



Revista Cubana de Química

ISSN: 0258-5995

revcubanaquimica@cnt.uo.edu.cu

Universidad de Oriente

Cuba

Paneque-Quevedo, A.; Reguera-Ruiz, E.; Fernández-Bertran, J.; Yee-Madeiras, H.  
CARACTERIZACION DE COMPLEJOS DE HEMINA POR DIFRACCION DE RAYOS-X

Revista Cubana de Química, vol. XVII, núm. 2, 2005, pp. 20-31

Universidad de Oriente

Santiago de Cuba, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543686005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

**CARACTERIZACION DE COMPLEJOS DE HEMINA POR DIFRACCION DE RAYOS-X**

*A. Paneque-Quevedo(1), E. Reguera-Ruiz(2), J. Fernández-Bertran(1) y H. Yee-Madeiras(3).*

*(1) Centro de Química Farmacéutica, C.P. 16042, La Habana, Cuba. E-mail: [panecu@yahoo.com](mailto:panecu@yahoo.com);*

*(2) Instituto de Materiales y Reactivos para la Electrónica, Universidad de La Habana 10400, Cuba;*

*(3) Escuela de Física y Matemática, Instituto Politécnico Nacional, México.*

**Resumen**

En el presente trabajo se reporta la caracterización cristalográfica del complejo hemina-imidazol con relaciones molares 1:2 y 1:4. Se estudia la interacción de la hemina en estado sólido, mediante la técnica de difracción de rayos-x de polvo, con tiocianato de potasio, acetato de potasio, sulfato de plata, amoníaco gaseoso, etilamina, dietilamina, trietilamina y fluoruros de: litio, sodio, potasio, cesio, amonio y plata.

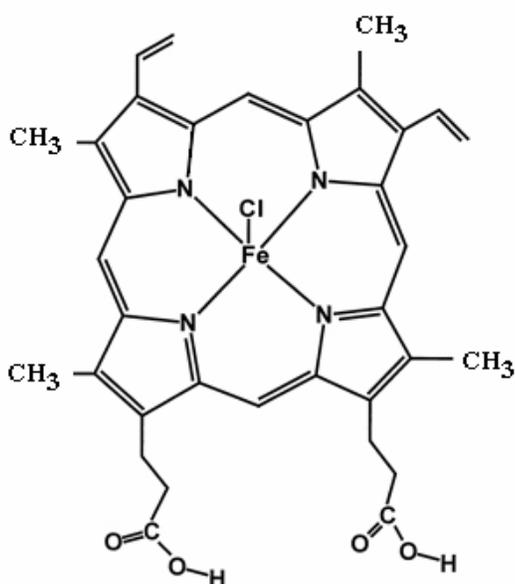
Palabras claves: Difracción de rayos-x de polvo, hemina, protoporphirina, complejos, mecanoquímica.

**Introducción.**

La hemina, cloruro de protoporfirina(IX)hierro(III) es el grupo prostético de diversas hemoproteínas tales como la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos y una variedad de enzimas, Figura 1. Los complejos de hemina han sido ampliamente utilizados como modelos para el estudio de las hemoproteínas, para el tratamiento de porfiria aguda y corregir la deficiencia de hierro en aquellos casos donde existen problemas de absorción<sup>1</sup>.

El conocimiento de como la estereoquímica de la hemina responde a los cambios en los estados de oxidación y de espín es un prerrequisito para entender el mecanismo a nivel molecular de la química de las hemoproteínas. Las evidencias demuestran que las diferencias de los grupos de la periferia de la hemina apenas influyen en la química del sitio activo y la mayor parte de los estudios se dirigen a los efectos de los ligandos axiales sobre la reactividad del heme<sup>2,3</sup>. Por otro lado, en ocasiones se encuentran diferencias notables entre los parámetros estructurales obtenidos para los modelos y los obtenidos para las proteínas, lo que demuestra que el entorno biológico impuesto sobre las metaloporfirinas es muy complejo y no existen dudas de que juegan un papel importante en determinar la reactividad química del centro metálico y su estabilidad para un estado de oxidación dado<sup>5-9</sup>.

Las limitaciones fundamentales que presenta la hemina como modelo para el estudio de muchas hemoproteínas han sido fundamentalmente su escasa solubilidad en la mayor parte de los disolventes, su poca estabilidad en disolución con la formación de agregados moleculares, el cambio incontrolado en el estado de oxidación y de espín del Fe al formar complejos con diversos ligandos, la presencia del paramagnetismo permanente que limita su estudio por RMN, entre otros. En disolución alcalina el grupo OH<sup>-</sup> se coordina al hierro en una de sus posiciones axiales de coordinación formando un complejo pentacoordinado de alto espín muy estable bajo estas condiciones que impide la coordinación al Fe(III) de otros ligandos<sup>10</sup>.



**Figura 1.- Esquema de la estructura molecular de la Hemina.**

Desde hace años se han buscado variantes y se han diseñado medios de reacción para el uso de la hemina como modelo de hemoproteínas. Algunos de éstos han intentado variar la polaridad del medio, el uso de detergentes e incorporación en liposomas.

Un medio de reacción que ha comenzado a emplearse y que podría eliminar muchas de las limitantes en la síntesis y estudio de las propiedades de complejos de hemina es desarrollar las reacciones en estado sólido. Problemas de insolubilidad, agregación, competencia del grupo OH con otros ligandos por el sitio de coordinación podrían no estar presentes en este medio y los productos podrían ser caracterizados por las técnicas convencionales de DRX, Mössbauer e IR, entre otras<sup>11-16</sup>. Diversos métodos cristalográficos han sido utilizados en la caracterización de la hemina y sus complejos<sup>17</sup>. La difícil obtención de complejos cristalinos de hemina ha limitado un mayor uso de estas técnicas. El método de difracción de polvo policristalino ha sido utilizado particularmente en el estudio y caracterización de la  $\beta$ -hematina<sup>18,19</sup>.

En el presente trabajo se estudia, mediante la técnica de difracción de rayos-x de polvo (DRX), la interacción de la hemina con diversos ligandos.

### ***Métodos experimentales.***

Hemina (bovina), *SIGMA*, imidazol, tiocianato de potasio, acetato de potasio, sulfato de plata y fluoruros de: litio, sodio, potasio, cesio, amonio y plata, *MERCK*. Amoníaco gaseoso, etilamina, dietilamina, trietilamina, *BAKER Analyzed*.

### ***Preparación de complejo hemina con imidazol.***

Las relaciones molares hemina: imidazol estudiadas fueron 1:2 y 1:4. Los reactivos se mezclaron y se molieron manualmente en un mortero de ágata durante 5-10 minutos. Los productos resultantes se analizaron por las técnicas de DRX. En los casos en que el análisis no se pudo realizar inmediatamente, las muestras se almacenaron en una desecadora y se protegieron de la acción de la luz.

### ***Preparación de complejos de hemina con fluoruros.***

La hemina y los fluoruros correspondientes (fluoruro de: litio, sodio, potasio, cesio, amonio y plata) se mezclaron en relaciones molares 1:1, 1:3, 1:4 y 1:5, y se molieron manualmente en un mortero de ágata durante 5-10 minutos. Los complejos de la hemina con el cianuro de potasio, tiocianato de potasio, acetato de sodio y sulfato de plata se realizaron por el mismo procedimiento.

### **Preparación de complejos de hemina con aminas.**

Alrededor de 25 mL de amina fueron adicionados lentamente a 0,108 g de hemina. La mezcla reaccionante se molió manualmente en un mortero de ágata durante 5 minutos. El exceso de amina se evaporó durante la molida. El estudio de la interacción de la hemina con el amoniaco gaseosos se realizó en un equipo volumétrico de adsorción construido al efecto. La hemina (2 g) se sometió previamente a vacío (0.1 Torr) durante 12 horas en el equipo de adsorción para eliminar cualquier especie adsorbida que pudiera tener.

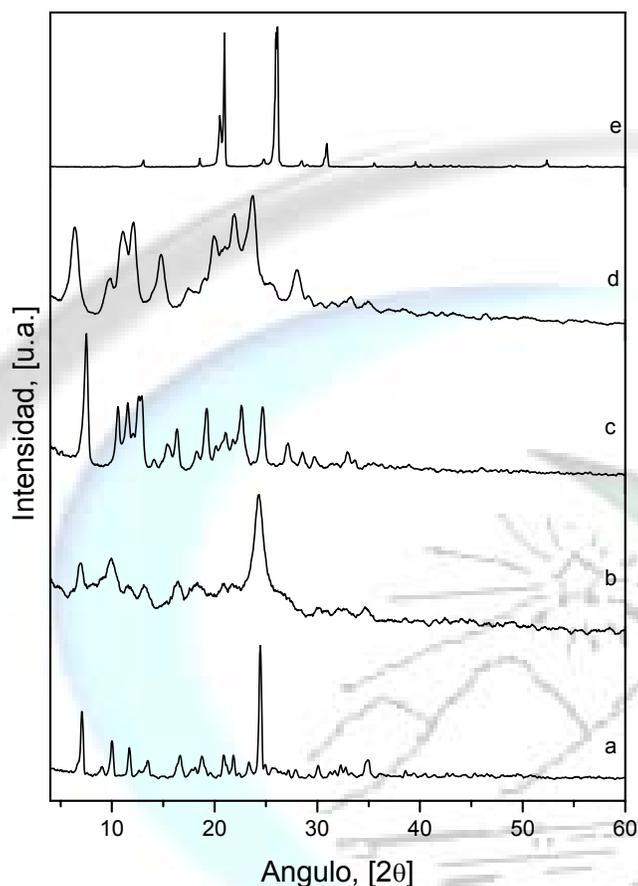
### **Difracción de Rayos-X de polvos.**

Los difractogramas de rayos-X se obtuvieron con radiación  $CuK\alpha$  (1.5406 Å) a 40kV y 35mA en un difractómetro de polvos *Bruker D8-Advance* acoplado a una computadora (DELL, pentium III) y gobernado por el programa *Diffra plus v5* el cual no sólo permite el registro de los espectros sino también su manipulación y comparación con patrones almacenado en la base de datos *PDF*<sup>20</sup>. Las mediciones se realizaron en el rango de 4-60°/2θ a una velocidad de 0.05° seg<sup>-1</sup> y un tiempo de conteo por punto de 3 seg. Los patrones de difracción empleados para identificar la celda cristalina y asignar índices de Miller se midieron a un paso de 0.02° en 2θ y un tiempo de conteo por punto de 6 seg. El cálculo de los índices de Miller y de la celda unidad se realizó con la ayuda del programa *TREOR 90*<sup>21</sup>. La celda unidad propuesta por el programa fue refinada con el programa *LSUCRI*<sup>22</sup>.

## **Resultados y discusión**

### **Estudio de la interacción Hemina:Imidazol.**

En la Fig. 2 se muestran los patrones de difracción representativos de las mezclas de reacción hemina:imidazol. Durante la molida la hemina pierde cristalinidad pero su patrón de difracción sigue siendo esencialmente el mismo, Fig. 2b. Los productos resultantes de las reacciones en estado sólido hemina:imidazol muestran patrones de difracción que difieren notablemente de los reactivos de partida. Los patrones de difracción de las mezclas con relaciones molares hemina:imidazol 1:2 y 1:4 son sólo ligeramente diferentes, Fig. 2c,d. Del análisis cuidadoso de estos dos difractogramas se detecta que los picos de la mezcla 1:4 están corridos a ángulos menores cuando se comparan con aquellos de la mezcla 1:2, lo que sugiere mayores parámetros de celda unidad. Como es de esperar, los complejos con 2 y 4 moléculas de imidazol como ligando no pueden ser acomodados dentro de la misma celda unidad.



**Figura 2.- Difractogramas de polvo de: a) hemina; b) hemina molida; c) hemina + imidazol (1:2); d) hemina + imidazol (1:4); e) imidazol. Entre paréntesis se especifica las relaciones molares hemina:imidazol.**

Cuando la mezcla con relación molar 1:4 se lava con metanol o agua, el patrón de difracción resultante se corresponde con el de la mezcla 1:2. Estos resultados demuestran que el uso de disolventes tales como agua o metanol impiden la formación del complejo (1:4) a través de transferencia protónica desde los grupos ácidos de la hemina a los imidazoles y también demuestran que estos disolventes destruyen el complejo previamente formado durante la molida. En estos casos el único sitio de interacción entre la hemina y los imidazoles es el enlace coordinado de estos últimos a las posiciones axiales disponibles para la coordinación con el catión Fe(III).

A los patrones de polvo de los complejos hemina:imidazol 1:2 y 1:4 se le asignaron índices de Miller con el programa TREOR90 y la celda se refinó posteriormente con el programa LSUCRI.

Los valores de las distancias interplanares, intensidades relativas e índices de Miller se reportan en la Tabla 1. Los parámetros y figuras de mérito correspondientes se reportan en la Tabla 2.

**Tabla 1.- Caracterización cristalográfica de los patrones de DRX de polvos de los complejos hemina:imidazol 1:2 y 1:4, respectivamente.**

Complejo 1:2						Complejo 1:4					
(h	k	l)	d (Å) <sub>Obs</sub>	d (Å) <sub>Cal.</sub>	I/I <sub>100</sub>	(h	k	l)	d (Å) <sub>Obs</sub>	d (Å) <sub>Cal.</sub>	I/I <sub>100</sub>
(0	1	0)	11.780	11.765	100	(0	1	0)	13.840	13.833	79
(-1	-1	1)	8.369	8.366	54	(0	1	2)	9.080	9.079	37
(0	-1	1)	7.647	7.647	51	(0	-1	1)	8.790	8.786	41
(1	1	1)	7.373	7.374	33	(0	0	2)	8.190	8.189	68
(1	2	0)	7.080	7.082	63	(0	2	1)	7.760	7.755	75
(-1	0	2)	6.863	6.857	59	(1	1	0)	7.380	7.381	83
(0	2	2)	6.291	6.292	14	(1	2	0)	6.300	6.300	30
(-1	-2	1)	6.003	6.002	13	(1	0	1)	6.050	6.052	51
(1	0	1)	5.756	5.758	24	(1	2	3)	5.030	5.029	32
(1	2	2)	5.664	6.662	23	(1	-1	1)	4.695	4.695	44
(1	1	2)	5.434	5.431	38	(-1	0	3)	4.438	4.437	79
(1	3	0)	4.850	4.852	20	(-1	2	1)	4.277	4.276	58
(-1	-1	3)	4.660	4.660	52	(-1	-3	1)	4.201	4.202	59
(-2	-1	2)	4.391	4.390	21	(-1	2	0)	4.064	4.063	77
(2	2	1)	4.224	4.225	27	(1	4	0)	3.774	3.773	99
(1	-1	1)	4.211	4.212	35	(0	4	1)	3.743	3.744	100
(-1	2	3)	4.082	4.083	27	(1	-2	2)	3.250	3.250	22
(0	3	0)	3.918	3.921	53	(1	1	5)	3.170	3.169	39
(-2	-3	2)	3.608	3.607	52	(-1	0	5)	3.054	3.053	26
(2	0	1)	3.291	3.291	24	(0	0	6)	2.730	2.729	23
(-1	3	4)	3.138	3.137	19	(1	-3	2)	2.695	2.695	31
(-2	0	5)	3.006	3.008	17	(-2	-1	4)	2.688	2.688	28
(-2	2	1)	2.719	2.721	18	(-1	-2	5)	2.579	2.578	25
(0	-4	1)	2.656	2.657	15	(0	4	7)	2.547	2.546	24
(2	-2	1)	2.315	2.316	12	(0	0	7)	2.340	2.339	22

**Tabla 2.- Parámetros y Figuras de Mérito de las celdas calculadas a partir de los patrones de DRX de polvos de los complejos hemina:imidazol 1:2 y 1:4, respectivamente.**

Parámetros	Complejo 1:2	Complejo 1:4
a (Å)	13.473	15.522
b (Å)	15.923	18.067
c (Å)	9.355	7.461
α (°)	95.2	98.1
β (°)	97.4	88.9
γ (°)	108.6	113.6
V (Å) <sup>3</sup>	1867	1897
M(20)	17	17

**Reacción de la hemina con fluoruros salinos.**

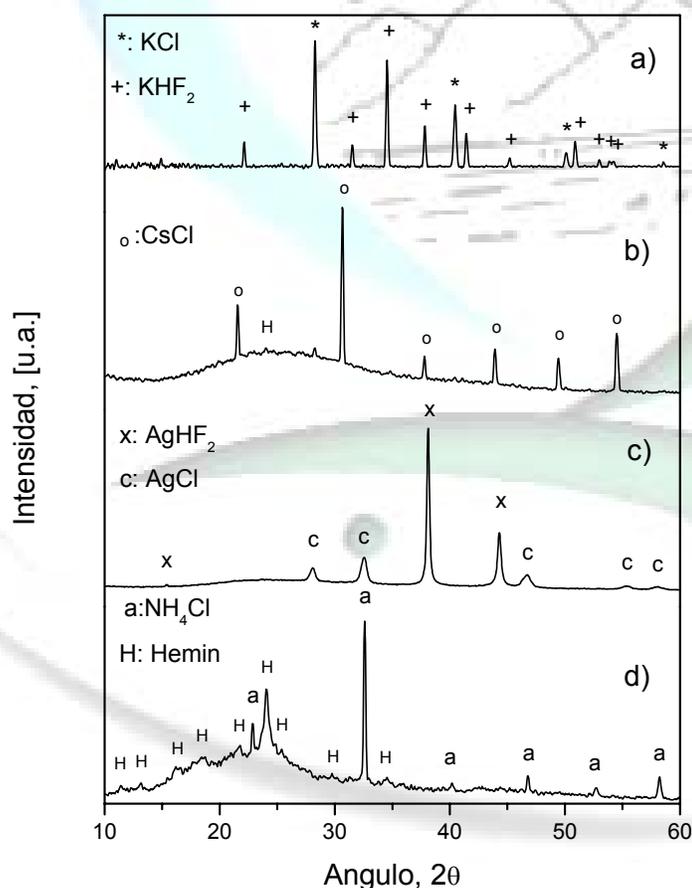
La técnica de difracción de rayos-x de polvo no solo es útil en la caracterización de los complejos de hemina, sino también en el estudio de la interacción de la hemina con sales.

La hemina puede reaccionar con los fluoruros en el sitio de coordinación del átomo de hierro central y con los grupos propiónicos de la periferia del anillo porfirínico. Los resultados se discutirán de acuerdo a estos dos posibles sitios de reacción.

Los fluoruros de cationes monovalentes pueden reaccionar con sustancias ácidas aún en el estado sólido para formar el anión complejo (FHF<sup>-</sup>) y la sal correspondiente de la sustancia ácida<sup>22-23</sup>. El LiHF<sub>2</sub>, NaHF<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>HF<sub>2</sub> y KHF<sub>2</sub> son compuestos cristalinos y sus patrones de difracción de rayos-x son conocidos<sup>22</sup>.

En las mezclas molidas de hemina con LiF o NaF, en relaciones molares 1:5, no se detecta formación de LiHF<sub>2</sub> o de NaHF<sub>2</sub> en los patrones de DRX correspondientes. El fuerte enlace existente entre el Li<sup>+</sup> y el F<sup>-</sup> en la sal LiF, y que explica su poca solubilidad, es también responsable de su carácter inerte en reacciones mecanoquímicas. En el caso del NaF, parece que los grupos carboxilos de la hemina no tienen la fortaleza ácida suficiente para participar en una reacción de transferencia protónica con esta sal. Cuando el NaF es molido con ácido oxálico, se forma el oxalato ácido de sodio indicando que el NaF sólo puede coleccionar protones muy ácidos.

El patrón de DRX de la hemina molida con KF, Fig 3 muestra la formación del KHF<sub>2</sub> (PDF 48-1667). Los patrones de las mezclas de hemina con NH<sub>4</sub>F y CsF en relaciones molares 1:5 sólo muestran picos de difracción muy débiles que fueron asignados a NH<sub>4</sub>HF<sub>2</sub> (PDF 12-0302) y CsHF<sub>2</sub>, respectivamente. Al parecer el fuerte carácter higroscópico de estos dos fluoruros ácidos da lugar a su pobre cristalinidad para ser detectado por DRX.



**Figura 3.- Patrones de polvo de DRX de las muestras molidas: a) hemina + KF (1:5); b) hemina + CsF (1:5); c) hemina + AgF (1:5); d) hemina + NH<sub>4</sub>F (1:5). Entre paréntesis se indican las relaciones molares de las mezclas.**

De acuerdo a las evidencias discutidas anteriormente, las reacciones con los grupos ácidos de la periferia de la hemina proceden como sigue:

- 1)  $R-(CO_2H)_2(s) + 4KF(s) \longrightarrow R-(CO_2K)_2(s) + 2KHF_2(s)$
- 2)  $R-(CO_2H)_2(s) + 4CsF(s) \longrightarrow R-(CO_2Cs)_2(s) + 2CsHF_2(s)$
- 3)  $R-(CO_2H)_2(s) + 4NH_4F(s) \longrightarrow R-(CO_2NH_4)_2(s) + 2NH_4HF_2(s)$
- 4)  $R-(CO_2H)_2(s) + 4AgF(s) \longrightarrow R-(CO_2Ag)_2(s) + 2AgHF_2(s)$

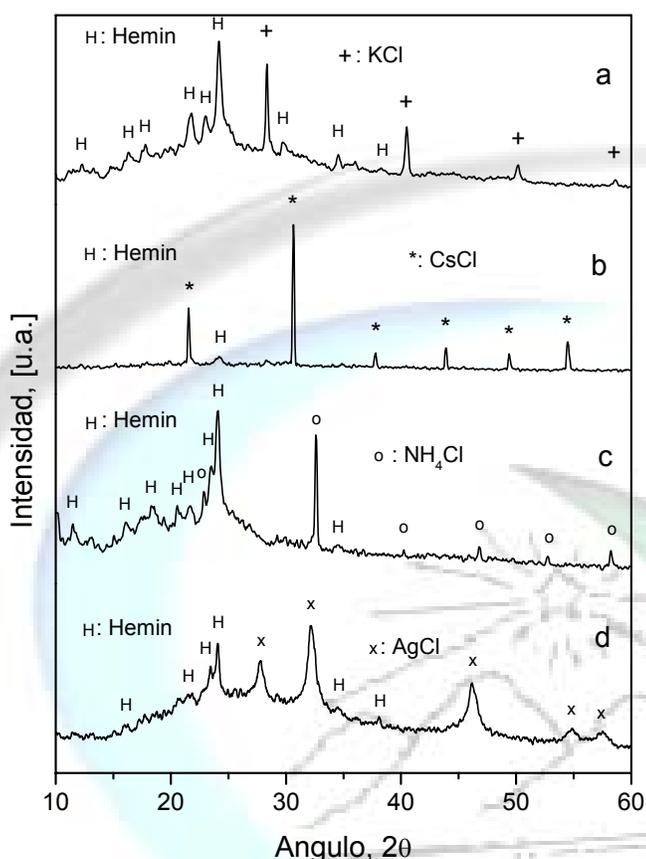
El ion fluoruro, debido a su mayor basicidad, debe desplazar al cloruro de la quinta posición de coordinación del ion Fe(III). Sin embargo, la reacción de intercambio va a depender de las energías reticulares de las sales utilizadas y de los productos de reacción. El LiF y NaF tienen energías reticulares muy elevadas y la molida no provee la energía necesaria para romper el retículo cristalino y favorecer el intercambio. En cambio, los restantes fluoruros tienen energías reticulares menores y la reacción de intercambio ocurre rápidamente dando los cloruros correspondientes. En consecuencia, es de esperar un intercambio de  $Cl^-$  por  $F^-$  en la quinta posición de coordinación del ion Fe(III) cuando la hemina se muele con KF, CsF,  $NH_4F$  y AgF. Los patrones de DRX de las mezclas molidas están de acuerdo con los resultados esperados. Con el LiF y NaF sólo se obtuvieron los patrones de difracción de ellos mismos y de la hemina parcialmente amorfa.

Los cloruros siguientes: KCl (PDF 41-1476), CsCl (PDF 05-0607),  $NH_4Cl$  (PDF 73-0365) y AgCl (PDF 31-1238) fueron detectados en las mezclas de reacción hemina con KF, CsF,  $NH_4F$  y AgF en relaciones molares 1:1, respectivamente. El CsCl fue detectado a pesar de la elevada humedad de la mezcla molida.

Se puede considerar que la hemina posee dos sitios activos frente al ataque de sustancias básicas y la interacción con uno u otro o con ambos sitios a la vez dependerá de la naturaleza de la sustancia.

En el patrón de DRX de la mezcla de reacción hemina:AgF en una relación molar 1:1 aparece la presencia de AgCl y no se detecta la formación del fluoruro ácido correspondiente. Este resultado demuestra que la reacción entre la hemina y el AgF primero tiene lugar en el sitio del ion Fe(III) debido a la elevada estabilidad del AgCl.

En el caso de los otros fluoruros la situación es muy similar, Fig. 4. La mayor estabilidad del complejo de hemina con el anión fluoruro en lugar del cloruro supera la tendencia de los fluoruros a colectar protones de los grupos ácidos para formar el anión  $(FHF)^-$  y por tanto la reacción tiene lugar primero en la quinta posición de coordinación del Fe(III). La presencia del grupo  $(FHF)^-$  correspondiente se detecta sólo cuando las relaciones molares hemina:fluoruros son iguales o superiores a 1:2.

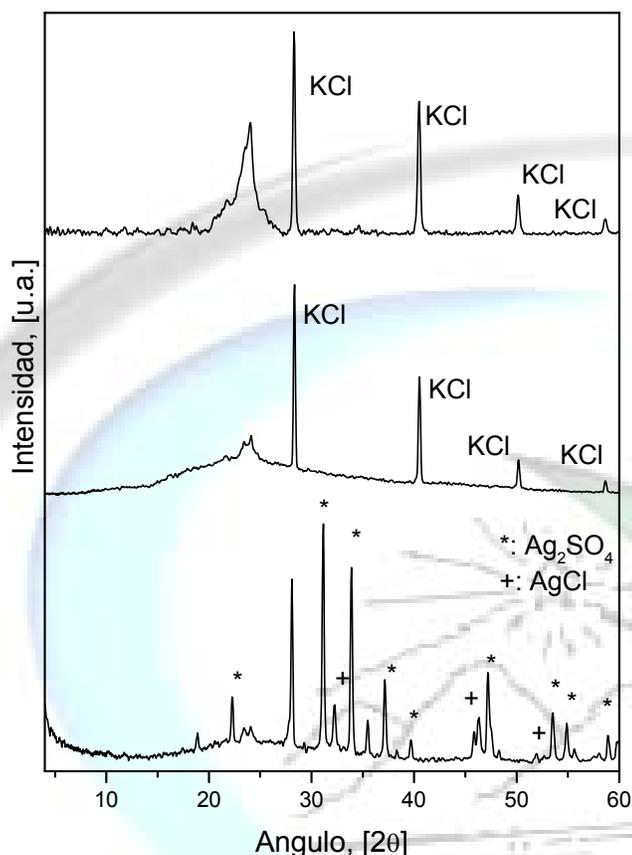


**Figura 4.- Patrones de polvo de DRX de las muestras molidas: a) hemina + KF (1:1); b) hemina + CsF (1:1); c) hemina + NH<sub>4</sub>F (1:1); d) hemina + AgF (1:1). Entre paréntesis se indican las relaciones molares de las mezclas.**

***Reacciones de la hemina con tiocianato de potasio, acetato de potasio y sulfato de plata.***

La interacción de las ferriporfirinas con ligandos aniónicos tales como el tiocianato, acetato y sulfato ha sido estudiada fundamentalmente mediante la espectroscopia Mössbauer, sin embargo cuando estas reacciones se realizan en estado sólido, las interacciones que ocurren son fácilmente detectadas por DRX. Los difractogramas de las mezclas de reacción se reportan en la Fig 5. En las Fig. 5a,b se detecta la presencia de KCl debido a la sustitución del anión cloruro por los aniones NCS<sup>-</sup> o acetato. En la Fig 5c se muestra el difractograma de la mezcla de reacción de la hemina con Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En el difractograma se observan máximos de difracción que demuestran la presencia de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en exceso y la formación de AgCl debido a la sustitución de los iones sulfatos por los cloruros. La formación del complejo hemina-sulfato ha sido reportada a partir del ácido sulfúrico y el acetato de hemina<sup>24</sup>. Esta es la primera vez que se obtiene dicho complejo empleándose el sulfato de plata, lo cual sugiere que la elevada estabilidad e insolubilidad del AgCl pueden ser empleadas para obtener nuevos complejos de hemina intercambiando los aniones en las sales de plata por el anión cloruro coordinado al Fe(III) en la hemina. El anión sulfato es divalente y por tanto la reacción hemina + Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sufre un efecto cooperativo entre moléculas de hemina vecinas en las cuales el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> esta coordinado.

En el patrón de DRX del complejo hemina-acetato no se observa la presencia de β-hematina<sup>25</sup> la cual ha sido observada en la síntesis de acetato de hemina en disolución.



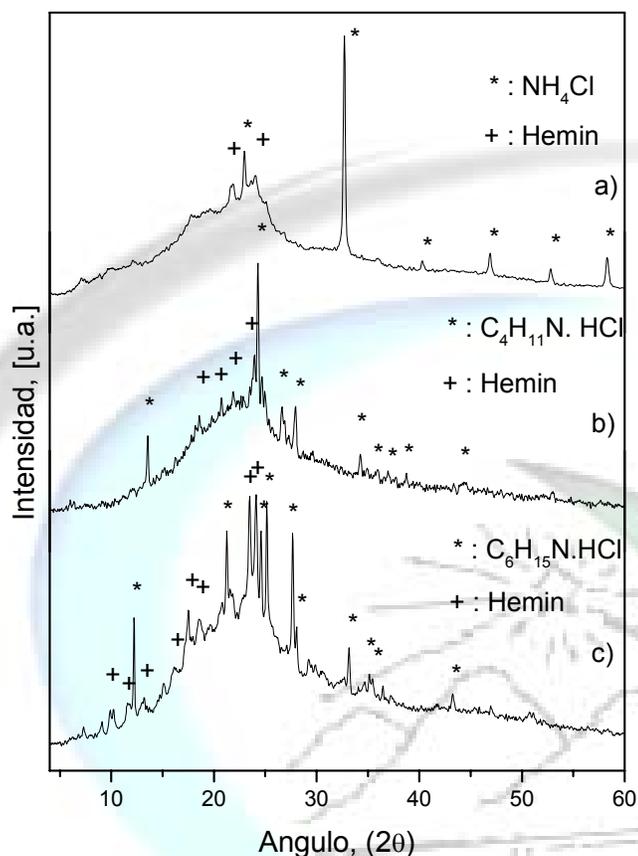
**Figura 5.- Patrones de polvo de DRX de: a) hemina + KSCN; b) hemina + Acetato de potasio; c) hemina +  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ . Los difractogramas de las muestras molidas corresponden a mezclas en relaciones molares hemina: bases 1:1.**

*Reacciones de la hemina con aminas alifáticas.*

Los estudios de aminas alifáticas con la hemina son limitados. Los dos trabajos que abordan con mayor profundidad la interacción de aminas con la hemina se deben a Marsh y Silver<sup>26</sup> y a Castro<sup>27</sup>. Es la primera vez que se utiliza la técnica de DRX para estudiar la interacción de la hemina con aminas.

En la Fig. 6 se reportan los patrones de DRX de las mezclas de reacción. Los picos más intensos en los difractogramas de las mezclas con amoníaco, dietilamina y trietilamina se corresponden con los patrones de difracción del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (PDF, 07-0007),  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}_2\text{H}_5\text{HCl}$  (PDF, 08-0761), y  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_2\text{H}_5\text{HCl}$  (PDF, 38-1974), respectivamente. En el caso de etilamina y ter-butilamina no se observó la presencia del clorohidrato correspondiente debido quizás a una baja cristalinidad de los productos de reacción.

Los resultados de este estudio permitieron unidos a los datos obtenidas por otras técnicas de análisis proponer mecanismos de reacción entre la hemina y las aminas alifáticas.



**Figura 6.- Difractogramas de polvo de: a) hemina + amoníaco (gaseoso); b) hemina + dietilamina; c) hemina + trietilamina. Los espectros de las muestras molidas corresponden a mezclas con exceso de amina.**

### Conclusiones

1. La hemina reacciona mecanoquímicamente con el imidazol para formar dos complejos, uno con dos imidazoles coordinados en las posiciones axiales del Fe(III) y el otro con 4 imidazoles, dos coordinados al Fe(III) y dos a los grupos carboxilos de la periferia de la hemina.
2. Las reacciones mecanoquímicas de la hemina con (KF, CsF, NH<sub>4</sub>F y AgF) dan lugar a la neutralización de los grupos ácidos de la hemina con la formación del fluoruro ácido correspondiente (KHF<sub>2</sub>, CsHF<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>HF<sub>2</sub> y AgHF<sub>2</sub>), mientras que en el sitio del Fe(III) el anión cloruro es reemplazado por el anión F<sup>-</sup> con la formación del cloruro correspondiente (KCl, CsCl, NH<sub>4</sub>Cl y AgCl). Estas reacciones tienen lugar primero en el sitio del Fe(III) y sólo después ocurre la neutralización de los grupos ácidos periféricos de la hemina. El LiF y NaF se encontraron inertes cuando se molieron con la hemina.
3. A partir de una reacción en estado sólido de la hemina con KSCN, acetato de potasio y Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es posible obtener complejos de la hemina con los aniones tiocianatos, acetatos y sulfatos donde estos aniones desplazan el cloruro.
4. La técnicas de DRX permite la caracterización de los complejos de hemina en estado sólido cuando la interacción ente la hemina y los ligandos tiene lugar en el Fe(III) o en los grupos ácidos de la periferia.

### Referencias.

1. J.B. Cannon, M.H. Yunker and N. Luoma "The Effect of Agregation Inhibitors and Antioxidants on the Stability of Hemin Solutions" *PDA J. Pharm. Sci. and Technology* 49/2:77-82 (1995).
2. H. Sakurai and S. Ogawa "Ortho and Para Selectivity in Aromatic Hydroxylation by Iron-Thiol and Hemin-Thiol Complexes" *Biochem. Pharmacol.* 24:1257-60 (1975).
3. M.F. Perutz, J.V. Kilmartin, K. Nagai, A. Szabo and S. R. Simon "Influence of Globin Structure on the State of the Heme. Ferrous Low Spin Derivatives" *Biochemistry* 15/2:378-87 (1976).
4. W.A. Gallagher and W.B. Elliott "Alkaline Haematin and Nitrogenous Ligands" *Biochem. J.* 108:131-36 (1968).
5. V.P. Chacko and G.N. La Mar "Proton NMR Study of the Deprotonation of Axial Imidazole Ligands in Low-spin Ferric Porphyrin Complexes" *J. Am. Chem. Soc.* 104/25:7002-07 (1982).
6. F.A. Walker, D. Reis and V.L. Balke "Models of the Cytochromes b. 5. EPR Studies of Low-spin Iron(III) Tetraphenylporphyrins" *J. Am. Chem. Soc.* 106/23:6888-98 (1984).
7. C.E. Castro, M. Jamin, W. Yokoyama and R. Wade "Ligation and Reduction of Iron(III) Porphyrins by Amines. A Model for Cytochrome P-450 Monoamine Oxidase" *J. Am. Chem. Soc.* 108/14:4179-4187 (1986).
8. G. Sievers, H.Häkli, J. Luhtala and R. Tenhunen "Optical and EPR Spectroscopy Studies on Haem Arginate, A New Compound Used for Treatment of Porphyria" *Chem. Biol. Interactions* 63:105-114 (1987).
9. Z. Xinhua, H. Jiesheng and S. Panwen "A New Method of Preparation of Iron(II) porphyrin Complexes -Isolation and Characterization of Amine Complexes of Ferrous Porphyrin" *Polyhedron*, 15/16:2677-79 (1996).
10. J. Simplicio "Hemin Monomers in Micellar Sodium Lauryl Sulfate. A Spectral and Equilibrium Study with Cyanide" *Biochemistry* 11/13:2525-29 (1972).
11. A. Paneque, J. Fernández-Bertrán, E. Reguera and H. Yee "Solid state synthesis and structural characterization of bis and mixed complexes of hemin" *Struct. Structural Chemistry* 14/6:551-558 (2003).
12. A. Paneque, J. Fernández-Bertrán, E. Reguera and H. Yee "Spectroscopic characterization of hemin complexes obtained by mechanochemical reactions" *Transition Metal Chemistry* 29/4:451-456 (2004).
13. E. Reguera, J. Balmaceda, A. Paneque, J. Fernández-Bertrán, and H. Yee "Complex formation of ferric protoporphyrin IX from the reaction of hemin with ammonia and small aliphatic amines" *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry* 33/ 8:1405-1416 (2003).
14. A. Paneque, J. Fernández-Bertrán, E. Reguera and H. Yee "Mechanochemical Reactions of Fluorides with Hemin" *J. Fluorine Chem.* 13:1-5 (2002).
15. A. Paneque, J. Fernández-Bertrán, E. Reguera and H. Yee "Mechanochemical Synthesis of Hemin-Imidazole Complexes" *Transit. Met. Chem.* 26:76-80 (2001).
16. A. Paneque, J. Fernández-Bertrán, E. Reguera and H. Yee "Spectroscopic characterization of hemin complexes obtained by mechanochemical reactions" *Spectrosc. Letters* 36/1-2:83-92 (2003).
17. J. Silver and B.Lukas "Mössbauer Studies on Protoporphyrin IX Iron(III) Solutions" *Inorg. Chim. Acta* 78:219-24 (1983).

18. T.J. Egan, E. Hempelmann and W.W. Mavuso "Characterization of Synthetic  $\beta$ -haematin and Effects of the Antimalarial Drugs Quinidine, Halofantrine, Desbutylhalofantrine and Mefloquine on its Formation" *J. Inorg. Biochem.* 73:101-107 (1999).
19. S. Rani, A. Dorn, R.G. Ridley and J.L. Vennerstrom "Characterization of Chloroquine-hematin  $\mu$ -oxo dimer Binding by Isothermal Titration Calorimetry" *Biochim. Biophys. Acta* 1475:133-40 (2000).
20. Powder Diffraction Files (PDF-Data Base), (International Center for Diffraction Data, 1999, 12 Campus Boulevard, Newtown Square, Pa. 19073-3273 USA).
21. P.E. Werner, L. Ericksson, and M. Wesdahl "TREOR, a Semi-exhaustive Trial-and-Error Powder Indexing Program for all Symmetries" *J. Appl. Cryst.* 18:367 (1985).
22. R. Garvey, *Powder Diffraction*, 1:114 (1986).
23. J. Fernández-Bertrán and E. Reguera "Proton Transfer in the Solid State: Mechanochemical Reactions of Fluorides with Acidic Substances" *Solid State Ionics* 112: 351 (1998).
24. J. Fernández-Bertrán and E. Reguera "Study of the Interaction of Ozone with Solid Ferrocyanides" *Eur. J. Inorg. Chem.*, 31:1021-1027 (1994).
25. T.J. Egan, E. Hempelmann and W.W. Mavuso "Characterization of Synthetic  $\beta$ -haematin and Effects of the Antimalarial Drugs Quinidine, Halofantrine, Desbutylhalofantrine and Mefloquine on its Formation" *J. Inorg. Biochem.*, 73:101-107 (1999).
26. P.J. Marsh, J. Silver, M.C.R. Symons and F.A. Taiwo "Mössbauer and Electron Paramagnetic Resonance Studies on some New bis-(ligated) Porphyrinatoiron(III) Complexes with Aliphatic Amines. Models for Cytochromes b" *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*:2361-2369 (1996).
27. C.E. Castro, M. Jamin, W. Yokoyama and R. Wade "Ligation and Reduction of Iron(III) Porphyrins by Amines. A Model for Cytochrome P-450 Monoamine Oxidase" *J. Am. Chem. Soc.* 108/14:4179-4187 (1986).