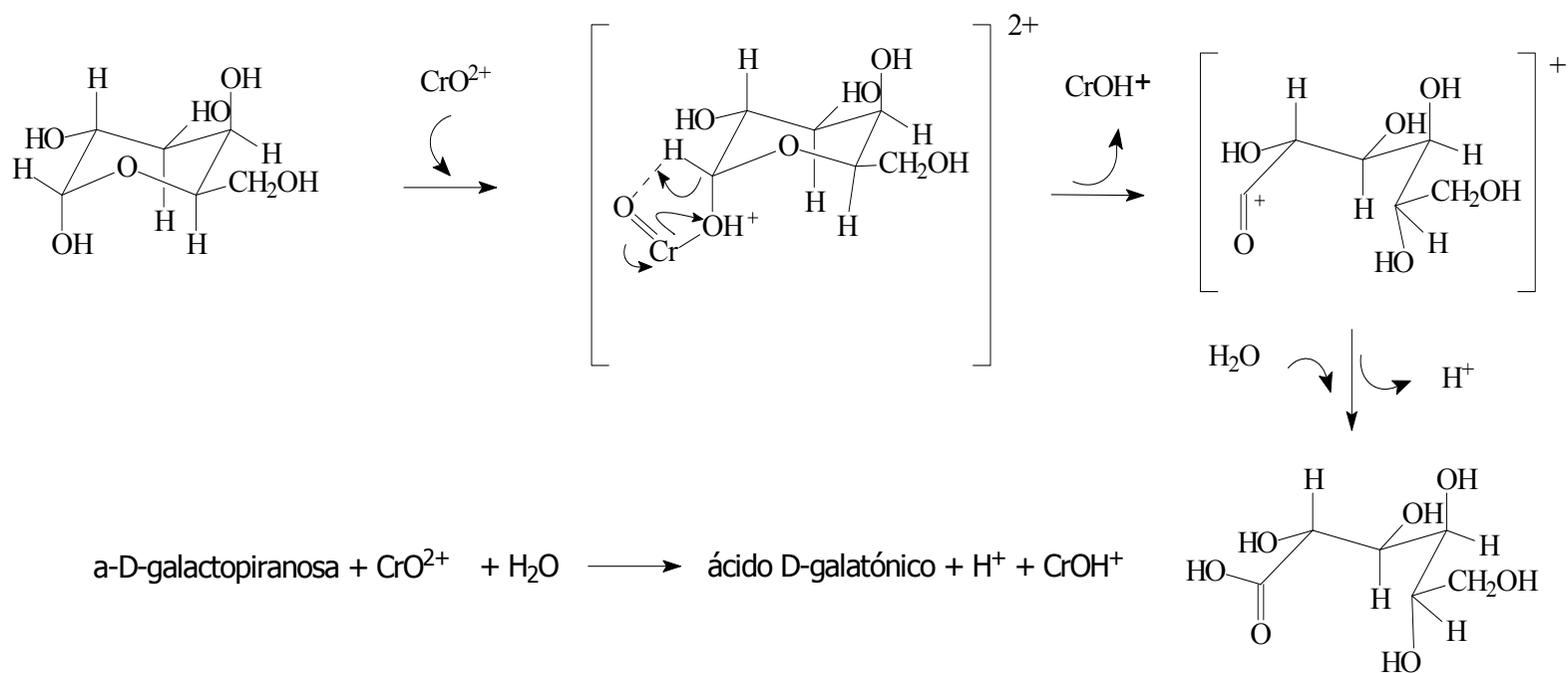
*Mecanismos de reacción propuestos
para las reacciones Cr^{IV} /sacárido*

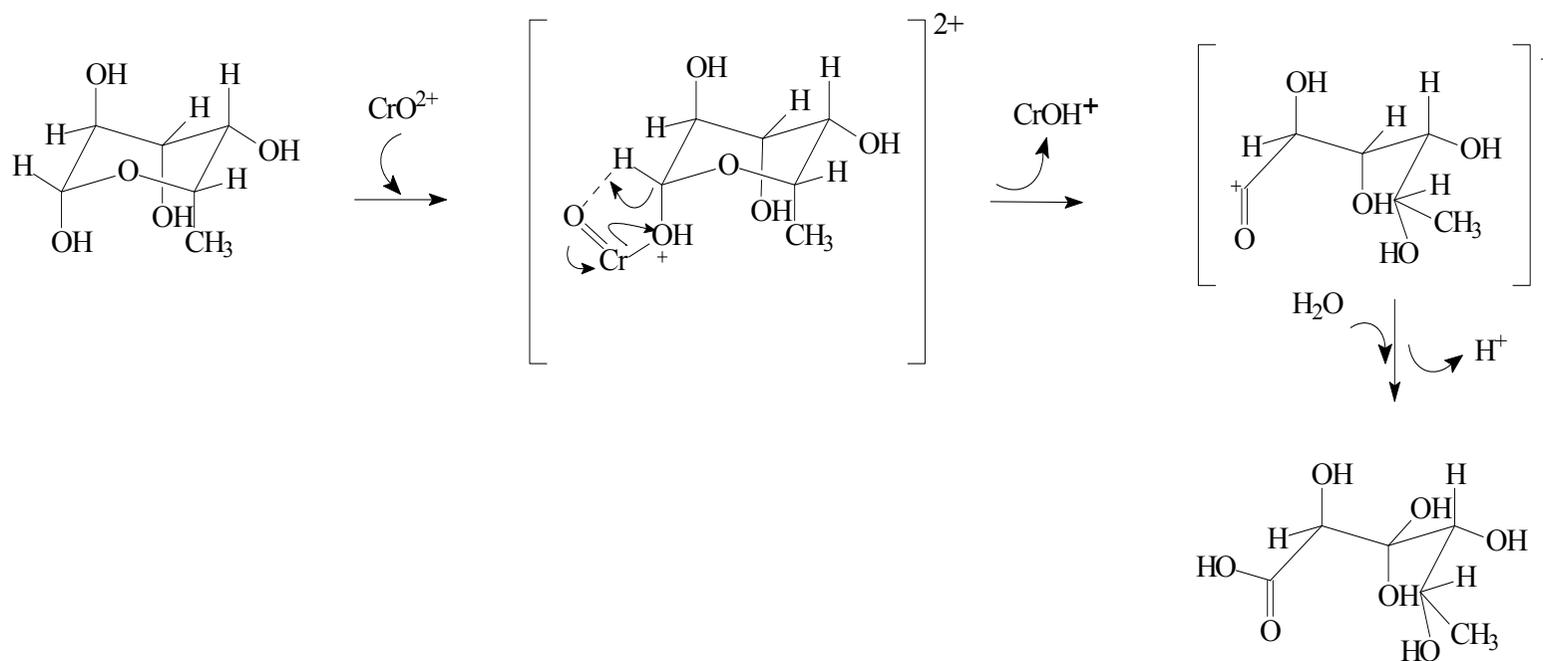


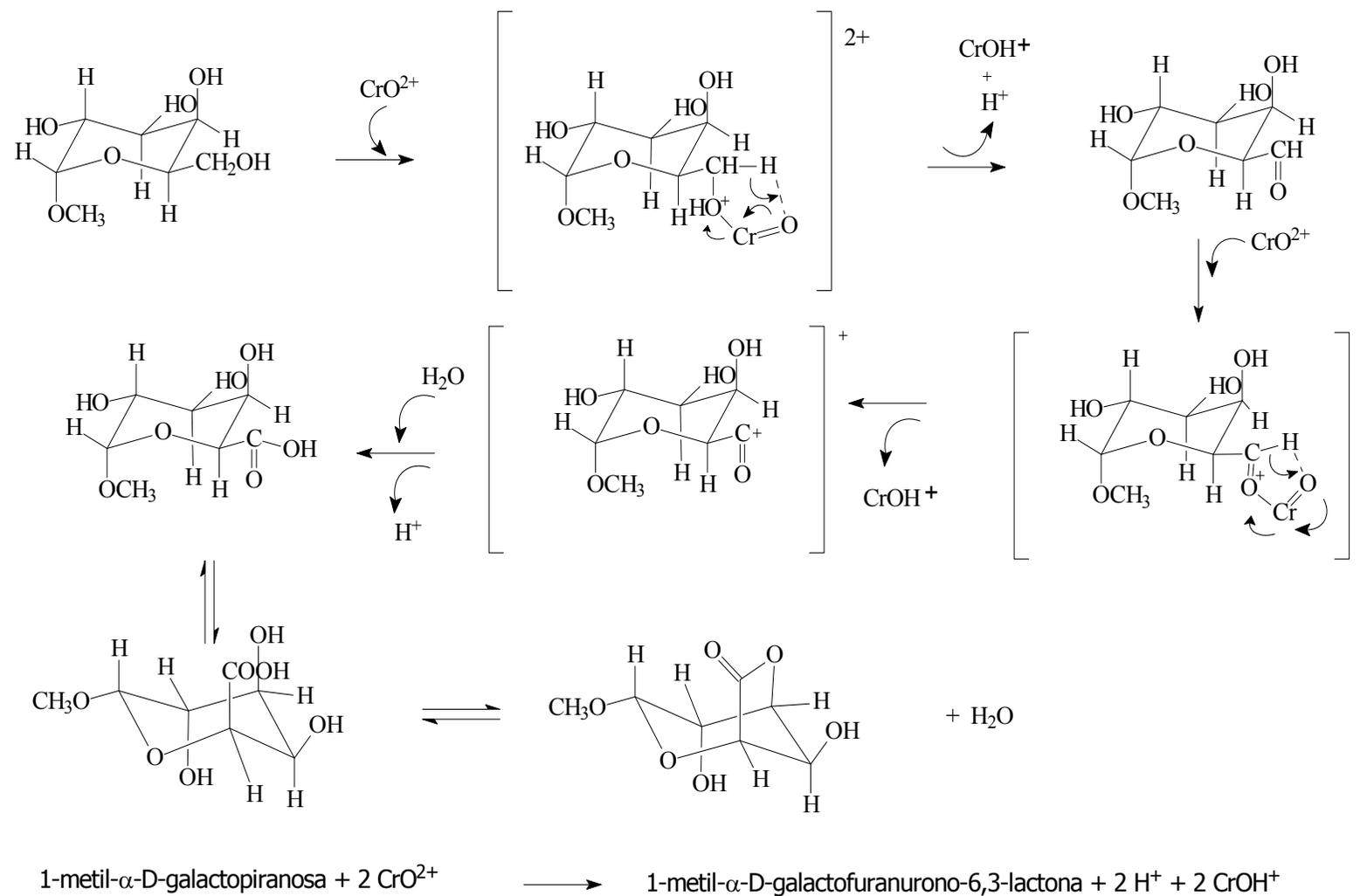












Referencias

- [1] Kotaś, J. y Stasicka, Z, **2000**, *Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation*, Environmental Pollution, 107, 263–283.
- [2] Guertin, J., Jacobs, J. A. y Avakian, C. P., **2004**, *Chromium(VI) Handbook*, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 800.
- [3] Krystek, P. y Ritsema, R., **2007**, *Monitoring of chromium species and 11 selected metals in emission and emission of airborne environment*, International Journal of Mass Spectrometry, 265: 23–29.
- [4] Lay, P. A. y Levina, A., **1998**, *Activation of Molecular Oxygen during the Reactions of Chromium(VI/V/IV) with Biological Reductants: Implications for Chromium-Induced Genotoxicities*, J. of Am. Chem. Soc., 120, 6704-6714.
- [5] Gonzalez Pérez, Y. y Aportela Gilling, P., **2001**, *Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de Artemia salina*, An. Toxicol. 1, 104-108.
- [6] Luippold, R. S., Mundt, K. A., Dell, L. D. y Birk, T., **2005**, *Low-level hexavalent chromium exposure and rate of mortality among US chromate production employee.*, J. of Occupational Environ. Med., 47: 381–385.
- [7] Lurie, P. y Wolfe, S. M., **2002**, *Continuing exposure to hexavalent chromium, a known lung carcinogen: analysis of OSHA compliance inspections, 1990–2000*, Am. J. of Ind. Med., 42: 378–383.
- [8] Bartlet, J. R., *Chromium Cycling in Soils and Water: Links, Gaps and Methods*, **1991**, Environ. Health Perspective, 92, 17-24.

- [9] Dillon, C. T., Lay P. A., Bonin, A. M., Cholewa, A. M. y Legge G. J. F., **2000**, *Permeability, Cytotoxicity and Genotoxicity of Cr(III) complexes and Some Cr(V) Analogues in V79 Chinese Hamster Lung Cells.*, Chemical Research Toxicology, 13, 742-748.
- [10] Barrett, J., O'Brien, P. y Pedrosa, De Jesus J., **1985**, *Chromium(III) and the glucose tolerance factor*, Polyhedron, 1, 1-14.
- [11] Nguyen, A., Mulyani, I., Levina, A. y Lay, P.A., **2008**, *Reactivity of chromium nutritional supplements in Biological media: An X-Ray Absorption Spectroscopic Study*, Inorganic Chemistry, 47, 4299-4309.
- [12] Codd R., Dillon C. T., Levina, A. y Lay, P. A., **2001**, *Studies on the Genotoxicity of Chromium: From the Test Tube to the cell*, Coord. Chem. Rev., 216/217, 533-577.
- [13] Dillon C. T., Levina, A., Bonin, A. M., Cholewa, A. M., Legge G. J. F., Collins, T. J. y Kostka, K .L., **1998**, *Permeability, Cytotoxicity and Genotoxicity of Chromium(V) and Chromium(VI) Complexes in V79 Chinese Hamster Lung Cells*, Chemical Research Toxicology, 11, 119-129.
- [14] Levina, A., Barr-David, G., Codd, R., Lay, P., Dixon, N. E., Hammershoi, A. y Hendry, P., **1999**, *In Vitro Plasmid DNA Cleavage by Chromium(V) and – (IV) 2-Hidroxicarboxilato Complexes*, Chemical Research Toxicology, 12, 371-381.

- [15] Levina, A., Harris, H. H. y Lay, P. A., **2007**, *X-ray absorption and EPR spectroscopic studies of the biotransformation of chromium(VI) in mammalian cells. Is chromodulin an artifact of isolation methods?*, J. of Am. Chem. Soc, 129, 1065–1075.
- [16] Beyersmann, D. y Hartwig, A., **2008**, *Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms*, Archives Toxicology, 82: 493–512.
- [17] Téllez, M. J., Carvajal, R. Mm y Gaitán, A. M., **2004**, *Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres*, Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, 52, 1.
- [18] World Health Organization, International Agency for Research Cancer (IARC). *Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans*, IARC, 203, <http://www.iarc.fr>
- [19] Levina, A., Codd, R., Dillon, C. T. y Lay, P. A., **2003**, *Chromium in biology: toxicology and nutritional aspects*, Prog. Inorg. Chem., 51, 145-250.
- [20] Borthiry, G. R., Antholine, W. E., Myers, J. M. y Myers, C. R., **2008**, *Reductive activation of hexavalent chromium by human lung epithelial cells: Generation of Cr(V) and Cr(V)-thiol species*, J. of Inorg. Biochem. 102, 1449-1462.

- [21] Lide, D. R., editor, **2008**, CRC, *Handbook of Chemistry and Physics*, 88th ed. New York, NY, CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 4–50.
- [22] Zhitkovich, A., **2005**, *Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI)*, Chem. Res. Toxicol., 18, 3–11.
- [23] Levina, A. y Lay, P. A., **2005**, *Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium*, Coord. Chem. Review, 249, 281-298.
- [24] Levina, A., Codd, R. y Lay, P. A., **2009**, *In High Resolution EPR. Applications to Metalloenzymes and Metals in Medicine*, Biological Magnetic Resonance, Vol. 28, Hanson, G., Berliner, L., Eds.; Springer: New York, pp 551–580.
- [25] Reynolds, M., Stoddar, L., Bessalov, I. y Zhitkovich, A., **2007**, *Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G2 phase by mismatch repair*, Nucleic Acids Research, Vol 35, n 2, 465-476.
- [26] Quievryn, G., Messer, J. y Zhitkovich, A., **2002**, *Carcinogenic chromium(VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA in vitro and in human lung A549 cells*, Biochem., 41: 3156–3167
- [27] Levina, A., Zhang, L. y Lay, P. A., **2010**, *Formation and Reactivity of Chromium(V)-Thiolato Complexes: A Model for the Intracellular Reactions of Carcinogenic Chromium(VI) with Biological Thiols*, Am. Chem. Soc., 132 8720-8731.

- [28] Bose, R. N., Fonkeng, B. S., Moghaddas, S. y Stroup, D., **1998**, *Mechanisms of DNA damage by chromium(V) carcinogens*, *Nucleic Acids Research*, 26, 7, 1588–1596.
- [29] Codd, R., Irwin, J. A. y Lay, P. A., **2003**, *Sialoglicoprotein and carbohydrate complexes in chromium toxicity*, *Current Opinion in Chem. Biol.*, 7, 213-219.
- [30] Bartholomäus, R., Irwin, J. A., Shi, L., Smith, S. M., Levina, A. y Lay, P. A., **2013**, *Isolation, Characterization, and Nuclease Activity of Biologically Relevant Chromium(V) Complexes with Monosaccharides and Model Diols. Likely Intermediates in Chromium-Induced Cancers*, *Inorg. Chem.*, 52, 4282-4292.
- [31] Barnard, P. J., Levina, A. y Lay, P., **2005**, *Chromium(V) Peptide Complexes: Synthesis and Spectroscopic Characterization*, *Inorg. Chem.*, 44, 1044-1053.
- [32] Gez, S., Luxenhofer, R., Levina, A., Codd, R. y Lay, P. **2005**, *Chromium(V) Complexes of Hydroxamic Acids: Formation, Structures, and Reactivities*, *Inorg. Chem.*, 44, 2934-2943.
- [33] Levina, A., Zhang, L. y Lay, P., **2003**, *Structure and Reactivity of Chromium(V) Glutathione Complex*, *Inorg. Chem.*, 42, 767-784.
- [34] Sala, L. F., Gonzalez, J. C., Garcia, S. I., Frascaroli, M. I. y Van, D. S., **2011**, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 66, 69–120.

- [35] Barr-David, G., Charara, M., Codd, R., Farrell, R. P., Irwin, J. A., Lay, P. A., Bramley, R., Brumby, S., Ji, J. Y. y Hanson, G. R., **1995**, *EPR Characterization of the Cr^V Intermediates in the Cr^{VI/IV} Oxidations of Organic Substrates and of Relevance to Cr-Induced Cancers*, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 91, 1207-12016.
- [36] González, J.C., **2006**, *Estudio sobre la interacción de ácidos urónicos y sus polímeros con cromo hipervalente y su rol en el transporte de cromo*, Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- [37] Brynildson, M. E., Bakac, A. y Espenson, J. H., **1987**, *Evidence for a Bond Homolysis Pathway for O₂ Release in the Decomposition of the Superoxochromium(III) Ion CrO₂²⁺*, J. Am. Chem. Soc., 109, 4579-4583.
- [38] Scott, S., Bakac, A. y Espenson J. **1992**, *Oxidation of alcohols, aldehydes, and carboxylates by the aquachromium(IV) ion*, J. Am. Chem. Soc., 114, 4205-4213.
- [39] Scott, S., Bacak, A. y Espenson J. **1991**, *Preparation and reactivity of the aquachromium(IV) ion*, J. Am. Chem. Soc., 113, 7787-7788.
- [40] Pérez Benito, J., Arias, C. y Lamrhari, D., **1994**, *Chromium(II) is an intermediate in the reduction of carcinogenic chromate with biological thiols*, New. J. Chem., 18, 663-666.

- [41] Palopoli, C., Signorella, S. y Sala, L. F., **1997**, *Kinetics and mechanism of the oxidation of DL-homoserine by Cr^{VI}*, New Journal of Chem., 21, 343-348.
- [42] Pestovsky, O., Bakac, A. y Espenson, J. H., **1998**, *Kinetics and Mechanism of the Oxidation of 10-Methyl-9,10-dihydroacridina by Chromium(VI,V,IV): Electron vs Hydrogen Atom vs Hydride Transfer*, J. of the Am. Chem. Soc., 120, 13422-13428.
- [43] Roldán, V., Santoro M., González J. C., Salas-Pelegrin J. M., Signorella, S. y Sala, L. F., **2004**, *Kinetics and Mechanism of the Reduction of Cr^{VI} and Cr^V by D-lactobionic Acid*, J. of Inorg. Biochem., 98, 347-357.
- [44] González, J. C., García, S., Mamana, N., Sala, L. F. y Signorella, S., **2006**, *Evidence for the involvement of Cr^{II} and free radical as intermediates in the reduction of HCrO₄⁻ by sacharides, alcohols and hydroxyacids*, Inorg. Chem. Comm., 9, 437-440.
- [45] Codd, R., Lay, P. A. y Levina, A. **1997**, *Stability and ligand exchange reactions of chromium(IV) carboxilato complexes in aqueous solution*, Inorg. Chem., 36, 5440-5448.
- [46] Barr-David, G., Hambley, T., Irwin, J. A., Judd, R., Lay, P. A., Martin, B.D., Bramley, R., Dixon, N. E y Hendry, P., **1992**, *Suppression by vanadium(IV) of chromium(V)-mediated DNA cleavage and chromium(VI/V)-induced mutagenesis. Synthesis and crystal structure of the vanadium(IV)*

complex: (NH₄)[V(O)(HOC(Et)₂COO)(OC(Et)₂COO)], Inorg. Chem., 31, 4906-490.

[47] Dillon, C. T., Lay, P. A., Bonin, A. M., Dixon, N. E., Collins, T. J. y Kostka, K. L., **1993**, *In vitro DNA damage and mutations induced by a macrocyclic tetraamide chromium(V) complex: Implications for the role of Cr(V) peptide complexes in chromium-induced cancers*, Carcinogenesis 14 1875-188.

[48] Mazzer, P. A., Maurmann, L. y Bose, R. N., **2006**, *Mechanism of DNA damage and insight into mutations by chromium(VI) in the presence of glutathione*, J. of Inorg. Biochem., 101, 44-55.

[49] Lay, P. A. y Levina, A., **2012**, In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, Scott, R. A., ed., John Wiley & Sons, Chichester, U.K., DOI: 10.1002/9781119951438.eibc0040.pub2.

[50] Signorella, S., Palopoli, C., Santoro, M., García, S., Daier, V., González, J. C., Roldán, V., Frascaroli, M. I., Rizzotto M. y Sala, L. F., **2001**, *Kinetics and mechanistic studies on the chromic oxidation of carbohydrates. Implication on the environmental contamination by chromium(VI) in soil*. Trends in Inorg. Chem., 7, 197-207.

[51] Signorella, S., Daier, V., Santoro, M., García, S., Palopoli, C., González, J. C., Korecz, L., Rocckenbauer, A. y Sala, L. F., **2001**, *The EPR Pattern of [CrO(cis-1,2-cyclopentane-1,2-diolato)₂]- and [CrO(trans-1,2-cyclopentane-1,2-diolato)₂]*, European J. of Inorg. Chem., 7, 1829-1833.

- [52] Roldán, V., González, J. C., Santoro, M., García, S., Casado, N., Olivera, S., Boggio, J. C., Salas-Peregrin, J. M., Signorella, S. y Sala, L.F., **2002**, *Kinetics and mechanism of the oxidation of disaccharides by Cr^{VI}*, Can. J. Chem., 80, 1676-1686.
- [53] Signorella, S., González, J. C. y Sala, L. F., **2002**, *EPR Spectroscopic Characterization of Cr^V-Sacharide Complexes*, J. Argentine Chem. Soc., 90, 1/3, 1-19.
- [54] Rizzotto, M., Levina, A., Santoro, M., García, S., Fracaroli, M. I., Signorella, S., Sala, L. F. y Lay, P. A., **2002**, *Redox and ligand-exchange chemistry of chromium(VI/V)-methyl glycoside system*, J. Chem. Soc.; Dalton Trans., 3206-3213.
- [55] González, J. C., Daier, V., García, S., Goodman, B. A., Atria, A. M., Sala, L. F. y Signorella, S., **2004**, *Redox and complexation chemistry of the Cr^{VI}/Cr^V-D-galacturonic acid system*, Dalton Trans., 2288-2296.
- [56] Signorella, S., García, S., Rizzotto, M., Levina, A., Lay, P. y Sala, L. F., **2005**, *The EPR pattern of Cr^V complexes of D-ribose derivatives*, Polyhedron, 24, 9, 1079-1085.
- [57] García, S., Ciullo, L., Olivera, M. S., González, J. C., Bellú, S., Rockenbauer, A., Korecz, L. y Sala, L. F., **2006**, *Kinetics and mechanism of the reduction of chromium(VI) by D-fructose*, Polyhedron, 25, 6, 1483-1490.

- [58] Santoro, M., Caffaratti, E., Salas-Peregrin, J. M., Korecz, L., Rockenbauer, A., Sala, L. F. y Signorella, S., **2007**, *Kinetics and mechanism of the chromic oxidation of myo-inositol*, Polyhedron, 26, 169-177.
- [59] Bellú, S., García, S., González, J. C. y Signorella, S., **2008**, *Removal of Chromium (VI) and Chromium(III) from Aqueous solution by Grainless Stalk of Corn*, Separation Science and Technology, 43, 3200-3220.
- [60] Bellú, S., González, J. C., García, S., Signorella, S. y Sala, L. F., **2008**, *Kinetics and mechanism of oxidation of apple pectin by Cr(VI) in aqueous acid medium*, J. of Phys. Org. Chem. 21, 1059-1067.
- [61] González, J. C., García, S. I., Bellú, S., Atria, A. M., Salas Peregrin, J. M., Rockenbauer, A., Korecz, L., Signorella, S. y Sala, L. F., **2009**, *Oligo and polyuronic acids interactions with hypervalent chromium*, Polyhedron, 28, 2719-2729.
- [62] González, J. C., García, S. I., Bellú, S., Salas Peregrin, J. M., Atria, A. M., Sala, L. F. y Signorella, S., **2010**, *Redox and complexation chemistry of the $Cr^{VI}/Cr^V/Cr^{IV}$ -D-glucuronic acid system*, Dalton Trans., 39, 2204-2217.
- [63] Westheimer, F. H. y Nicolaides, N., **1949**, *The kinetics of the oxidation of 2-deuteropropanol-2- by chromic acid*, J. of the Am. Chem. Soc., 71, 25-28.

- [64] Raman, M. y Rocek, J., **1971**, *Mechanism of chromic acid oxidation of isopropyl alcohol. Evidence for oxidation by chromium(IV)*, J. Am. Chem. Soc., 93, 5455-5462.
- [65] Golonka-Cieslak, M., **1996**, *Toxic and Mutagenic Effects of Chromium(VI). A Review*, Polyhedron, 15, 21, 3667-3689.
- [66] Haight, G., Jursich, G., Kelso, T. y Merrill, P., **1985**, *Kinetics and Mechanisms of Oxidation of Lactic Acid by Chromium(VI) and Chromium(V)*, Inorg. Chem., 24, 2740-2476.
- [67] Babich, O. A. y Gould, E. S., **2001**, *Electron Transfer. 149. Reaction of Hypervalent Chromium with s^2 Metal-Ion Reducing Centers*, Inorg. Chem. 40, 5708–5710.
- [68] Krumpolc, M. y Rocek, J., **1980**, *Sodium bis[2-ethyl-2-hydroxybutyrato(2-)]oxocromate(V)*, Inorg. Synth. 20, 63-65.
- [69] Kolthoff, I. M., Sandell E. B. y Meehan, E. J., **1979**, *Análisis químico cuantitativo*, 5ta Ed. Hobby C. e I, p722.
- [70] International Agency for Research on Cancer. *Chromium, Nickel and Welding*, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals for Humans, Lyon, France, **1990**.
- [71] Feldam, R., **1999**, *Occupational and environmental neurotoxicology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 337–338.

- [72] Davies, E. R., **1974**, *A new pulse ENDOR technique*, Phys. Lett. A, 47, 1–2.
- [73] Neese, F., **2001**, *Prediction of Electron Paramagnetic Resonance g -values by Coupled Perturbed Hartree-Fock and Kohn-Sham Theory*, J. Chem. Phys., 115, 11080–11096.
- [74] Neese, F., **2001**, *Theoretical Study of Ligand Superhyperfine Structure. Application to Cu(II) Complexes*, J. Chem. Phys., 105, 4290–4299.
- [75] Neese, F., **2003**, *A Spectroscopy Oriented Configuration Interaction Procedure*, J. Chem. Phys., 118, 3939–3948.
- [76] Neese, F., **2005**, *Efficient and Accurate Approximations to the Molecular Spin-Orbit Coupling Operator and their use in Molecular g -Tensor Calculations*, J. Chem. Phys., 122, 034107–034119
- [77] Sinnecker, S., Rajendran, A., Klamt, A., Diedenhofen, M. y Neese, F., **2006**, *Calculation of Solvent Shifts on Electronic G -Tensors with the Conductor-Like Screening Model (COSMO) and its Self-Consistent Generalization to Real Solvents (COSMO-RS)*, J. Phys. Chem. A, 110, 2235–2245.
- [78] Perdew, J. P., **1986**, *Density-functional approximation for the correlation-energy of the inhomogenous electron gas*, Phys. Rev. B, 33, 8822–8824.

- [79] Perdew, J. P., **1986**, *Erratum: Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas*, Phys. Rev. B, 34, 7406–7406.
- [80] Becke, A. D., **1988**, *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behaviour*, Phys. Rev. A, 38, 3098–3100.
- [81] Dunlap, B. I., Connolly, J. W. D. y Sabin, J. R., **1979**, *On some approximations in applications of X α theory*, J. Chem. Phys., 71, 3396–3402.
- [82] Vahtras, O., Almlöf, J. y Feyereisen, M. W., **1993**, *Integral approximations for LCAO-SCF calculations*, Chem. Phys. Lett., 213, 514–518.
- [83] A. Schäfer; H. Horn; R. Ahlrichs, **1992**, *Fully optimized contracted gaussian basis sets for atoms Li to Kr*, J. Chem. Phys., 97, 2571–2577.
- [84] The Ahlrichs (2df,2pd) polarization functions were obtained from the TurboMole basis set library under ftp.chemie.unikarlsruhe.de/pub/basen, R. Ahlrichs and co-workers (unpublished).
- [85] Kolthoff, I. M., Sandell E. B., Meehan, E. J., **1979**, *Análisis químico cuantitativo*, 5ta Ed. Hobby C. e I, p846.
- [86] Whistler, R. L. y Wolfrom, M. L., **1963**, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Ed Academic Press. Vol II., pp 47.
- [87] Brown, J. M., **2007**, *Equilibration of D-glucaric Acid in Aqueous Solution*, PhD Thesis, University of Waikato.

- [88] Denton, T. T., Hardcastle, K. I., Dowd, M. K. y Kiely, D. E., **2011**, *Characterization of D-glucaric acid using NMR, X-ray crystal structure, and MM3 molecular modeling analyses*, Carbohydrate Research 346, 2551–2557.
- [89] Lever, A. B. P., **1984**, *In Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 2nd edn, pp. 497.
- [90] Ilan, Y. A., Czapski, G. y Ardon, M., **1975**, *The formation of CrO_2^2 in the reaction of Cr^{2+} in aqueous acid solutions*, Isr. J. Chem., 13(1), 15-21.
- [91] Sellers, R. M., y Simic, M.G., **1976**, *Pulse radiolysis of the reactions of some reduced metal ions with molecular oxygen in aqueous solution*, J. Am. Chem. Soc., 98, 4579-4583.
- [92] Brynildson, M. E., Bakac, A. y Espenson, J. H., **1988**, *Reactions of the Superoxochromium(III) Ion with Transition-Metal Complexes*, Inorg. Chem., 27, 2592-2595.
- [93] Bakac, A., Scott, S. L., Espenson, J. H. y Rodgers, K. R., **1995**, *Interaction of Chromium(II) Complexes with Molecular Oxygen. Spectroscopic and Kinetic Evidence for η^1 -Superoxo Complex Formation*, J. Am. Chem. Soc., 117, 6483-6488.
- [94] Hicks, K. B., Lim, P. C. y Haas, M. J., **1985**, *Analysis of uronic and aldonic acids, their lactones, and related compounds by high-performance liquid chromatography on cation-exchange resins*, Chrom., 17, 284.

- [95] Mangiameli, M. F., González, J. C., García, S. I., Bellú, S., Santoro, M., Caffaratti, E., Frascaroli, M. I., Salas Peregrín, J. M., Atria, A. M. y Sala, L. F., **2010**, *Redox, kinetics and complexation chemistry of the Cr^{VI}/Cr^V/Cr^{IV}-D-Glycero-D-gulo-heptono-1,4-lactone system*, J. Phys. Org. Chem., 23, 960-971.
- [96] Mangiameli, M. F., González, J. C., García, S. I., Frascaroli, M. I., Van Doorslaer, S., Salas Peregrin, J. M. y Sala, L. F., **2011**, *New insights on the mechanism of oxidation of D-galacturonic acid by hypervalent chromium*, Dalton Trans., 40,7033-7045.
- [97] Seymour, P., **1999**, *Chromium Pollution: An Experiment Adapted for Freshman Engineering Students*, J. Chem. Ed., vol 76, nº 7, 927-928.
- [98] Romero, C. H., Pellerano, R. G., Acevedo, H. A y Vazquez, F. A., **2006**, *Estandarización condiciones preliminares para la determinación de cromo en muestras ambientales*, Resumen E-039, Comunicaciones científicas y tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste.
- [99] Cotton, F. A., Wilkinson, G., **1980**, *Advanced Inorganic Chemistry A comprehensive text*, John Wiley & Sons, New York, pp 657-669.
- [100] WinSim EPR calculations for MS-Windows, version 0.96: National Institute of Environmental Health Sciences, 1995.
- [101] Mitewa, M. y Bontchev, P., **1985**, *Chromium(V) Coordination Chemistry*, Coord. Chem. Rev., 61, 241-272.

- [102] Hasan, F. y Rocek, J., **1972**, *Three-Electron Oxidations. III. The Chromium(VI) Oxidation of Oxalic Acid*, JACS 94, 9073-9081.
- [103] Brasch, N., Buckingham, D. A., Clark, C. R., Rowan, A. E., **1996**, *¹⁷O N. M. R. Line Broadening and T₁, T₂ Measurements on CrO₄²⁻ and HCrO₄⁻*, Aust. J. Chem., 49, 697-700.
- [104] Sen gupta, K. K.; Samanta, T.; Samanendra, N. B. **1985**, *Kinetics of oxidation of methanol and mono-deutero-methanol by chromium(VI) in perchloric acid medim*. Tetrahedron, vol 41, nº 1, 205-208
- [105] Brito, F., Ascanio, J., Mateo, S., Hernandez, C., Araujo, L., Gili, P., Martín-Zarza, S., Dominguez, S. y Mederos, A., **1997**, *Equilibria of chromate(VI) species in acid medium and ab initio studies of these species*, Polyhedron, vol. 16, nº 21, pp 3835 - 3846.
- [106] Gould, E. S. **1994**, *Redox chemistry of chromium(IV) complexes*, Coord. Chem. Rev., 135/136, 651-684.
- [107] Ghosh, M. C. y Gould, E. S. **1991**, *Stabilized aqueous chromium(IV), as prepared from the chromium(VI)-arsenic(III) reaction*, Inorg. Chem., 30, 491-494.
- [108] Bakac, A., Won, T. y Espenson, J. H., **1996**, *Novel pathways in the reactions of superoxometal complexe*, Inorg. Chem., 35, 2171-2175.
- [109] Signorella, S., Daier, V., García, S., Cargnello, R., González, J. C., Rizzotto, M y Sala, L. F., **1999**, *The relative ability of aldoses and*

deoxyaldoses to reduce Cr^{VI} and Cr^V. A comparative kinetic and mechanistic study, Carbohydr. Res., 316, 14-25.

[110] Angyal, S. J., **1991**, *The composition of reducing sugars in solution: current aspects*, Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 49, 19-35.

[111] Espenson, J.H., **2002**, *Chemical kinetics and reaction mechanism*, Second Edition, Mc Graw Hill, New York, 155-169.

[112] González, J. C., Mangiameli, M. F., Crotta Asis, A., Bellú, S. y Sala, L. F., **2013**, *Oxidation of carbohydrates of biological importance by the aquachromium(IV) ion*, Polyhedron, 49, 84–92.

[113] Al-Ajlouni, A., Bakac, A. y Espenson J. H., **1994**, *Hydride abstraction from 1,2-diols by pentaquachromium(IV) ion*, Inorg. Chem. Vol 33, nº 6, 1011-1014.

[114] Leffler, J.E. y Grundwald, E., **1963**, *Rates and equilibria of organic reactions*, J. Wiley N.Y., J. Org. Chem., 31, 533-550.

[115] Petovsky, O., Bacak, A. y Espenson, J. H., **1998**, *Reactions of the Superoxochromium(III) Ion with Transition-Metal Complexes*, J. Am. Chem. Soc. 120, 13422-13428.

[116] Exner, O., **1973**, *The enthalpy-entropy relationship*, Prog. Phys. Chem., 10, 411-482

- [117] Al-Ajlouni, A., Bakac, A. y Espenson, J. H., **1993**, *Kinetics and mechanism of the oxidation of phenols by the oxochromium(IV) ion*, Inorg. Chem., 32, 5792-5796.
- [118] Muralidharan, S, y Espenson, J. H., **1984**, *Kinetics and mechanism of the oxidation of europium(II) and the reduction of europium(III) by 2-hydroxy-2-propyl radicals*, Inorg. Chem., 23, 636.
- [119] Escandar, G. y Sala, L. F., **1992**, *Complexes of Cu(II) with D-aldonic and D-alduronic acids in aqueous solution*, Can. J. Chem., 70, 2053–2057.
- [120] Drago R.S., **1992**, *Physical Methods for Chemist*, 2da edición, Ed. Saunders College Publishing.
- [121] Bowman, M. K., *Electron paramagnetic resonance. A practitioner's toolkit*. Ed. M. Brustolon y E. Giamello. *Cap 5: Pulsed electron paramagnetic resonance*, pp 159. John Wiley and sons, Inc. Published Online: 14 JUL 2008, Print ISBN: 9780470258828 - Online ISBN: 9780470432235 - DOI: 10.1002/9780470432235.
- [122] Feher, G., **1956**, *Observation of Nuclear Magnetic Resonances via the Electron Spin Resonance Line*, Phys. Rev., 103, 834.
- [123] Alonso Gascón, P. J., **2002**, *Una mirada a la evolución de la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica*, Parte del discurso *La Resonancia Paramagnética Electrónica, una Técnica Multidisciplinar*, leído por el autor el 16 de mayo de 2002 con motivo de su ingreso en la Real

Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza. El texto íntegro puede obtenerse en <http://www.unizar.es/acz>, o en <http://www.unizar.es/acz/AcademicosNumerarios/Discursos/Alonso.pdf>

[124] Mims, W. B., **1965**, *Pulsed ENDOR Experiments*, Proceedings of the Royal Society of London, Serie A, Mathematical and Physical Sciences, Vol. 283, No. 1395, pp. 452-457.

[125] Bramley, R., Ji, J. Y., Judd, R. J. y Lay, P. A., **1990**, *Solvent Dependence of the EPR Spectra of Oxochromate(V) Complexes: Solution Structures and the Effects of Hydrogen Bonding between the Solvent and the Complex*, Inorg. Chem., 29, 3089-3094.

[126] Neese, F., **2009**, *Prediction of Molecular Spectra and Molecular Properties with Density Functional Theory: from Fundamental Theory to Exchange Coupling*, Coord. Chem. Rev., 253, 526-563.

[127] Kapre, R., Ray, K., Sylvestre, I., Weyhermüller, T., DeBeer George, S., Neese, F. y Wieghardt, K., 2006, *Molecular and Electronic Structure of Oxo-bis(benzene-1,2-dithiolato)chromate(V) Monoanions. A Combined Experimental and Density Functional Study*, Inorg. Chem., 45, 3499-3509.

[128] Codd, R. y Lay, P. A., **1999**, *Competition Between 1,2-Diol and 2-Hydroxy Acid Coordination in Cr(V)-quinic Acid Complexes: Implications for Stabilization of Cr(V) Intermediates of Relevance to Cr(VI)-Induced Carcinogenesis*, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 7864–7876.

- [129] Lever, A. B. P., **1984**, In *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 2nd edn, pp. 419.
- [130] Hawkins, C. L. y Davies, M.J., **1996**, *Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials*, Free Radic. Biol. Med., 21(3):275-90.
- [131] Saladini, M., Candini, M., Iacopino, D. y Menabue, L., **1999**, *Binding ability of aldaric acid toward metal(II). X-ray study and solution state investigation on Cu(II)-galactaric acid system and its 2,2'-bipyridine adduct*, Inorganica Chimica Acta 292, 189–197.
- [132] Pérez Benito, J. y Arias, C., **1993**, *A kinetic study on the reactivity of chromium(IV)*, Can. J. Chem., 71, 649 - 655
- [133] Nemes, A. y Bakac, A., **2001**, *Disproportion fo aquachromyl(IV) ion by hydrogen abstraction from coordinated water*, Inorg. Chem., 40, 2720-2724.
- [134] Wilkins, R.G., **1974**, *The Study of Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes*, Allyn & Bacon, Boston, 20-23.
- [135] Pearson, R. G., **1968**, *Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles*, J. Chem. Educ., 45, pp.581–586.
- [136] Das, A. K., **2004**, *Micellar effect on the kinetics and mechanism of chromium(VI) oxidation of organic substrates*, Coord. Chem. Rev. 248, 81-90.

- [137] Levina, A., Lay, P. A. y Dixon, N. E., **2000**, *Disproportionation and Nuclease Activity of Bis[2-ethyl-2-hydroxybutanoato(2-)]-oxochromate(V) in Neutral Aqueous Solutions*, Inorg. Chem.39, 385-395.
- [138] Roldán, V. P., Daier, V. A., Goodman, B., Santoro, M. I., González, J. C., Calisto, N., Signorella, S. R. y Sala, L. F., **2000**, *Kinetics and mechanism of the reduction of Cr^{VI} and Cr^V by D-glucitol and D-manitol*, Helv. Chim. Acta, 83, 3211–3228.
- [139] Signorella, S., Santoro, M., Palopoli, C., Brondino, C., Salas-Peregrin, J. M., Quiroz, M. y Sala, L. F., **1998**, *Kinetics and mechanism of the oxidation of D-galactono-1,4-lactone by Cr^{VI} and Cr^V* , Polyhedron, 17, 2739–2749.
- [140] Kolthoff, I. M., Sandell, E. B., Meehan, E. J., **1979**, *Análisis químico cuantitativo*, 5ta Ed. Hobby C. e I.
- [141] Cruywagen, J. J., Heyns J. B. B. y Rohwer, E. A., **1998**, *New spectrophotometric evidence for the existence of $HCrO_4^-$* , Polyhedron, 17, 1741-1746.
- [142] Heyns, J. B., Cruywagen J. J. y Carron, K. T., **1999**, *Raman spectroscopic investigation of chromium (IV) equilibria- Another look*, J. Raman Spectrosc., 30, 335-338.
- [143] Signorella, S., Santoro, M., Mulero, M. N. y Sala, L. F., **1994**, *Oxidation of D-gluconic acid by Chromium(VI) in Perchloric acid*, Can. J. Chem., 72, 398-402.

- [144] Krumpolc, M., De Boer, B.G., Rocek, J., **1978**, *Sodium bis[2-ethyl-2-hidroxybutyrato(-2)oxocromate]*, J. Am. Chem. Soc., *100*, 145-153.