

156
zej'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Síntesis, estudios espectroscópico y actividades redox
de compuestos modelo de NI (II) del sitio activo (F430)
de bacterias metanogénicas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

BIOLOGA

P R E S E N T A :

Claudia Soledad Salgado Barreiro

DIRECTOR DE TESIS : Dr. Thangarasu Pandiyan



FACULTAD DE CIENCIAS
PROCESO ACADÉMICO

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Síntesis, estudios espectroscópicos y actividades redox de compuestos modelo de Ni(II) del sitio activo (F430) de bacterias metanogénicas" realizado por la pasante Claudia Soledad Salgado Barreiro, con número de cuenta 8625416-6, pasante de la carrera de Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Thangarasu Pandiyan.

Propietario

M. en C. Hilda E. Calderón Villagómez.

Propietario

Q.F.B. Beatriz M. Pérez Ibarra.

Suplente

Química. Julia Jeanett Segura Uribe.

Suplente

Biol. Fernando Hernández Sánchez.

Consejo Departamental de Biología

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Thangarasu Pandiyan**, por su asesoría y dedicación a este trabajo, así como por su amistad.

A la **Dra. Carmen Durán D. de Bazúa**, a la **M. en C. Hilda Calderón**, a la **Q.F.B. Mónica Pérez I.**, a la **Q. Julia Segura U.** y al **Biol. Fernando Hernández** por la revisión del trabajo y sus comentarios.

También a la **Dra. Josefina De Gyves** y al **M. en C. Julio C. Aguilar Cordero** del laboratorio 113 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química por la asesoría y utilización de sus equipos.

Al **Biol. Hugo E. Castro Azuara** por sus recomendaciones sobre esta tesis, por su valioso apoyo fuera y dentro de la misma, así como por brindarme su cariño y el de compartir los momentos de dicha, risas, aventuras, conciertos y demás. Pero ante todo por enseñarme que la vida se puede vivir sencilla y tranquilamente. ¡Muchas Gracias!!.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** (DGAPA IN-203395) y **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT-400313-5-2406PB) por el apoyo económico para la realización de este trabajo y por la ayuda para el desarrollo del mismo.

A los laboratorios **PIQAYQA** y **LATEMAL** por el prestamo de sus instalaciones para ser posible el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del **Museo de Paleol. de la Fac. de Ciencias** y muy especialmente al **Dr. Pedro García B. (Peter)** por no dejarme morir en el intento y por su ayuda incondicional.

A la gente del **PIQAYQA** (Irene, Landy, Rosy, J. Benvenuta, M. Oaxaca, Nora, Roberto R., Maricela, Chayo, Elias, Sra. Angeles y todos aquellos que me faltaron de mencionar.) y **LATEMAL** : Rol, Erika, Marielena, Joel, Orlando, Hilda, Gaby y muy especialmente a Martuchini por compartir conmigo su pan de cada día; a Adriana por ser una gran amiga y por escucharme en los momentos difíciles y al gran Gerardo por su buen humor y por la colaboración en el arreglo de esta tesis.

A todos pero todos **mis amigos de la Facultad de Ciencias** por compartir aquellos años de estudio y por su amistad.

DEDICATORIA

Muy especialmente a mi hermano Memo quien nunca me dejó a la deriva económicamente en el tiempo de mis estudios universitarios y a mi hermana Dulce por permanecer junto a nosotros y a los dos por su hermandad, a quienes les pago simbólicamente con este trabajo.

Con mucho cariño a la persona que fue mi marido y quiero tanto. . .

GLOSARIO

Metil Co M y/o $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$	Metil coenzima M reductasa.
CoM y/o (HS-CoM)	Ácido sulfónico 2-mercaptoetano (Coenzima M).
HS-HTP	fosfato de 7-mercaptoetanoiltreonina.
factor F_{430}	Tetrapirrol de níquel.
(L)	Sistema ligando.
CV	Voltamperímetro cíclico.
porfirina	Estructura compuesta por cuatro anillos pirrólicos unidos entre sí por puentes metínicos(=CH-) formando un macroanillo.
estereoconfiguración	Estudio de la estructura tridimensional de las moléculas.
potencial redox	Es la pérdida (oxidación) o ganancia (reducción) de electrones que se mide en volts.
CH_4 y/o MeOH	Metanol
diamagnético	Propiedad de las sustancias que son repelidas por ambos polos de un campo magnético, es decir, - que son menos permeables a las líneas de fuerza magnética.
paramagnético	Propiedad de ciertas sustancias que son atraídas por un campo magnético.
$E_{1/2}$	media de la actividad de reducción y oxidación
ΔE_p	diferencia que existe entre los potenciales de reducción y oxidación.

INDICE

	Pág.
Abstract	X
Resumen	XI
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Rol biológico del níquel	1
1.2 Utilización de los microorganismos	4
1.2.1 Importancia de las bacterias metanogénicas	5
1.3 Definición de las coenzimas	7
1.3.1 Metil Coenzima M reductasa	8
1.3.2 Factor F ₄₃₀	9
1.3.3 Ligando y/o ligante macrocíclicos	11
1.3.4 Importancia de los modelos sintéticos	13
1.4 ANTECEDENTES	14
1.4.1 Estudios previos	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Hipótesis	19
2.2 Objetivo general	19
2.3 Objetivos particulares	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Materiales	20
3.1.1 Reactivos	20
3.1.2 Disolventes	20
3.2 Técnicas espectroscópicas	20
3.2.1 Espectrometría infrarroja	21
3.2.2 Espectrometría de luz ultravioleta y luz visible	21
3.2.3 Espectrometría de masas	22
3.2.4 Espectrometría de resonancia magnética nuclear	22
3.2.5 Técnica electroquímica	23
3.3 Desarrollo	24
3.3.1 Síntesis de los ligandos	25
3.3.1.1 Sulfuro de N,N-bis(bencimidazol-2-il-etil) (L ₁)	25
3.3.1.2 Sulfuro de bis(5,6-dimetil bencimidazol-2-il-etil) (L ₂)	25
3.3.1.3 Sulfuro de N,N-bis(bencimidazol-2-il-metil) (L ₃)	25

3.3.1.4 N,N-bis(bencimidazol-2-il-etil)etilendiamina(L ₄)	26
3.3.2 Síntesis de los complejos con ion metálico Ni(II)	29
3.3.2.1 Ni(II)(L ₁) Cl ₂ •2H ₂ O	29
3.3.2.2 Ni(II)(L ₂) Cl ₂ •2H ₂ O	29
3.3.2.3 Ni(II)(L ₃) Cl ₂ •2H ₂ O	29
3.3.2.4 Ni(II)(L ₄) Cl ₂ •2H ₂ O	29
3.3.3 Reacción de los compuestos de Ni(II) con CoM	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Espectro infrarrojo	31
4.2 Espectro electrónico	31
4.3 Propiedades electroquímicas	37
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
Bibliografía	46

Abstract

Methane formation from acetate is known to be the rate-limiting step in the methanogenic phase. Accumulation of volatile fatty acids in larger amount in an anaerobic process seems to lead to rate reduction of biogas production. There are no other strong reasons reported for the lowering of the biogas production rate, since the mechanisms or functions of methanogenic bacteria in anaerobic process are still unsolved. The nickel tetrapyrrole containing factor F_{430} is implicated in the final methane evolution step of methanogenic bacteria and has attracted considerable attention. Earlier studies show the ligand in F_{430} might also play an important role in activating nickel towards the methyl-CoM. The nickel(II)L compounds (L= 1, 2, 3 and 4) were prepared as a model compounds for active site of F_{430} . A red shift was observed in electronic spectra and elevation of redox potential was detected during the addition of a sodium salt of 2-mercaptoethanesulfonic acid (CoM) to Ni(II) complexes. The electrochemical studies results have good agreement with the electronic spectral data on the addition of the CoM to nickel compounds. It indicates the lowering of ligand field energy in the electronic spectra facilitating the enhancement of the redox potential of Ni(II) complexes. It is also evident that the change of reversibility from irreversible to quasi-reversible behavior on addition of CoM to Ni compounds, shows the faster geometrical rearrangement that take place during the reduction or oxidation of the Ni(II) compounds. The higher redox potential of Ni(II) model compounds may favor the production of methane from methyl CoM. The CV and electronic spectral results illustrate the higher possibilities of methane production from the reaction of methyl CoM with tripodal type of ligands in anaerobic conditions. The anaerobic reaction studies of of Ni(II) complexes with Methyl CoM to produce methane is under investigation.

Resumen

La formación del metano a partir de acetato por bacterias anaerobias se sabe que es el paso limitante de la fase de metanogénesis. La acumulación de ácidos grasos volátiles en cantidades grandes en los procesos anaerobios parece ser la causa de la reducción de la producción de biogás. No hay otras razones de peso reportadas para la reducción de la rapidez de producción de biogás, dado que los mecanismos o funciones de las bacterias metanogénicas en los procesos anaerobios todavía se desconocen. El factor F_{430} , que contiene el tetrapirrol de níquel y que está implicado en el paso final de la producción de metano por parte de las bacterias metanogénicas, ha atraído una considerable atención en el mundo científico en los últimos años. Estudios previos muestran que los ligandos en el F_{430} pueden jugar un papel importante en la actividad del níquel con la metil-CoM. Cuatro compuestos de níquel (II)L (L = 1, 2, 3 y 4) fueron preparados como compuestos modelo para el sitio activo del F_{430} . Se observó un corrimiento hacia el rojo en el espectro electrónico de estos compuestos modelo al adicionar la sal de sodio del ácido sulfónico 2-mercaptoetano (CoM) a los complejos de Ni(II). Los resultados de los estudios electroquímicos tienen un buen ajuste con los datos del espectro electrónico al adicionar la CoM a los compuestos de níquel. Esto indica la reducción de energía del campo ligando en el espectro electrónico que facilita la "calidad catalítica" de los complejos de Ni(II). También es evidente que el cambio de reversibilidad (de un comportamiento irreversible a cuasi-reversible) cuando se adiciona la CoM a los compuestos de Ni, indica un rearrreglo geométrico más rápido, que se realiza durante la reducción u oxidación de los compuestos de Ni(II). El alto potencial redox de los compuestos modelo de Ni(II) podría favorecer la producción de metano a partir de la metil-CoM. Los resultados del espectro electrónico y de la voltamperimetría cíclica ilustran las mayores posibilidades de la producción del metano en la reacción de la metil-CoM con los ligandos de tipo tripodal en condiciones anaerobias. Los estudios de reacciones anaerobias de los complejos Ni(II) con metil-CoM para producir metano se encuentran en estudio.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los trabajos realizados sobre síntesis, estudios de espectroscopía y actividades redox de ciertos compuestos modelo han contribuido a la investigación del impacto ambiental, principalmente para el tratamiento de las aguas residuales, basándose en el tratamiento anaerobio, ya que se considera a este uno de los procesos más aceptados para la degradación de residuos biodegradables. Se ha encontrado que el proceso de digestión metanogénica es sensible a los cambios de la carga hidráulica y orgánica, recuperándose muy lentamente una vez que estas son perturbada. Es por ello que se hacen estudios *in vitro* de las interacciones metabólicas, usando compuestos modelo. En este estudio se trata del sitio activo y/o factor F_{430} . El factor F_{430} es el grupo prostético de la coenzima metil-coenzima M reductasa de las bacterias metanogénicas, particularmente de la especie *Methanobacterium thermoautotrophicum* y este es el responsable de la producción de metano a partir de compuestos metilados.

1.1 Rol biológico del níquel

Thauer y colaboradores en 1980, publicaron un ensayo sobre el rol del níquel en los sistemas biológicos. El níquel es un elemento importante debido a que participa en un gran número de procesos biocatalíticos; su importancia radica en que, aparte de ser un elemento metálico de transición posee diferentes estados de oxidación (Moreno, 1981; Hausinger, 1987). Esta versatilidad de estados oxidativos le permite tener una buena vía de adaptación para cambiar las ligaduras de a formas biológicas de los organismos procariontes y eucariontes, tanto en la producción de ureasa activa que se presenta en las algas y plantas superiores como en la síntesis de monóxido-de-

carbono-deshidrogenasa de las bacterias acetogénicas o en la producción de metano en bacterias metanogénicas (Thauer y col., 1980; Ellefson y col., 1982). En estas últimas el níquel tiene la característica de ser un componente esencial, pues dependen de un 50% a un 70% del níquel para su crecimiento y desarrollo, el cual es incorporado en forma del factor F₄₃₀ (Diekert y col., 1981). También se encuentra en enzimas tales como las hidrogenasas, la metil-Coenzima M reductasa y las monóxido dehidrogenasas, que están implicadas en la coordinación N₂S₂ con el centro metálico, en el sitio activo (Martín y Bereman, 1988).

En los sistemas biológicos el níquel se encuentra en forma ionizada como Ni(II) que es estable y que presenta una geometría octaédrica al formar complejos con cisteína, citrato, nitriloacetato y EDTA; estos agentes pueden promover el consumo de níquel en las células (Thauer y col., 1980).

El níquel, al tener un arreglo de red metálica, permite que este ion funcione como un excelente catalizador en la hidrogenación de compuestos orgánicos, pues en esta forma tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de hidrógeno gaseoso (Mahan y Mayers, 1990). Además, al ser un metal de transición, tiene la habilidad de estabilizar una gran diversidad de ligandos a través de la coordinación con olefinas y acetileno, entre otros. La existencia estable y altamente reactiva de los complejos con Ni(II) permite crear intermediarios reactivos como compuestos penta o tetraordinados, así como una diversidad de estados de oxidación y números de coordinación que presentan en general los metales de transición (De la Parra y Arias, 1976).

i).- Estado de oxidación:

El níquel puede presentar estados de oxidación 0, +1, +2, +3 y +4; biológicamente los compuestos de níquel 0 y +1 son muy escasos. Los estados

trivalentes y tetravalentes se presentan únicamente bajo condiciones especiales, ya sea por oxidaciones extremas o por la interacción de ligandos electronegativos, por ejemplo trióxido de níquel dihidratado ($\text{Ni}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), trióxido de níquel y bario (BaNiO_3), (De la Parra y Arias, 1976). Al tener un conjunto de orbitales no ocupados los metales de transición, crean una alta variabilidad de estados de oxidación posibles. Ello permite a las metaloenzimas tener una buena vía de adaptación a los estados oxidativos para cambiar las ligaduras de las formas biológicas, como el O_2 , el N^2 o el S los cuales contienen grupos electrodonadores (Beveridge, 1989). La estabilidad del níquel disminuye conforme aumenta el estado de oxidación, pues los núcleos van siendo progresivamente inestables. En los sistemas naturales, se encuentra en el estado de oxidación más estable como níquel : +2 (De la Parra y Arias, 1976). Por esto, en los sistemas sintéticos se prefiere trabajar con este estado. Desde el punto de vista termodinámico, se comporta como reductor $\text{Ni}^{2+} + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{Ni}$ $\epsilon^\circ = -0.24\text{V}$ (Mahan y Mayers, 1990).

ii).- Estructura del níquel divalente:

El estado divalente del níquel forma parte de una gran diversidad de compuestos, además de ser el estado de oxidación más importante en la química de las soluciones acuosas (De la Parra y Arias, 1976).

La estructura de los complejos de níquel puede ser de varios tipos: octaédrica, tetraédrica y cuadrada planar. Algunas veces, un complejo puede cambiar de estructura dependiendo de factores como la temperatura y concentración (Cotton, 1972). La configuración cuadrada planar es estabilizada cuando se presentan interacciones fuertes de los ligandos con el níquel, para así crear complejos de cuatro coordenadas en el níquel(II) y/o complejos de porfirinas, como lo muestra la Fig.1 (Sacconi y Mani, 1987).

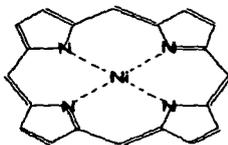


Fig.1 PORFIRINA

iii).- Complejos tetraédricos:

Biológicamente se ha reportado en la porfirina que el níquel (II) forma un complejo planar diamagnético, además, de estar en coordinación con cuatro nitrógenos ($Ni-N_4$); enfatizando que dicha coordinación es geoméricamente planar, en donde su macrociclo expuesto sufre una distorsión de forma de silla, y sus grupos ceto son disociados en cuatro posiciones *meso*. Por lo que el ion níquel tiene un centro de simetría, tendiendo a formar una geometría de seis coordenadas con enlaces de cuatro nitrógenos de pirrol y por dos ligandos axiales de pirimidina (Balch y col., 1993). Estas formas de complejos tetraédricos del ion metálico níquel en estado $Ni(II)$ son de importancia biológica para las bacterias metanogénicas (Pandiyán y col., 1996)

Es importante notar que los procesos que requieren de un ion metálico como el níquel, deben estar en un estado de oxidación específico ya que éste es el único que puede cumplir con los requisitos que se presentan en los procesos biológicos, ya sean estructurales o catalíticos (Moreno, 1981).

1.2 Utilización de los microorganismos

Se ha reconocido el enorme potencial de los microorganismos para ser utilizados en la degradación o remoción de contaminantes desde hace más de un siglo y se ha aplicado desde hace mucho tiempo, debido a que ellos juegan

un importante papel en todos los ecosistemas como en los mares, ríos, lagos, lodos, entre otros (Zehnder, 1988). Por ello, se han empleado en el tratamiento biológico de aguas residuales de origen urbano e industrial. Estudios realizados hace algunos años sobre aspectos de la fisiología y la genética molecular de los microorganismos y con el surgimiento de la biotecnología y la bioingeniería, entre otras disciplinas, se han establecido las bases para la aplicación de la biotecnología ambiental en los procesos llamados de biorremediación (Cervantes, 1996). Un ejemplo de ello, es el grupo de las bacterias metanogénicas, que se utilizan en estudios de la biotecnología ambiental en digestores usados para el tratamiento de aguas residuales, debido a que degradan por medio de la metanogénesis los ácidos grasos volátiles, como el acético, el propiónico y el butírico, cuando estos llegan a acumularse en los digestores o son sobrealimentados, dando como producto final : metano (López y col., 1993).

1.2.1 Importancia de las bacterias metanogénicas

Las bacterias metanogénicas son microorganismos de gran importancia desde el punto de vista científico y tecnológico, ya que tienen propiedades exclusivas y distintivas a diferencia de las demás bacterias. Por ejemplo, ellas estimulan los ambientes anaerobios, remueven el hidrógeno y producen metano, al reducir el carbón orgánico (Beveridge, 1989). Dado que el metano (gas natural) es una fuente de energía, resulta que las bacterias metanogénicas son generadoras netas de energía. Estas bacterias son anaerobias, mesófilas (27-42°C), quimioheterotróficas, es decir, que oxidan y reducen los compuestos orgánicos para alimentarse; genéticamente, también son muy distintas ya que la secuencia de su ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) difiere del de las demás bacterias, debido a que la cantidad de pares de bases de guanina y citocina van de un 27 a un 52% más que la de las otras bacterias, creando así una diversidad morfológica (Zehnder, 1988). Por todo ello, a las bacterias metanogénicas se les ha colocado en un nuevo reino denominado *Archeobacteria*, el cual se compone de tres órdenes: *Methanobacterales*,

Methanococcales y *Methanomicrobiales*. Además, tienen la particularidad de que presentan coenzimas muy particulares como: la coenzima M (HS-CoM), la metanopterina ó factor F₄₃₂, el metanofurano, el factor F₄₃₀, el componente B ó fosfato de 7-mercaptoetanolitreonina (HS-HTP) (Balch y col., 1979). También, se caracterizan por tener necesidades específicas de elementos vestigiales o traza (oligoelementos) como el hierro, níquel, cobalto, molibdeno, sulfuro, tungsteno y selenio (Speece, 1983). En los años 50's y 60's se profundiza en los estudios de los microorganismos anaerobios y sus procesos. Sin embargo, no es sino hasta los años 70's cuando las bacterias metanogénicas comienzan a jugar un papel considerable en el laboratorio (así como los organismos fotosintéticos), debido a que en 1973 se produjo una crisis de energía (por el embargo petrolero de los países árabes a los EUA), desarrollándose así el estudio de su vía metabólica (metanogénesis) en la formación del metano ya que este biogás es importante como fuente de energía (Beveridge, 1989).

La metanogénesis es un proceso anaerobio que satisface los requerimientos de energía en las bacterias metanogénicas, además de ser el último paso en el ciclo del carbón en muchos hábitats anaerobios, como lo son los medios marinos y los sedimentos de aguas dulces, pantanosas y negras, los suelos inundados, las zonas geotérmicas y los tractos digestivos de animales herbívoros (Ferry, 1993). Las bacterias metanogénicas producen metano, a partir de la reducción de acetato; de H₂ y de CO₂ o de cualquier otro compuesto reducido de un solo carbón como el carbón mineral o las metilaminas y ciertos alcoholes cuando están en presencia de CO₂ (Balch y col., 1979). Para la formación del metano es necesario llevar a cabo una reducción de compuestos de un solo carbón así como una aceptación de electrones. Se ha visto también que la reducción de CO₂ a metano puede también considerarse a través de los procedimientos del formato, formaldehído y metanol ya que son también fuertes donadoras de electrones (Beveridge, 1989).

1.3 Definición de las coenzimas

Una proteína metálica y/o coenzima es una proteína que además de estar constituida por aminoácidos, tiene un grupo inorgánico (por ejemplo un ion metálico) el cual recibe el nombre de grupo prostético, sitio activo o cofactor. La constitución de las metaloenzimas y enzimas en general está dada por los residuos correspondientes de los 20 aminoácidos esenciales y también por cuatro clases de interacciones: enlaces covalentes, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y por la interacción de las fuerzas de van der Waals (Moreno, 1981).

Las metaloenzimas se dividen en dos subclases:

1. Las metaloenzimas que se caracterizan porque el enlace que existe entre la proteína y el metal es tan fuerte que no puede romperse de forma reversible, es decir, si se intenta desplazar al metal del sitio que se ocupa en la proteína, esta se desnaturizará antes de perder el metal. Hasta la fecha, todos los intentos por sustituir el ion metálico a este tipo de proteínas han resultado inútiles (Moreno, 1981).
2. Los complejos metal-enzima que tienen la particularidad de que la proteína presenta mucho menor afinidad por el ion metálico y, consecuentemente, es relativamente fácil romper el enlace y formarlo de nuevo, es decir, el proceso de la proteína y el metal es reversible. Por lo tanto aquí es posible la sustitución del metal original por algún otro con ciertas características que permitan estudiar el comportamiento de la proteína (Moreno, 1981).

Las coenzimas son catalizadores necesarios en las reacciones enzimáticas, ya que generan un cambio de energía libre, el cual debe de ser negativo, para aumentar la velocidad de la reacción y permitir un acercamiento más rápido a las condiciones de equilibrio. Además, las coenzima se

caracterizan por ser termoestables (en energía libre, en calor de la reacción y en entropía) y son dializables (Bohinsk, 1991).

1.3.1 Metil Coenzima M reductasa (CH₃-S-CoM reductasa)

La metil-S-Coenzima M reductasa (CH₃-S-CoM reductasa) es una de las enzimas de mayor interés en las bacterias metanogénicas. Estimula la reducción directa del CO₂ por medio de dos electrones (Hausinger y col., 1984). Se caracteriza por ser una proteína ácida que contiene un oxígeno estable. Su absorción máxima está alrededor de 425nm. La componen tres subunidades: α, β y γ donde sus pesos moleculares son 68, 45 y 38.5 kDa, respectivamente. Tiene, además, una absorbencia de luz visible (430 nm) gracias a la presencia de un níquel de tetrapirrol llamado factor F₄₃₀ (Rospert y col., 1991; Thauer y col., 1980; Zehnder, 1988).

La apoenzima de la metil-S-CoM reductasa es la Coenzima M (HS-CoM), que ayuda a enlazar los átomos intermediarios de un solo carbón a los grupos mercapto de la coenzima M, con la finalidad de poder reducir después el CO₂ y así producir CH₄ (Ferry, 1993). Por lo tanto, la metil-CoM reductasa es de suma importancia en la reducción de la CoM (S-CoM) junto con el fosfato de 7-mercaptoetanoiltreonina (HS-HTP) y así producir metano, HS-CoM (heterodisulfuro) y HS-HTP (Rospert y col., 1991).

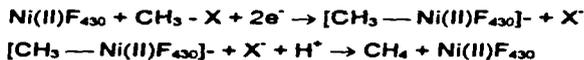
La combinación del metal (Ni) y la apoenzima o porción proteica (CoM) está ligada directamente a las cadenas de aminoácidos; es decir, el níquel es retenido en el grupo prostético F₄₃₀, tal y como sucede con el Fe en el grupo hemo o en la coenzima B₁₂ (Beveridge, 1989). En 1986, Eidsness y colaboradores, reportaron que la metil-Coenzima M reductasa se enlaza con el níquel siendo coordinada por 5-6 ligandos, los cuales probablemente incluyen a cuatro átomos de nitrógeno del pirrol y 1-2 átomos de oxígeno axiales o bien de nitrógeno. Estos autores sugieren que los sitios de coordinación del níquel en la

enzima-enlace del factor F_{430} son quizás los que participa en la catálisis (Hausinger, 1987). Debido a la fuerza de los ligandos del factor F_{430} estos juegan un importante papel en la actividad del níquel alrededor de la metil-CoM (Drain y col., 1988). Además, el F_{430} participa en la degradación de los ácidos volátiles (López y col., 1993).

1.3.2 El Factor F_{430}

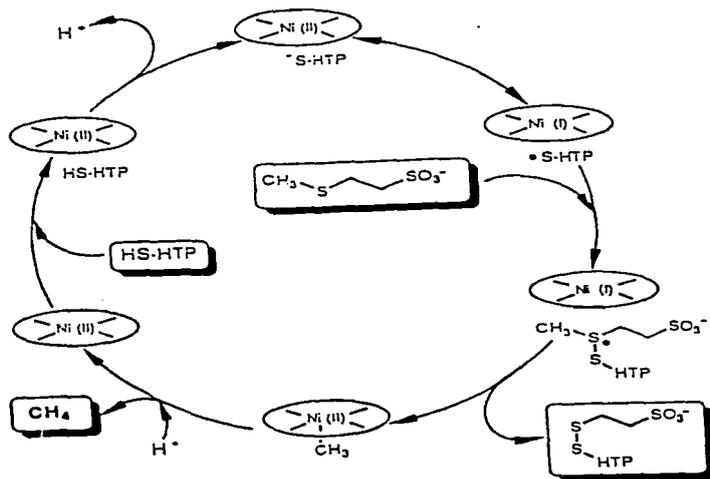
El cofactor o factor F_{430} es el sitio activo y/o grupo prostético de la metil-S-CoM reductasa y es el que cataliza la reacción del paso final en la síntesis del metano. Se compone de un grupo cromóforo de color amarillo el cual adquiere distintas formas estequiométricas debido particularmente a la presencia del níquel (Gunsalus y col., 1978). Estudios recientes demuestran que a este compuesto se le incorporan 8 moléculas de ácido- α -aminolevulínico y/o succinato, los cuales son los que van a formar el tetrapirrol (Ellefson y col., 1982), además de contener un esqueleto de ligadura uroporfinoide tipo III con un círculo adicional carboxílico (Hausinger y col., 1984).

La función principal de factor F_{430} es el mecanismo catalítico que presenta en la forma reductora del Ni(I) pues lo metila para producir metil-Ni(II) F_{430} (Lin y Jaun, 1991). Este compuesto metaloorgánico es sometido a una rápida protonólisis donde se forma metano y Ni(II) F_{430} (Jaun y Pfaltz, 1988; Lin y Jaun, 1991):



Recientemente se estableció que la reducción catalizada de la enzima metil-CoM reductasa con HS-HTP continúa vía inversión de la estereoconfiguración (Ahn y col., 1991). Este resultado es consistente con una metil-Ni(II) F_{430} como con un enlace enzimático intermedio; la metilación del

$Ni(II)F_{430}$ con $CH_3-S-CoM$ es por medio del procedimiento de inversión y por la protonólisis subsecuente de la estereoconfiguración. El potencial redox doble del $Ni(II)F_{430}/Ni(I)F_{430}$ es negativo $-500mV$ (Jaun y Pfaltz, 1986; Jaun, 1990). Esto se puede explicar porque existe una dificultad para activar la enzima una vez que el factor F_{430} se encuentra oxidada. Por ello, se ha sugerido que el HS-HTP puede reducir a la enzima en el enlace de la coenzima F_{430} , en una reacción redox involucrando el intercambio de un electrón. Basado en esta propuesta, se sugiere un mecanismo catalítico de la metil-CoM reductasa como se muestra en la Fig. 2 (Berkessel, 1991; Jaun, 1990; 1993).



Mecanismo catalítico de la metil-coenzima M reductasa propuesto por Berkessel (1991).

Fig.2

También sugiere que el fosfato de 7-mercaptoetanoiltreonina (HS-HPT) puede reducir la ligadura de la enzima con la del cofactor debido a la reducción

de un electrón (Beveridge, 1989). Esto permite que el factor F_{430} se una a la metil-HS-CoM reductasa en una relación 2:1 del F_{430} por enzima (Thauer y col., 1980). Las características de interés que presenta el factor F_{430} son:

- * Biológicamente tienen un único tipo de conjugación, presentando una estructura híbrida entre las porfirinas.
- * Se tiene la presencia de un anillo carboxílico adicional. Por lo que la presencia del tetrapirrol de níquel aún no es clara. Sin embargo, el descubrimiento de los derivados de la CoM asociados al factor F_{430} en una proporción estequiométrica de 1:1 presentan propiedades interesantes en la oxidación y reducción del factor (Zehnder, 1988).

1.3.3 Ligando y/o ligante macrocíclico

Un ligando macrocíclico se define como un átomo, grupo o compuesto unido directamente al átomo central (ion metálico) por medio de un enlace coordinado situado en la esfera de coordinación. El ligando puede ser un anión (-), una molécula neutra o menos frecuentemente, un catión (+); se pueden presentar diferentes tipos de ligandos: monodentado, bidentado (como la etilendiamina) y multidentado, siendo casi siempre tres o más átomos los donadores de pares electrónicos (Sabater y col., 1985). Los ligandos con nitrógeno, azufre, fósforo y/o arsénico tienen gran afinidad con los iones de metales de transición y también con los metales pesados; en contraste, muestran poca tendencia a formar complejos estables con los iones alcalinos y alcalinotérreos (Jiménez, 1992).

Además, los macrociclos confieren una estabilidad termodinámica muy alta, debido a que el complejo ligando es de cadena cerrada y una estabilidad cinética, puesto que estando el metal firmemente unido en el macrociclo acivo, sus funciones biológicas no se ven influenciadas por reacciones de competencia, por ejemplo en la desmetalación (Jiménez, 1992).

Los sistemas constituidos por compuestos macrocíclicos son especialmente atractivos para ser estudiados electrónicamente, puesto que son menos susceptibles de experimentar equilibrios de competencia interferentes, como la disociación del ligando o ligante; asimismo, es ampliamente reconocida la capacidad de los ligantes macrocíclicos para estabilizar estados de oxidación poco comunes de sus iones coordinados, tales como el Ni(III) y Cu(III), Ag(II), Ni(I), Cu(I), Fe(I) y Co(I) (Jiménez, 1992).

Para la síntesis de ligandos macrocíclicos que requieren de un ion metálico, se ha visto que son necesarios los ligandos de tipo base de Schiff, es decir, ligandos que contienen un grupo imino CN^+ , los cuales se obtienen a partir de la condensación de diaminas primarias con dialdehídos o dicetonas. Los complejos de níquel (II), son los ideales para enlazar Ni-N y obtener ligandos de forma cuadrado planar (Jiménez, 1992).

También, se ha visto que los presentes ligandos no exhiben potenciales redox bajos; esto es un dato valioso para notar que los efectos cambiantes en la coordinación natural tienen propiedades electroquímicas. Los cambios planares del níquel $n=0$ a pseudo-tetraedral, del níquel $n=5$, implican un cambio en el potencial de oxidación de 250mV, mientras que en el potencial de reducción es de 410mV. Esto, aparentemente, hace que la distorsión de un $[Ni(II)N_2S_2]$ vaya incrementando pues de la geometría cuadrado planar a tetraedral tiene gran influencia alrededor de los potenciales bajos de oxidación (Martín y Bereman, 1988).

Las bandas de baja energía, corresponden a la transición de ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{2g}$, de los complejos octaédricos del níquel(II) que contienen donadores de nitrógeno y azufre (compuestos de azufre) (Stranger y col., 1992). Los cambios geométricos ocurren en respuesta a los cambios en la estructura electrónica del centro de níquel. Para el diamagnético, las formas de las cuatro coordenadas con el empalme de los orbitales $d_x^2 - y^2$, el macrociclo es distorsionado para que el ion

níquel (II) de tamaño pequeño pueda ser acomodado. Sin embargo, para el paramagnético, las formas de seis coordenadas con un único electrón en los orbitales, $d_x^2 - y^2$ y d_z^2 , las distancias de los enlaces dentro del plano y fuera de este del Ni-N son largas y los macrociclos son viables para asumir una geometría cuadrado planar (Balch y col., 1993).

1.3.4 Importancia de los modelos sintéticos

Uno de los problemas con mayor impacto e implicaciones a nivel mundial es la comprensión de la relación entre la estructura, la dinámica y la función de las macromoléculas biológicas. Es por ello que se plantean los estudios de modelación molecular y simulación de la estructura de moléculas bioinorgánicas, los cuales son procedimientos que reproducen la estructura tridimensional probable de la molécula y/o proteína en estudio (Soriano, 1994). Los modelos sintéticos son diseñados por varios motivos, como se enlista a continuación (Pandiyán y col., 1992) :

1. Los modelos sintéticos pueden ser utilizados para tratar de elucidar el sitio activo de alguna proteína, cuando este se desconoce. Estos modelos en general son conocidos como "*modelos especulativos*".
2. Los "*modelos corroborativos*" son empleados para producir una mayor comprensión de la correlación entre la estructura y la actividad de las proteínas. Cuando se sabe la estructura de la proteína, su sitio activo también queda definido. Particularmente, los compuestos de bajo peso molecular, pueden dar información valiosa acerca de los efectos de constreñimiento sobre los espectros y sobre las propiedades catalíticas del ion metálico (Pandiyán, 1992).
3. Los "*modelos aplicativos*" son utilizados cuando ya se tuvo un conocimiento suficiente de la estructura y propiedades de los sitios activos en las

metaloproteínas. La manera de utilizarlos es aplicándolos en la catálisis o bien como medicamentos (Pandiyán y col., 1992).

Se ha visto que los complejos sintetizados en el laboratorio sobre la estructura del factor $F_{430}/Ni(II)$, tienen que ver con la estructura de las porfirinas, haciendo reactivo al ion metálico el cual lleva la tarea específica de catálisis en las coenzimas. Por lo tanto, la síntesis del complejo de $Ni(II)$ es un compuesto que se valúa como un modelo químico apropiado para el factor F_{430} (Fassler y col., 1984).

1.4 ANTECEDENTES

La aplicación de trabajo más directa que se ha hecho con las bacterias metanogénicas en México, es con biorreactores para el tratamiento anaerobio de aguas residuales pues numerosos ayuntamientos y compañías lo utilizan para el tratamiento de desperdicios domésticos e industriales. Hay que hacer notar que en México se tienen diferentes agroindustrias que generan aguas residuales biodegradables, lo cual permite considerar la aplicación del tratamiento anaerobio. Las reacciones anaerobias incluyen una serie de complejas interacciones metabólicas en donde participan al menos tres grupos de bacterias. Las bacterias fermentativas hidrolizan el sustrato de polímeros (carbohidratos, grasas y proteínas) a compuestos solubles simples. El segundo paso se lleva a cabo por la producción obligada de H_2 por las bacterias acetogénicas las cuales oxidan el propionato, butirato y cadenas largas de ácidos grasos para dar acetato, CO_2 e H_2 . Finalmente, la metanogénesis llevada a cabo por las bacterias metanogénicas utiliza el acetato y el H_2 producido para formar metano (López y col., 1992).

La formación del metano a partir de acetato en un biorreactor es el paso limitante en la fase metanogénica. La acumulación de propionato en grandes cantidades en un proceso anaerobio conduce a una disminución en la velocidad

de producción de biogases. Sin embargo, no hay otras razones reportadas para la disminución de la velocidad de producción de biogás, ya que los mecanismos de las bacterias metanogénicas en estos procesos anaerobios son todavía problemas no resueltos (Pandiyán y col., 1992). Esta es una de las causas que llevó a hacer un estudio más profundo de la vía metabólica y/o de la metanogénesis de las bacterias metanogénicas para después desarrollar un modelo (*in vitro*) que permita primeramente obtener el sitio activo de la metil-CoM reductasa.

Para tener idea de la estructura conformacional de la $\text{CH}_3\text{-S-Co-M}$ reductasa se retomará la bibliografía que informe sobre los estudios realizados sobre la coenzima y a partir de esta información se sintetizará en el laboratorio, cumpliendo con la estructura y cualidades que posee el factor F_{430} y a los ligandos que hacen posible la existencia de la metil-CoM reductasa.

1.4.1 Estudios previos

Para superar las dificultades de síntesis de los anillos de tipo pirrol de la metil-CoM reductasa, se ha observado recientemente que el bencimidazol es un compuesto accesible para ser sintetizado ya que sus ligandos son acomplejados con el nitrato del níquel(II), permitiendo la construcción de modelos de metaloenzimas. Por ello, la síntesis de los sitios activos se utiliza con la finalidad de entender la relación que existe entre la estructura y función de la metaloenzima que se quiere conocer (Pandiyán y col., 1996).

La síntesis de los sitios activos de varias metaloproteínas se ha utilizado el entendimiento que existe entre la relación de estructura y función. Para entender la síntesis de los pirroles alrededor de la metil-Coenzima M reductasa, se utiliza el bencimidazol sintético ya que sus ligandos son accesibles para la propia síntesis y para crear complejos con iones de níquel(II). Al adicionar ácido sulfónico 2-mercaptoetano con coenzima M (CoM) a los compuestos de Ni(II)L se eleva generalmente el potencial redox de los complejos.

Estos procesos sintéticos descritos en la literatura señalan que para obtener varios ligandos multidentados tienen que ser incorporados los extremos del bencimidazol. Hay que recordar que la obtención de los bencimidazoles se obtiene por condensación de ácidos orgánicos con O-fenilendiaminas (Sivagnanam y col., 1993).

Se tiene una regla esencial del F_{430} en la formación del metano que fue demostrada por Ankel-Fuchs y Thauer (1986), quienes reportaron la catálisis *in vitro* de $\text{CH}_3\text{CSCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ con metil-CoM, metano y CoM al purificar la metil Coenzima M reductasa bajo condiciones reductoras y en donde el factor F_{430} presentó tres estados de oxidación: Ni(I), Ni(III) y Ni(II) respectivamente (Jaun y Pfaltz, 1986). Esto es de gran interés para examinar la regla del ion níquel en estado de oxidación en la catálisis de la metil-CoM. Drain y colaboradores (1988) han establecido que ambos estados de oxidación mono y divalente de los complejos Ni(dioxo{16}-aneN5), NiL en agua soluble, catalizan a la metil-CoM a metano y CoM (Walsh, y Orme-Johnson, 1987; Bakac, y Espenson, 1986).

Con base en los estudios de Ankel-Fuchs y Thauer, Drain y colaboradores al crear un factor sintético del F_{430} (como se muestra en la Fig.3) en donde comprueban que este factor F_{430} sí está implicado en la formación del metano (Drain y col., 1988).

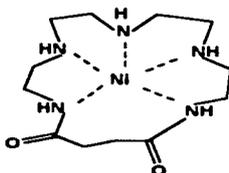
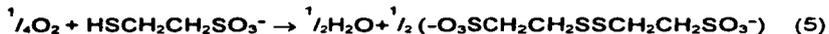


Fig.3

Una reacción secuencial inducida por el Ni^{II}L de la metil-CoM es la siguiente:



la reacción neta:



Uno de los mecanismos que se propusieron (Walsh y Orme-Johnson, 1987) para la metil-coenzima M reductasa fue el Ni^{II}F₄₃₀ ya que es el primer reductor para Ni^IF₄₃₀, el cual homolíticamente divide a la metil-CoM para producir metil-Ni^IF₄₃₀ y dar metano y Ni^{II}F₄₃₀. El último paso de la protonación final consistente en la hidrólisis altamente sensible al aire de los macrociclos treataza alquil-Ni^I. El reciente descubrimiento de un derivado de heterodisulfuro de la CoM y 7-mercaptoetanolitreonina fosfato (HS-HTP) formada durante la metanogénesis (Ellermann y col., 1990) fue predicho por este mecanismo. El disulfuro de la CoM es también observado en el sistema modelo. En adición, Drain y colaboradores (1988) han establecido que la reactivación del Ni^{II}L no es tipificada con la química del níquel (II). La solución acuosa de tatraetilpentamina de níquel (II), acetato de níquel (II), níquel (II) 1,4,8,11-tetrazaazacicotetradecano-5,7-diona y en donde han obtenido que la metil-CoM no produce metano y menos aún cuando se encuentran en atmósferas de argón e hidrógeno. Esto aclara que las actividades del ligando (L) del Ni(II) se da hacia la metil-CoM. Esto implica que el ligando en el factor F₄₃₀ podría jugar un

papel importante en la activación del níquel hacia la metil-CoM (Drain y col., 1988).

Con base en estos conocimientos científicos publicados, en el siguiente capítulo se presentan los objetivos de este trabajo.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Es posible entender los mecanismos y funciones de la metil-coenzima M reductasa de las bacterias metanogénicas en la producción del metano para aplicarlos como modelos de laboratorio, entonces, se espera obtener a través de la investigación biotecnológica ambiental, la información necesaria que permita expandir la utilidad de estos mecanismos en otros campos de la investigación, por ejemplo en la optimización de la operación de los biorreactores anaerobios empleados en la depuración de aguas residuales industriales, domésticas o mixtas que contengan materiales biodegradables disueltos.

2.2 Objetivo general

- * Investigar por medio de la bibliografía los mecanismos y funciones de la metil-coenzima M reductasa de las bacterias metanogénicas productoras de biogás para aplicar compuestos modelo de laboratorio.

2.3 Objetivos particulares

- * Sintetizar cuatro compuestos modelo con sistemas ligando en base al factor F_{420} que contiene la metil-CoM reductasa de las bacterias metanogénicas.
- * Caracterizar los cuatro compuestos modelo por medio del espectro de masas y de RMN.
- * Llevar a cabo estudios espectrales de los compuestos modelo en espectro electrónico de UV-Vis.
- * Hacer estudios de la actividad redox de los compuestos modelo por medio de un voltamperímetro cíclico.
- * Corroborar la estructura de los compuestos modelos que semejan al sitio activo de la metil-CoM reductasa con los datos de los objetivos anteriores .

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

3.1.1 Reactivos

Los reactivos que se mencionan a continuación se utilizarán en este trabajo de tesis: acrilamida, 1,2-etilendiamina, 3,4-diaminotolueno, 1,2-fenildiamina, o-fenildiamina (Aldrich); hidróxido de sodio granular (Baker Analyzed); metilo de acetato, cloruro de níquel(II) hexahidratado (Merck); ácido-2-mercaptoetano sulfuro 3M (Fluka).

3.1.2 Disolventes

Los disolventes utilizados fueron: metanol absoluto, 3,3'-ácido tioldipropiónico, ácido clorhídrico, amoníaco, acetato de etilo (Baker Analyzed); acetato de etilo y cloroformo (Merck).

3.2 Técnicas de espectrometría

Los estudios de las técnicas espectroscópicas poseen la ventaja de poder examinar la estructura tridimensional de las moléculas bioinorgánicas en disolución, así como observar las propiedades intrínsecas del comportamiento de los sistemas en los que actúan. En general, los iones metálicos presentan una gran variedad de propiedades obseables a través de las técnicas espectroscópicas (Soriano, 1994). Los análisis elementales fueron hechos en el Instituto Central de Investigación de Farmacos (CDRI), India.

3.2.1 Espectrometría infrarroja

La radiación infrarroja comprende la parte del espectro electromagnético comprendida entre las regiones visible y las microondas. Aún cuando el espectro infrarrojo es característico de todas las moléculas, resulta que ciertos grupos de átomos originan bandas a frecuencias muy cercanas, en forma independiente de la estructura, del resto de la molécula (Silverstein y Bassler, 1980). Por lo tanto, las lecturas se dan a manera de espectro de bandas que representan las transiciones entre los niveles moleculares de vibración, transiciones que se producen en la región infrarroja que va de 1μ a unas 100μ (Sabater y col., 1985). Las posiciones de las bandas en los espectros infrarrojos se representan como longitudes de onda o como números de ondas (cm^{-1} , recíproca de centímetro), por ser directamente proporcionales a la energía y porque los nuevos espectrómetros sofisticados son lineales en la escala de cm^{-1} (Silverstein y Bassler, 1980).

3.2.2 Espectrometría de luz ultravioleta y luz visible

El espectro UV-Vis se utiliza para medir la cantidad de luz absorbida en cada longitud de onda de la región visible y ultravioleta, es decir, cuando los compuestos absorben en estas regiones los electrones se excitan desde los niveles basales de energía a otros de mayor energía; por esta razón los espectros de UV-Vis se denominan espectros electrónicos (Sabater y col., 1985). La mayoría de las bandas de absorción en la región UV (200 nm - 350 nm)-Vis (400 nm - 750 nm) son anchas ya que cada nivel electrónico de energía está asociado con niveles rotacionales y vibracionales, provocando la transición de los electrones (Sabater y col., 1985).

En los espectros de absorción, tanto I.R. y UV-Vis, las dos formas de una proteína metálica pueden utilizarse para hacer determinaciones del comportamiento tanto cinético como termodinámico del enlace-metal proteína.

Por otro lado, el espectro en la región del visible también se puede obtener, es el patrón a través de aparición de las bandas correspondientes a las transiciones d-d; independientemente de otro tipo de técnicas, este análisis puede elaborarse para determinar tanto la clase ligante unida al ion metálico, como la estereoquímica del sitio en que se encuentra el ion metálico. También pueden tenerse indicaciones de la longitud del enlace (Moreno, 1981).

3.2.3 Espectrometría de masas

Un espectro de masas bombardea la carga de la masa de interés con un haz de electrones y registra cuantitativamente el resultado a modo de un espectro de fragmentos de iones positivos. Este registro corresponde al espectro de masas (Silverstein y Bassler, 1980).

Los espectros de masas se obtienen rutinariamente a una energía del haz de electrones equivalente a 70 electrón-volts. El fenómeno más sencillo que se representa es la remoción de un electrón de la molécula en fase gaseosa por parte de un electrón (del haz de electrones) para formar un ion molecular padre (M^+), representando el radical catión. El espectrómetro de masas clasifica a estos cationes con base en sus masas. Además, imparte a estos iones moleculares un excedente de energía necesario para romper los enlaces covalentes que hacen que la mayoría se fragmenten (Solomons, 1988).

3.2.4 Espectrometría de resonancia magnética nuclear

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) es otra forma de espectrometría de absorción por medio de radiación electromagnética; tal absorción se da en función de ciertos núcleos en la molécula (Silverstein y Bassler, 1980).

Todos los núcleos llevan una carga. En algunos núcleos, esta carga hace un giro o "spin" en el eje nuclear y esta circulación de la carga nuclear genera un dipolo magnético a lo largo del eje. Como consecuencia de esto, los núcleos del hidrógeno del compuesto pueden absorber energía mediante un proceso conocido como resonancia magnética. Esta absorción de energía al igual que todos los procesos que se llevan a cabo a escala atómica o molecular, están cuantizados (Solomons, 1988).

Así, la resonancia magnética se utilizó para los estudios de los detalles estructurales de las proteínas en solución y/o compuestos de ligandos sintéticos.

3.2.5 Técnicas electroquímicas

La voltamperimetría se utiliza ampliamente en estudios de reacciones de oxidación y reducción, en donde los procesos de absorción se hacen sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados (Skoog y Leary, 1993).

El funcionamiento del voltamperímetro consiste en una celda en donde se encuentran tres electrodos, los cuales están sumergidos en una disolución que contiene el analito y el electrolito no reactivo llamado electrolito soporte. Uno de los tres electrodos es el electrodo de trabajo ó microelectrodo cuyo potencial varía linealmente con el tiempo. Sus dimensiones son de tamaño reducido con el objetivo de resaltar su tendencia a ser polarizado. El otro electrodo es un electrodo de referencia cuyo potencial permanece constante durante el estudio. El electrodo auxiliar o contraelectrodo normalmente es una espiral de hilo de platino o también puede ser un depósito de mercurio que sirve simplemente para conducir la electricidad desde la fuente a través de la disolución al electrodo de trabajo. La fuente de la señal es un generador de potencial de barrido lineal (Skoog y Leary, 1993).

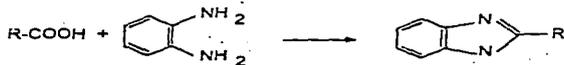
para conducir la electricidad desde la fuente a través de la disolución al electrodo de trabajo. La fuente de la señal es un generador de potencial de barrido lineal (Skoog y Leary, 1993).

La resistencia eléctrica del circuito de control que contiene el electrodo de referencia es suficientemente grande ($>10^9 \Omega$) como para que la intensidad de corriente sea despreciable. Por otro lado, el circuito del control ajusta esta corriente de manera que el potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia sea idéntica al potencial de salida del generador del potencial de barrido lineal. La intensidad de corriente resultante se convierte entonces en un potencia y es registrada en función del tiempo, y es directamente proporcional al potencial entre el par del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia (Skoog y Leary, 1993). Con los electrodos que se trabajarán fuerón de mercurio a una temperatura de 25 ± 0.2 C. La temperatura de la celda electroquímica se mantuvo con un criocirculador (HAKKE D8 G) y las soluciones se deoxigenaron por la búsqueda de burbujas de nitrógeno.

El instrumento utilizado incluido eficientemente fue el software EG & G M270, el cual se empleo para registrar los datos experimentales. Se utilizó un graficador HP (DMP 40) para graficar los voltagramas cíclicos. También se requirieron tres electrodos de configuración celular. El electrodo de referencia fue de $\text{Ag(s)}/[\text{AgNO}_3]$ (0.01 M), THAP (0.1 M) en acetonitrilo.

3.3 Desarrollo

Se empleara la metodología de condensación de Philips (1928), de acuerdo a lo informado por Sivagnanam *et al*, para la síntesis de benzimidazol (1993).



3.3.1 Síntesis de los Ligandos

3.3.1.1 Sulfuro de N,N-bis(bencimidazol-2-il-etil) [L₁]

Este compuesto se preparó como se describe en la literatura (Dagdgian y Reed, 1979). El ácido tiodipropiónico (17.8 g), y el o-fenildiamina (21.6 g) se pusieron a reflujo por 24 horas a temperatura de 60°C en ácido clorhídrico 2N (80 mL). Después se colocó a un baño de hielo ya que dicho compuesto es termosensible, ahí mismo se la adicionó hidroxido de amoni (NH₄OH) al 20% para eliminar las sustancias alcalinas libres observándose un cambio de color café a café lechoso que indica la formación de un precipitado en suspensión. Posteriormente, se filtro y se lavo con agua hasta neutralizar. El precipitado es purificado por medio de una cristalización con carbón activado usando como disolvente metanol. Una vez obtenido el producto puro se dejó secar por 15 días. Con un rendimiento del 61% y con un punto de fusión 203°C-203°C (Esquema 1).

3.3.1.2 Sulfuro de bis (5,6-dimetil bencimidazol-2-il-etil) [L₂]

Este compuesto se preparó como se describió anteriormente. Las sustancias que se hicieron reaccionar fueron el 3,4-diaminotolueno (12.22 g), 3,3'-ácido tiodipropiónico (8.9 g) con ácido clorhídrico 2N (80 mL). Con un rendimiento del 62% y un punto de fusión 203°C-204°C (Dagdgian y Reed, 1979). (Esquema 1).

3.3.1.3 Sulfuro de bis N,N-(bencimidazol-2-il-metil) [L₃]

Este compuesto se preparó como se describe en la literatura (Addison y Burke, 1981). Ácido tiodioglucólico (3.45 g), y o-fenildiamina (5.08 g) y ácido clorhídrico 2.5N (60 mL) durante 24 horas a 180°C. Ya frío el compuesto se le agrega hidróxido de amonio al 20% observándose un cambio de color gris a

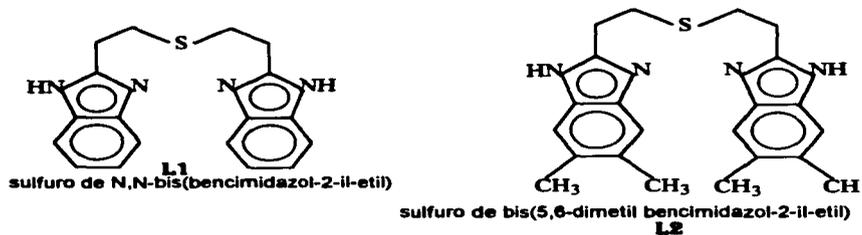
blanco que indica la formación de un precipitado en suspensión. Posteriormente se lava con agua hasta neutralizar. El purificado es por medio de una cristalización con carbón activado usando como disolvente metanol y una vez obtenido el producto puro se dejó secar por 5 días. Con un rendimiento de 40% y un punto de fusión 210°C-212°C.

3.3.1.4 N,N-bis(bencimidazol-2-il-etil)etilendiamina [L₄]

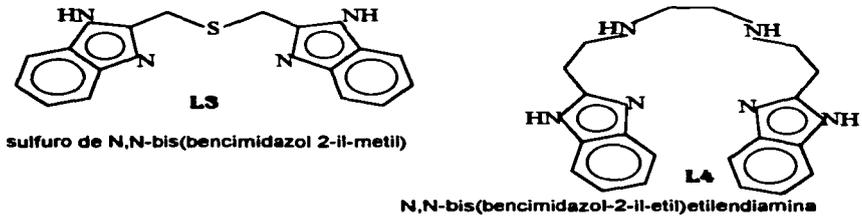
N,N-bis(β-carba-il-etil) etilendiamina: este compuesto se preparó como se ha reportado (Chao y Chung, 1981). Acrilamida (7.1 g , 100 mM) se disolvió en acetonitrilo (75 mL) y posteriormente se adicionó etilendiamina (3.0 g , 50 mM). Esta mezcla se puso a reflujo en un baño de maría por dos horas y después se dejó enfriar durante dos horas a 180°C. Se dejó enfriar para luego filtrar, lo que queda en el papel filtro se disuelve con hidróxido de sodio (30mL) y se calienta por cinco horas a una temperatura 60°C. Se dejó enfriar y se agrega 5mL de ácido clorhídrico concentrado y se guarda en un ambiente frío.

Nuevamente se pone a reflujo por 34 horas a temperatura de 60°C con fenildiamina (10.8 g) y ácido clorhídrico 5.5N (30mL). Finalmente se siguió el mismo procedimiento de eliminación de sustancias alcalinas y de filtración que en el L₁; el viraje de color fue de beige a blanco que se dejó secar por 15 días. La N,N-bis(β-carba-il-etil) etilendiamina (Chao y Chung, 1981) (10.1 g, 50 mM) fue hidrolizado con hidróxido de sodio (5 g, 125 mM) en agua y se colocó a reflujo durante cuatro horas. El *alcali* en exceso se neutralizó con ácido clorhídrico. La solución resultante se volvió a colocar a reflujo con 1,2-diaminobenceno (10.8 g, 100 mM) en ácido clorhídrico 6N. El producto separado se neutralizó con hidróxido de amonio frío y se recrystalizó en metanol con un rendimiento del 70%, punto de fusión 66-67°C; Espectro de Masas: (m/e) 205(65%), 175(21%), 174(88%), 146(11%), 144(100%), 143(45%), 133(51%), 132(76%), 131(24%), 188(31%), 92(12%), 91(17%), 90(23%), 77(13%), 73(16%), 64(44%); 63(50%), 62(14%), 56(12%), 52(30%), 51(17%), 44(78%), 43(28%), 42(34%); 41(15%) 40(19%); Resonancia Magnética Nuclear (DMSO-d₆):

2.84(s, 4H-CH₂-CH₂-N-), 3.18(s, 8H, -CH₂-CH₂ BzIm), 7.12-7.22 (m, 4H, J=3.1, BzIm-5,6), 7.49-7.60 (m, 4H, J=3.1, BzIm-4,7); UV: 281(7900), 274(8500), 244(7500), 212(16900). Se realizó el análisis elemental para C₂₀H₂₄N₂: C, 68.2%; H, 7.36%; N, 24.2%. (Esquema 2).



Esquema 1



Esquema 2

3.3.2 Síntesis de los complejos con en ion metálico Ni(II)

3.3.2.1 Ni(II)(L₁)Cl₂ · 2H₂O

Para la síntesis del ligando L₁ (0.322 g, 1mmol) se disolvió en metanol (10 mL) y esta solución se le agregó una solución de NiCl₂·6H₂O (0.0119 g, 0.5 mmol) en metanol (5mL). Se obtuvo el complejo en forma de cristales a manera laminar de color lila y se secó con pequeñas cantidades de decaóxido de fosforo (P₄O₁₀) al vacío.

3.3.2.2 Ni(II)(L₂)Cl₂ · 2H₂O

El ligando L₂ (0.350 g, 1mmol) se disolvió en metanol (10mL) y se le adicionó a continuación una solución de NiCl₂ · 6H₂O (0.0119 g, 0.5 mmol) en metanol (5mL). El complejo se obtuvo a manera de polvo de color verde azulado y se secó con P₄O₁₀ al vacío.

3.3.2.3 Ni(II)(L₃)Cl₂ · 2H₂O

Al ligando L₃ (0.147 g, 0.5 mmol) se disolvió en metanol (10mL) y se le añadió una solución de NiCl₂ · 6H₂O (0.0119 g, 0.5 mmol) en metanol (5mL). El complejo que se obtuvo fue a manera de cristales medianos de color morado y se seco con P₄O₁₀ al vacío.

3.3.2.4 Ni(II)(L₄)Cl₂ · 2H₂O

Por último el ligando L₄ (0.174 g, 0.5 mmol) se disolvió en metanol (10mL) añadiéndosele posteriormente una solución de NiCl₂·6H₂O (0.0119 g, 0.5 mmol) en metanol (5mL). El complejo que se obtuvo fue a manera de cristales de color azul que se secaron con P₄O₁₀ al vacío.

3.3.3 Reacción de los compuestos de Ni(II) con CoM.

Los compuestos de níquel (0.1mmol) se adherieron al ácido sulfónico 2-mercaptoetano (0.1mmol). Los cambios de color se observaron en el espectro electrónico de UV-Vis durante la adición de CoM a las soluciones de níquel; así como el registro del potencial redox medidos con la solución de coenzima-níquel (II).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los complejos Ni(II) de L₁, L₂ y L₃ son sistemas tridentados; Ni(II)N₂S, la cuarta coordinación quizás se debe al solvente o a los aniones de cloro. El complejo Ni(II) de L₄ es un Ni(II)N₄. Dicho estudio fue llevado a cabo mas allá de todos los compuestos modelo del Ni(II), y los resultados de los sistemas tridentados fueron comparados con un sistema planar.

4.1 Espectro infrarrojo

Todos los complejos de Ni(II) mostraron bandas amplias que se observaron alrededor de 3300cm⁻¹. Este resultado muestra que los compuestos son aptos para una buena coordinación.

4.2 Espectro electrónico

La reflexión espectral de los compuestos de níquel(II) extiende una banda amplia en la región visible. La disolución en metanol, se observa una banda separada relativamente clara, lo cual indica la probabilidad de envolver el solvente en la esfera de coordinación. Los datos del espectro y las señales de las bandas se presentan en la Tabla 4.1. Las bandas de la región visible son asimétricas, esto señala la presencia de mas de una transición ya que los señalamientos de la posición de las bandas son ³A_{2g}-³T_{1g}(F) (14.0-18.0kK). A partir de entonces las bandas visibles fueron amplias, esto quizás se debe a que estan acompañadas por la transición de ³A_{2g}-³T_{2g}, y ³A_{2g}-³T_{1g}(P), en donde se siguió por la transición del spin del sistema níquel(II) d8.

Tabla 4.1 Datos de absorción electrónica del Espectro de UV-Vis (ν max/cm⁻¹ con ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ en paréntesis)

Compuesto	Medio	Campo ligando ^a	Transferencia de carga ^a
Ni(II)L ₁ Cl ₂ •2H ₂ O	Sólido	16.30	25.10
	MeOH	15.50 (120)	24.64 (341)
Ni(II)L ₂ Cl ₂ •2H ₂ O	Sólido	16.15	25.80
	MeOH	15.50 (360)	25.35 (389)
Ni(II)L ₃ Cl ₂ •2H ₂ O	Sólido	15.75	25.65
	MeOH	14.95 (100)	25.00 (100)
Ni(II)L ₄ Cl ₂ •2H ₂ O	Sólido	17.40	27.40
	MeOH	16.65 (75)	27.03 (200)
Ni(II)L ₁ Cl ₂ +CoM	MeOH	14.95 (670)	25.00 (200)
Ni(II)L ₂ Cl ₂ +CoM	MeOH	14.00 (460)	26.10 (208)
Ni(II)L ₃ Cl ₂ +CoM	MeOH	13.91 (479)	24.70 (112)
Ni(II)L ₄ Cl ₂ +CoM	MeOH	16.47 (93)	26.44 (207)

^a concentración $\approx 5 \times 10^{-2}$

³A_{2g} → ³T_{1g}(F) (14.0 - 18.0 kK)

Los datos que se presentan en paréntesis nos indican cuanta intensidad de absorción presente en cada uno de nuestros compuestos, tanto en campo ligando como en la transferencia de carga.

Las bandas de transferencia de carga (S→Ni²⁺) fueron de valores altos en ϵ , en comparación con (N→Ni²⁺), explicando así la interacción parcial del orbital- π del ligando con el ion níquel. La posición de la banda Ni(II)L₂Cl₂•H₂O fue trasladada a una región de energía baja en comparación con Ni(II)L₁Cl₂•H₂O, esto es apto para el impedimento estérico de los grupos metilo en la posición 5,6 del anillo del bencimidazol. Sin embargo, la transferencia al azul fue observada en el complejo Ni(II)L₄Cl₂•H₂O, porque se presentó una interacción planar del níquel(II) con el orbital- σ del ligando nitrógeno. Generalmente, la transferencia del rojo se observa en el espectro electrónico donde la CoM se adhirió a los compuestos de níquel(II), ilustrando que la coordinación de la CoM hacia los compuestos Ni(II) conduce hacia una simetría baja en la estructura Ni(II) (Fig. 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4).

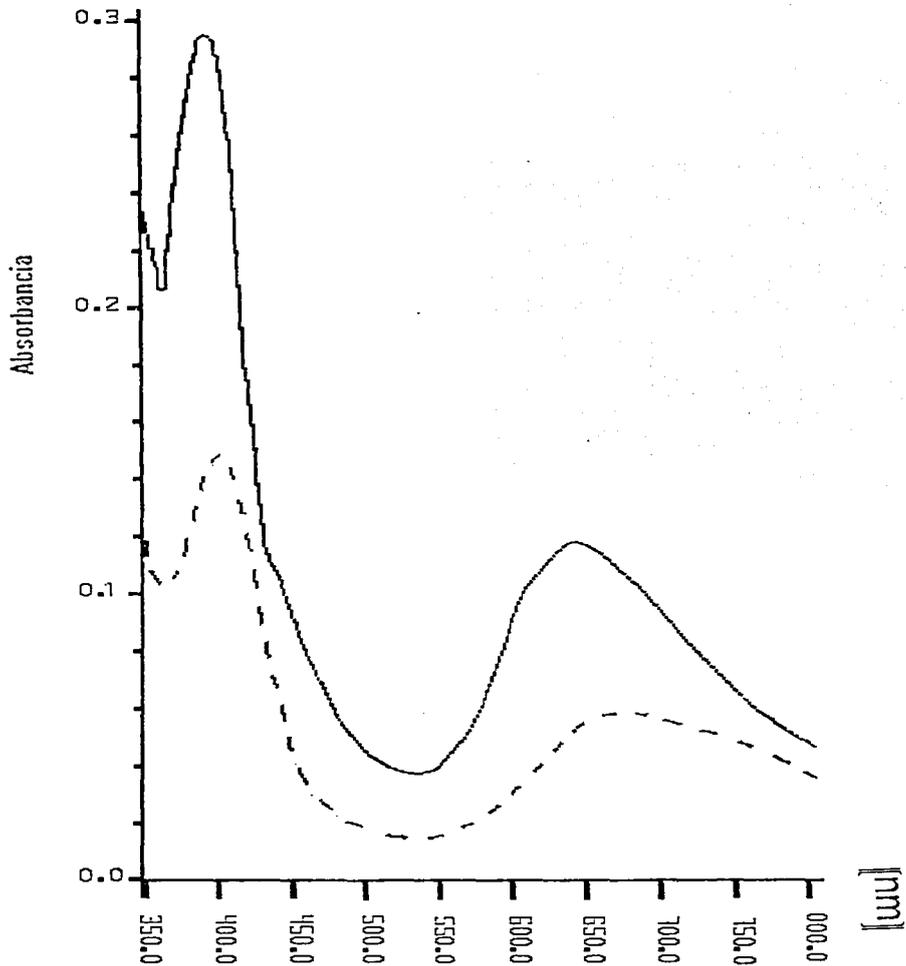


Fig. 4.1 Espectro electrónico de UV-Vis del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_1)$ (—) y con CoM (---) en metanol.

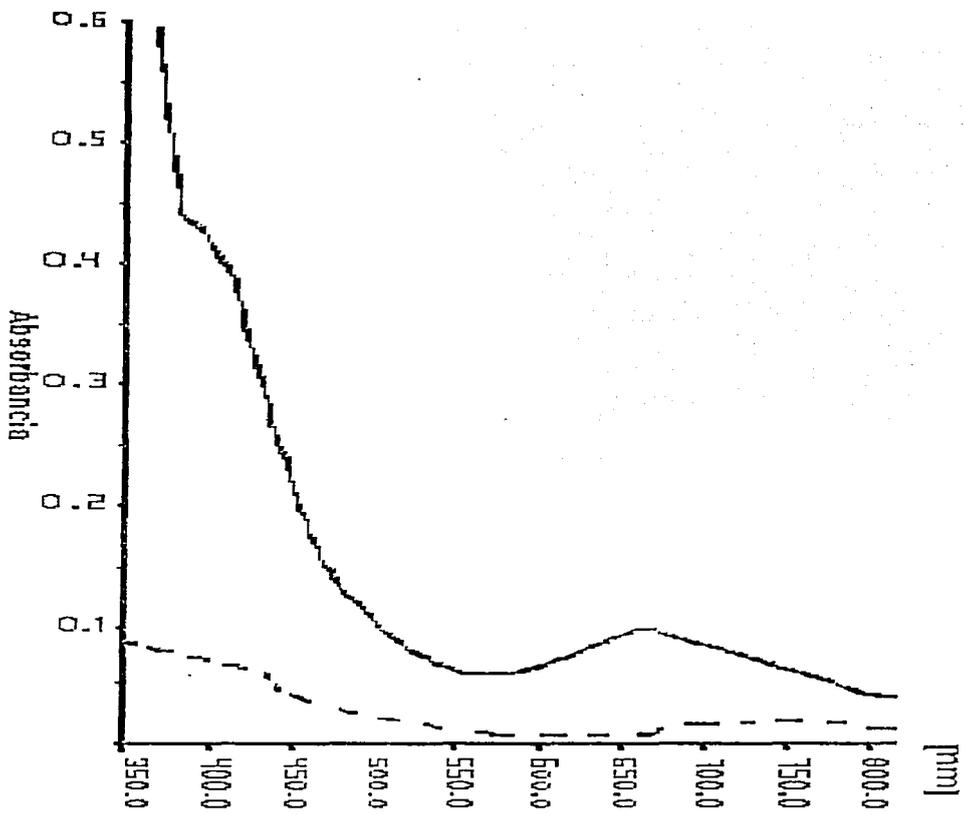


Fig. 4.2 Espectro electrónico de UV-Vis del compuesto Ni(II)Cl₂(L₂) (—) y con CoM (- - -) en metanol.

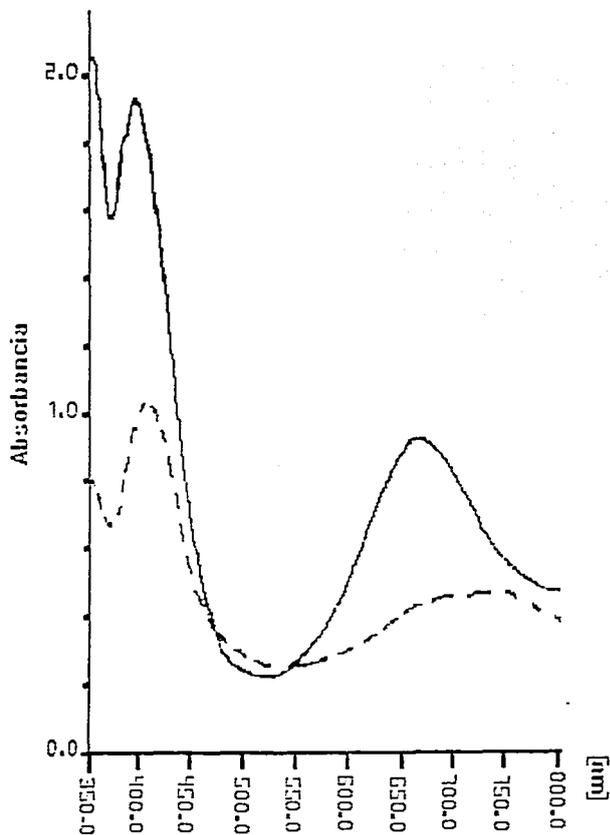


Fig. 4.3 Espectro electrónico de UV-Vis del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_3)$ (—) y con CoM (- - -) en metanol.

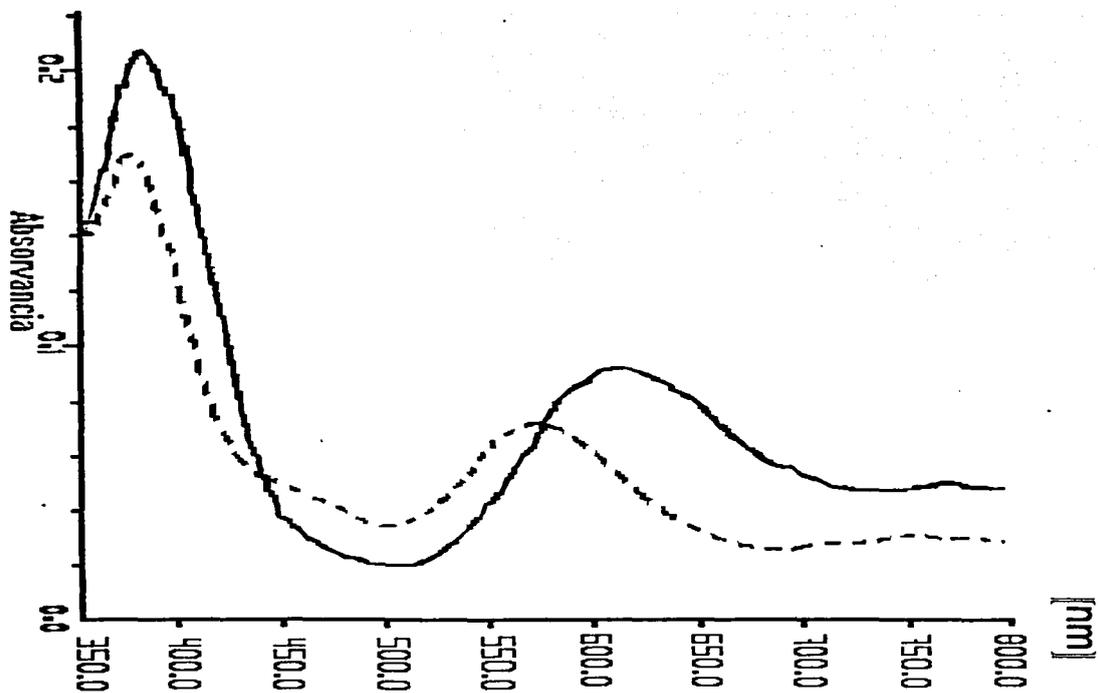


Fig. 4.4 Espectro electrónico de UV-Vis del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_4)$ (--) y con CoM (- - -) en metanol.

4.3 Propiedades electroquímicas

Se estudio la conducta redox usando el voltamperímetro cíclico de los complejos de Ni(II) presente, con un electrodo estacionario de platino. Los experimentos electroquímicos se hicieron en ausencia de metanol, usando como el electrolito soporte perclorato de tetrabutil-amonio. Los complejos de Ni(II) exhiben una cuasi-reversibilidad en la conducta redox de Ni(I)/Ni(II). Dicho compuesto no se comporto como la ecuación de Nernst pero, quizás, si es funcional para las cinéticas de transferencia de electrones heterogéneos al igual que para una reacción química acoplada. La más reciente evidencia de la transferencia catódica del pico de reducción y la transferencia anódica de la onda de oxidación manifestaron un incremento en la velocidad de medición.

Los datos electroquímicos Tabla 4.2 muestran un ligando de tipo tripodal contenido en los compuestos Ni(II), que son producidos por la actividad redox irreversible en los estudios de voltamperimetria cíclica. Al adicionar la CoM a los compuestos de níquel, se eleva la reversibilidad de las actividades redox. Se observó una separación en los picos catódicos y anódicos en los compuestos de Ni(II) del L₁, L₂ y L₃, aunque solamente un pico (catódico) se detectó en el compuesto Ni(II)L₄Cl₂. El tiempo consumido en los cambios geométricos de los compuestos Ni(II) ocurren durante los procesos de oxidación o reducción, así estos picos anódicos correspondientes fuerón trasladados a potenciales mas positivos. Los procesos de oxidación y reducción de los compuestos Ni(II) fueron mas retardados en tiempo, por lo que se estimuló el rearreglo estructural con el uso de un solvente o bien soportado con un anión de la estructura. La adición de la CoM a NiL_x (x = 1, 2, 3, y 4) generalmente se elevó en ambos potenciales redox generalmente se elevarón, asi como los compuestos de Ni(II). Por ejemplo al adicionar CoM con Ni(II)L₁Cl₂ se tuvo una translación de un potencial -0.698 V a -0.180 V.

Tabla 4.2 Datos electroquímicos obtenidos de los cuatro complejos de Ni(II) puros y con sustrato CoM a 25°C en el voltamperímetro.

Complejo	Actividad redox	E ^{1/2} (V)	Reversibilidad ΔEp(V)
Ni(II)L ₁ Cl ₂ + H ₂ O	-0.698 ^c -0.089 ^a		-
Ni(II)L ₂ Cl ₂ + H ₂ O	-0.660 ^c -0.088 ^a		-
Ni(II)L ₃ Cl ₂ + H ₂ O	-0.689 ^c -0.019 ^a		-
Ni(II)L ₄ Cl ₂ + H ₂ O	-0.090 ^a		-
Ni(II)L ₁ Cl ₂ + CoM	-0.180 ^c , -0.165 ^b -0.150 ^a		-0.058
Ni(II)L ₂ Cl ₂ + CoM	-0.205 ^c , -0.183 ^b -0.161 ^a		-0.045
Ni(II)L ₃ Cl ₂ + CoM	-0.180 ^c , -0.174 ^b -0.167 ^a		-0.013
Ni(II)L ₄ Cl ₂ + CoM	-0.220 ^c , -0.200 ^b -0.180 ^a		-0.040

^a potencial anodico, ^b potenciales redox, ^c potenciales catódicos

Medidas vs electrodo de referencia de plata no acuoso; add 544 mV conversión dentro de lo normal, electrodo de hidrógeno (NHE); velocidad 50 mVs⁻¹, electrolito soporte perclorato de tetrabutilamonio (0.1 M). Concentración del complejo 0.5 X 10⁻⁴ mM.

Por lo tanto, dichos resultados electroquímicos comprueban que se presentó un buen ajuste con los datos de espectro electrónico al ser adicionada la CoM a los compuestos de níquel, lo cual indica la poca energía del campo ligando en el espectro electrónico, facilitando la transición del electrón dentro de los orbitales d-d del ion Ni(II). Al mismo tiempo se tuvieron potenciales redox de los complejos de Ni(II) hacia potenciales mas positivos. Esto es evidente en las actividades de las cargas de reversibilidad de actividades irreversibles a cuasi-reversibles al ser adicionada la CoM a los compuestos de Ni(II), mostrando lo fuerte que es el rearrreglo geométrico que ocurre durante la reducción u oxidación de los compuestos Ni(II). Los resultados del espectro electrónico y del voltamperímetro cíclico nos ilustran mejores posibilidades de producir metano en la reacción metil-CoM con los ligandos del tipo tripodal en condiciones anaerobias.

Los complejos de Ni(II) tienen mayor potencial redox negativo en $E^{1/2}$, es decir, el ion metálico níquel(II) al presentar potenciales redox altos [Ni(II)/Ni(I)] dado por el mismo níquel pueden llevarse a cabo dentro y fuera de los sistemas biológicos, la biotransformación de los compuestos orgánicos presentes en el medio donde habitan las bacterias metanogénicas así como la producción del metano. Esto confirma que el níquel, en los procesos biológicos, tiene que estar forzosamente en un estado de oxidación específico (+2), porque este estado es el único en el que se pueden cumplir los requisitos estructurales y funcionales de aquellos organismos que requieren la presencia de ion(es) metal(icos). Respecto a los datos de $\Delta E_p(v)$, estos muestran la reversibilidad de cada uno de los compuestos; esto quiere decir que mientras mas pequeño sea el valor de $\Delta E_p(v)$ mayor será la reversibilidad del compuesto, ya que las distancias que hay entre el pico catódico y el pico anódico deben de ser muy cortas.

Las interpretaciones gráficas las observaremos en la velocidad de barrido de 40mV/seg en las Figuras 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8.

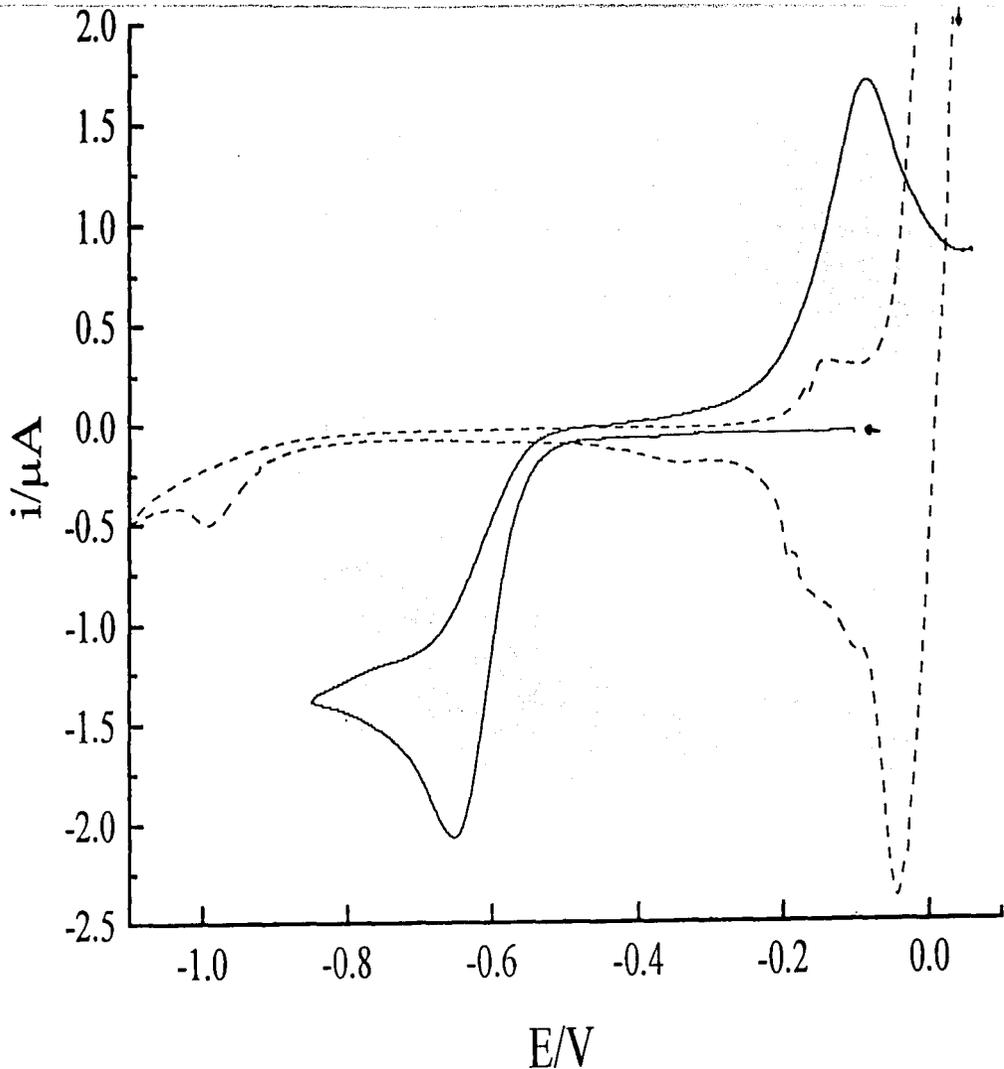


Fig. 4.5 Demostración de la actividad redox del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_1)$ (—) y con CoM (---) en metanol.

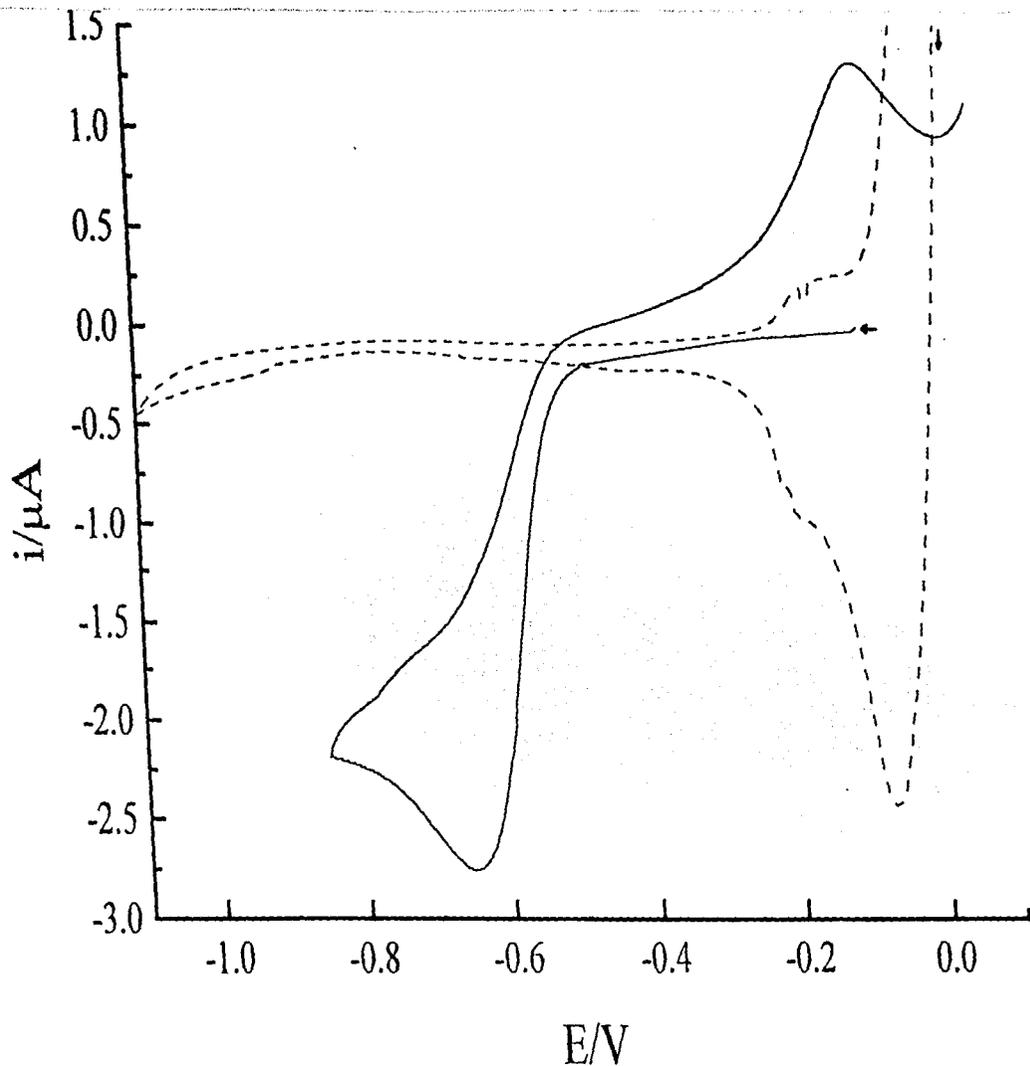


Fig. 4.6 Demostración de la actividad redox del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_2)$ (—) y con CoM (---) en metanol.

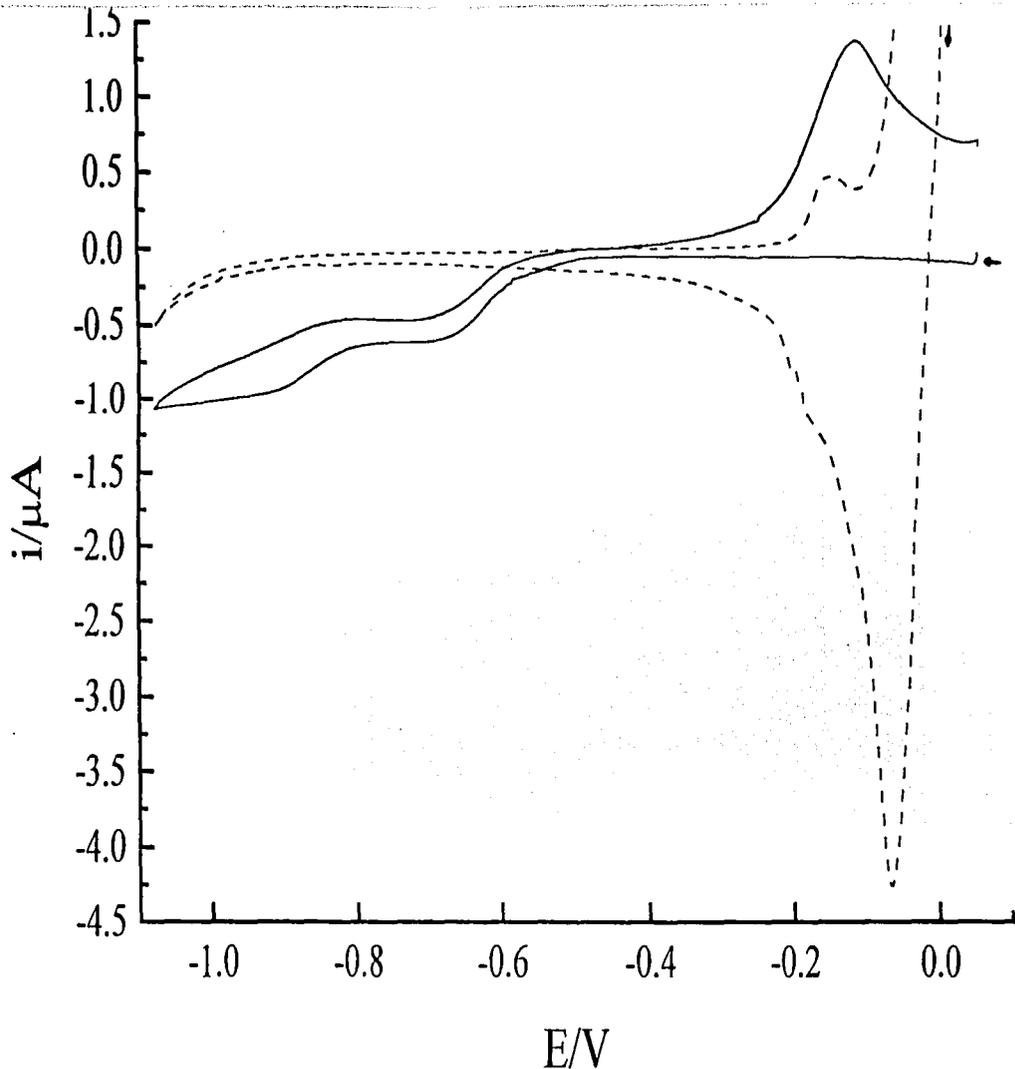


Fig. 4.7 Demostración de la actividad redox del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_3)$ (—) y con CoM (---) en metanol.

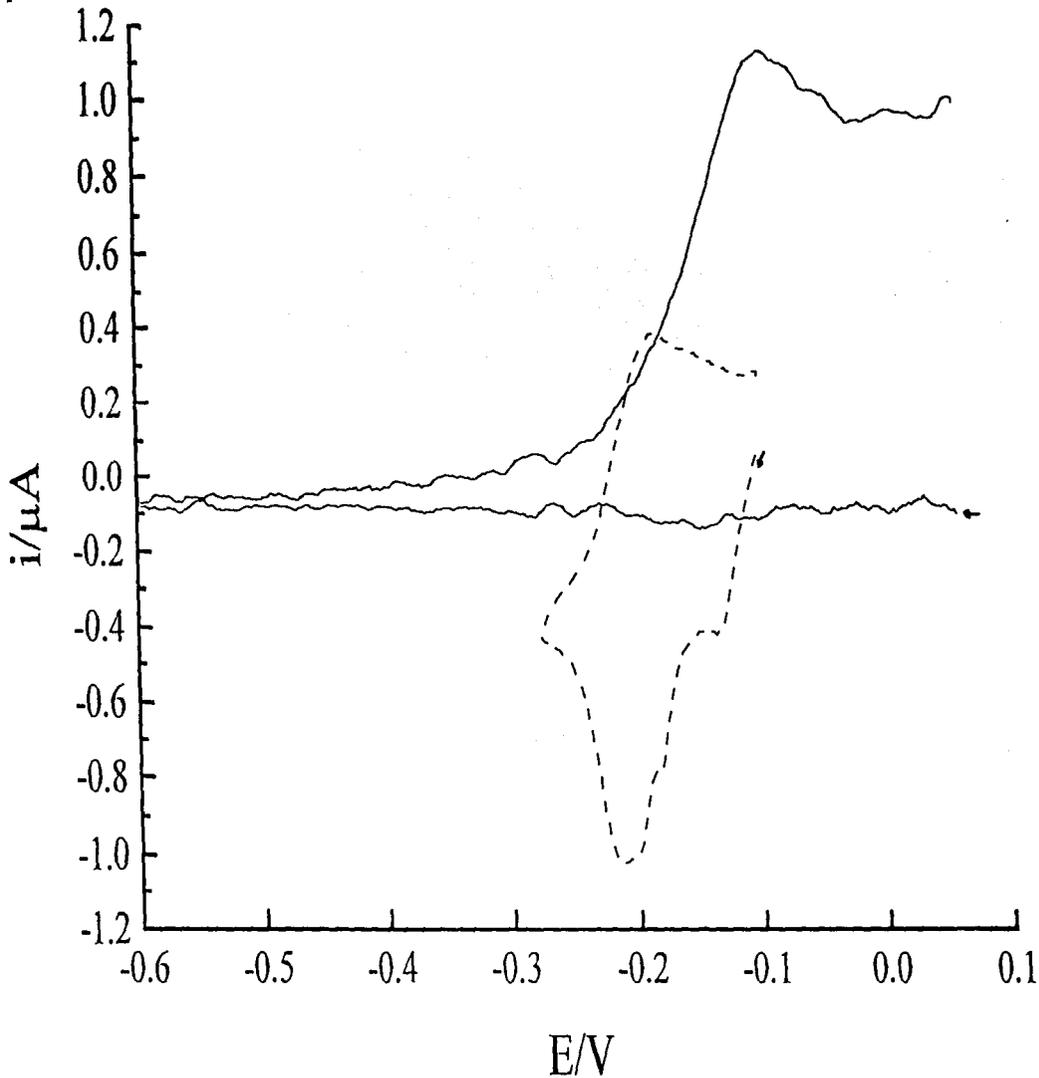


Fig. 4.8 Demostración de la actividad redox del compuesto $\text{Ni(II)Cl}_2(\text{L}_4)$ (-) y con CoM (- - -) en metanol.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de cuatro compuestos con Ni(II) los cuales sirvieron como compuestos modelo, y se estudiaron en espectros electrónicos y también se midieron sus potenciales redox con un voltamperímetro cíclico.

Los espectros electrónicos de los compuestos sintetizados con Ni(II) muestran que existen dos transiciones:

- La transición del campo ligando del orbital ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}$ (F) se observa en región del visible.
- La transferencia de carga a níquel corresponde a el N y/o al S que se observan en la región entre 24.50-27.40 kK .

El desplazamiento al rojo en los espectros electrónicos muestra que al adicionar la CoM a los cuatro complejos de Ni(II) provocó una disminución en la simetría de su estructura.

La adición de la CoM a los compuestos de Ni(II) los condujo a un potencial positivo cuando en comparación con compuestos ligando sin Ni(II).

Así mismo al adicionarse la CoM a los complejos NiL_x (x = 1, 2, 3 y 4) generalmente elevaron los potenciales redox y aumento la reversibilidad de los compuestos Ni(II).

Como se muestra en los resultados del espectro electrónico se obtuvo una buena aprobación de los datos al ser adicionada la CoM en los complejos de Ni(II) ya que se obtuvo poca energía en el campo ligando.

Mientras que en los resultados electroquímicos se obtuvo una clara información de los procesos de reducción y oxidación en los complejos sin Ni(II) y con CoM.

La clara evidencia en la reversibilidad de la actividad mostro una irreversibilidad y una cuasi-reversibilidad cuando se le adiciona la CoM a los compuestos de níquel divalente.

Tanto los resultados del espectro electrónico como los del voltamperímetro cíclico ilustran las mejores posibilidades que se pueden tener para la producción del metano de la reacción metil-CoM con el ligando tipo tripodal en condiciones anaerobias.

Bibliografía

- Addison, A.W. y P.J. Burke. 1981. *J. Heterocyclic Chem.* 18, 803-806.
- Anh, Y., Krzycki, J.A. y H.G. Floss. 1991. Steric course of the reduction of ethyl coenzyme M to ethane catalyzed by methyl coenzyme M reductase from *Methanosarcina barkeri*. *J. Am. Chem. Soc.* 113:4700-4701.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., y R.S. Wolfe. 1979. Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. *Microbiol. Rev.* 43, 2: 260-296.
- Balch, A.L., Olmstead, M.M., y S.L. Phillips. 1993. Identification of Isomeric meso-Dioxo Derivates of Octaethylporphyrin and Separation and Structural Characterization of the Nickel(II) Complexes. *Inorg. Chem.* 32: 3931-3936.
- Bakac, A. y H.J. Espenson. 1986. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5353-5357.
- Bard, A.J. y L.R. Faulkner. 1990. **Electrochemical methods: fundamental applications.** Wiley, New York, pp. 218.
- Berkessel, A. 1991. Methyl-coenzyme M reductase: model studies on pentadentate nickel complexes and a hypothetical mechanism. *Bioorg. Chem.* 19:101-115.
- Beveridge, T.J. 1989. **Metal ions and Bacteria.** John Wiley & Sons, USA pp194.
- Bohinsk, R.C. 1991. **Bioquímica** Addison-Wesley Iberoamericana. 5ta,Ed. USA
- Cervantes, C. 1996. Mecanismos Bacterianos de Resistencia a Iones Metálicos. *Memorias del Coloquio de Química Bioinorgánica.* BUAP, Puebla, México.17-27.
- Chao, M-S. y C-S, Chung. 1981. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 683-687.
- Cotton, F. A. y G. Wilkinson. 1972. **Advanced Inorganic Chemistry**, 2ed. Intercience. New York, USA. pp182.
- Dagdighian, J.V. y C.A. Reed. 1979. *Inorg. Chem.* 18, 2623-2627.
- De la Parra, M.E. y F. Arias. 1976. Síntesis, caracterización y determinación de la capacidad catalítica de los compuestos fosfínicos de níquel. *Tesis Profesional.* Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Deeth, R.J. y C.M. Kemp. 1992. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2013-2017.

- Diekert, G., Konheiser, U., Piechulla, K., y R.K. Thauer. 1981. Nickel requirement and factor F₄₃₀ content of methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 148, 2: 459-464.
- Drain, M., Sable, D.B., y B.B. Corden. 1988. Ni(II)(dioxo[16]aneN5)-Induced methane formation from methyl Coenzyme M. *Inorg.Chem.* 27: 2396-2398.
- Eidsness, M.K., R.J. Sullivan, J.R. Schwartz, P.L. Hartzell, R.S. Wolfe, A.M. Flank, S.P. Cramer y R.A. Scott. 1986. Structural diversity of F₄₃₀ from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Am. Chem. Soc.* 108:3120-3121.
- Ellefson, W.L., Whitman, W.B. y R.K. Wolfe. 1982. Nickel-containing factor F₄₃₀: chromophore of the methylreductase of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry.* 79: 3707-3710.
- Ellermann, J., Hederich, R., Böcher, R. Thauer, R.K. 1990 Two genetically distinct methyl-coenzyme reductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Strain Marburg and ΔH. *Eur. J. Biochem.* 192,669-672.
- Fassler, A., Pfaltz, A., Krautler, B., y A. Eschenmorer. 1984. Chemistry of corphinoids system of a nickel (II) complex containing the chromophore F₄₃₀. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1365-1367.
- Ferry, J. 1993. **Methanogenesis**. Chapman & Hall. New York, USA. Cap.XI. Funtion of methanogenic bacteria. pp128.
- Gunsalus, P.R., Romesser, J.A., y R.S. Wolfe. 1978. Preparation of coenzyme M analogues and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Am. Chem. Soc.* 17,12: 371-375.
- Hausinger, R.P., Orme-Johnson, W.H., y C. Walch. 1984. Nickel tetrapirrol cofactor F₄₃₀: compararison of the forms bound to methyl coenzyme M reductase and protein free in cell of *Mathanobacterium thermoautotrophicum* pH. *Biochemistry.* 23: 801-804.
- Hausinger, R.P. 1987. Nickel utilization by microorganisms. *Microbiol. Rev.* 51,1: 22-42.
- Jimenez, S.O. 1992. Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de coordinación de rodio (III) con un ligante macrocíclico pentadentado. *Tesis Profesional*. Facultad de Química, UNAM, México,D.F.
- Jaun, B., Pfaltz, A. 1986. Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: reversible one-electron reduction of F₄₃₀ pentamethyl ester to the nickel(I) form. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1327-1329.

- Jaun, B. 1990. Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: oxidation of F₄₃₀ pentamethyl ester to the Ni(III) form. *Helv. Chim. Acta.* 73:2209-2217.
- Jaun, B. 1993. Methane formation by methanogenic bacteria: Redox chemistry of coenzyme F₄₃₀. pp.287-337. In *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 29, Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives*, H Siegel y A. Siegel(eds.), Marcel Dekker, New York.
- Jaun, B. y A. Pfaltz. 1988. Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: methane formation by reductive carbon-sulphur bond cleavage of methyl sulphonium ions catalysed by F₄₃₀ pentamethyl ester. *J Chem. Soc., Chem. Commun.* 293-294.
- Lin, S. K. y B. Jaun. 1991. Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: detection of a paramagnetic methylnickel(II) derivative of the pentamethyl ester by ²H-NMR spectroscopy. *Helv. Chim. Acta.* 74:1725-1738.
- López, A., Espinosa, A., Noyola, A. y K. Ilangovan. 1993. Limite de biodegradación de ácidos grasos volátiles por un lodo anaerobio. *Rev. Soc. Mex. Biotecnol. Bioing.* 3(3-4) : AM90-AM98.
- Mahan, B. M. y R. J. Myers. 1990. *Química Curso Universitario.* 4a.Ed. Addison-Wesley. Iberoamericana. pp716-739
- Martin, E. M., and R. D. Bereman. 1988. Synthesis and characterization of square planar and pseudo-tetrahedral M(II) N₂S₂. *Inorg. Chem. Acta.* 188: 221-231.
- Masuda, H., Sugimori, T., Kohzuma, T., Odani, A. y O. Yamauchi. 1992. Copper(II)-thioether boundings in multidentate N,S-donor ligand complexes. structural dependence of the chemical properties of the copper(II) complexes of 1,5-Bis(2-pyridylmethylamino)-3-thiapentane and 2,6-Bis(2,6-dithiaheptyl)pyridine. *Chem. Soc. of Japan.* 65,3. 786-793.
- Miyamae, H., Yamauchi, K., y M. Yamashita. 1991. Co-ordination of 1,4,7,10-tetraazaciclotridecane ([13]aneN₄) to nickel (III). Crystal structure of [Ni ([13]aneN₄)Br₂]Br. *Chem. Soc. Dalton Trans.* 2921-2923.
- Moreno, E. R. 1981. Estudios de la Interacción entre la concavalina-A e iones metálicos. *Tesis Profesional.* Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Nair, S. M., Arasu, P. T., Pillai, M. S., y C. Natarajan. 1995. Mixed-ligand complexes of nickel(II) involving sulphur-containing ligands and diaminocarboxylic acids. *Transition Met. Chem.*, 20:132-135.
- Pandiyar, T., Palaniandavar, M., Lakshminarayannan, M., y H. Manohar. 1992. Structure, spectra and redox behaviour of copper(II) complexes of

- Bis(benzimidazolyl)diamine ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3377-3383.
- Pandiyan, T., Durán de Bazúa, C., y M. Soriano-García. 1996. Synthesis, structure, spectra and redox activities of model compounds for methanogenic bacteria. *J. Anal. Chem.* 354: 636-640.
- Philips, M. A. 1928. *J. Chem.* 2393.
- Rospert, S., Brocher, R., Albacht, S.P.J., y R.K. Thauer. 1991. Methyl-coenzyme M reductase preparations with high specific activity from *H₂-preincubated of Mhetanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS Lett.* 291,2:371-375.
- Sabater, G.B., Nicolas, G.A., y L. Fuentes. 1985. *Diccionario de Química*. Ed. Generales Anaya, S.A. Madrid, España. pp 1-345.
- Sacconi, L., y F. Mani. 1987. **Comprehensive coordination chemistry. The synthesis, reactions, properties & applications of coordination compounds**. Vol. 5 Pergamon Press. Great Britain. pp 2-301.
- Silverstein, M., y G. C. Bassler. 1980. **Identificación Espectrométrica de Compuestos Orgánicos.**, Ed. Diana, 1a edición, México, D.F., México, pp 85-86,171.
- Sivagnanam, U., Pandiyan, T., y M. Palaniandavar. 1993. Synthesis of certain multidentate benzimidazole-derived ligands. *Indian J. Chem.* 32: 572-576.
- Skoog, D. A. y J. J. Leary. 1993. **Análisis Instrumental**. 4ta. de. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Soriano, G. M. 1994. Bioestructura perspectivas de investigación en México. *Ciencia y Desarrollo, Conacyt.* XX,119:34-42.
- Soriano, G-M., Pandiyan, T. y C. Durán de Bazúa. 1995. [N',N'-Bis(benzimidazol-2-ylethyl)-1,2,-ethanediamine](nitrate-0,0')nickel(II). *Acta Cryst.* C51:1107-1109.
- Solomons, T.W.G. 1988. **Química Orgánica**. Ed. Limusa, México, D.F., México, pp 531-534.
- Speece, R.E. 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environm. Sci. Technol.* 17: 416A-427A.
- Stranger, R., Wallis, S.C., Gahan, L.R., Kennard, C.H.L. y K.A. Byriel. 1992. Spectroscopic and ligand-field analysis of the spin-orbit interaction between

the 1E_g y $^3T_{2g}$ states in Bis(1,4,7-triazacyclononane)nickel(II). *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* 2971-2976.

Thauer, R. K., Diekert, G., y P. Schönheit. 1980. Biological role of nickel. *TIBS.* 304-306.

Walsh, C.T., y W. H. Orme-Jonhson. 1987. *Biochemistry.* 26, 4901.

Well. 1962. **Structural Inorganic Chemistry.** 3th Ed. Oxford and The Clarendon Press.

Zehnder, T. J. 1988. **Biology of Anaerobic Microorganism.** Ed. Wiley-Liss. USA. pp1-872.