



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

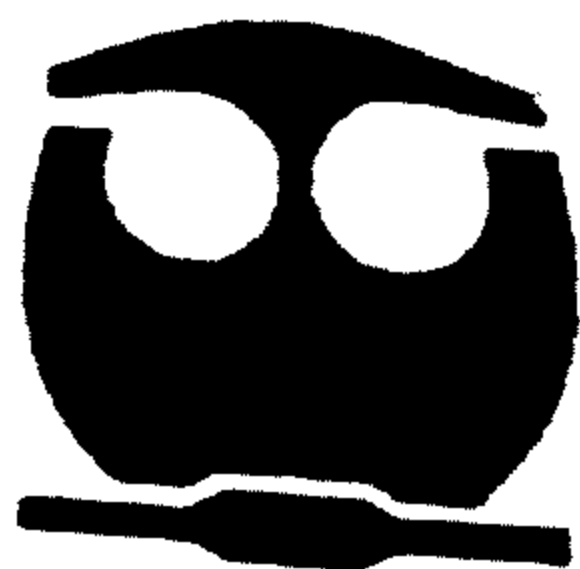
FACULTAD DE QUÍMICA

ESTRUCTURA Y REACTIVIDAD DEL COMPLEJO
DINUCLEAR DE Cu (II) CON UN LIGANTE
DERIVADO DE IMIDAZOL Y PIRIDINA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA
PRESENTA:
LUCERO GONZÁLEZ SEBASTIÁN



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



MÉXICO, D.F.

2005

m351944



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

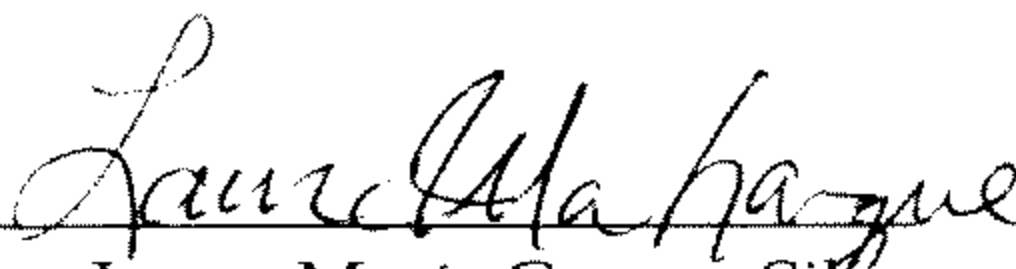
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

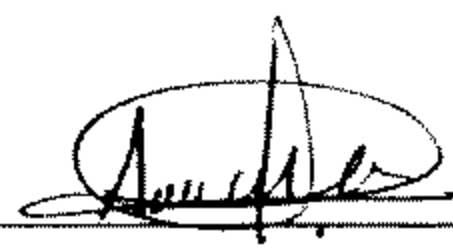
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Hugo Torrens Miquel
Vocal	Prof. José Manuel Méndez Stivalet
Secretario	Prof. Laura María Gasque Silva
1er Suplente	Prof. Silvia Elena Castillo Blum
2º Suplente	Prof. Edgar Enrique Mijangos Aranda

Sitio donde se desarrolló el tema:
Lab. 216, Departamento de Química Inorgánica,
División de Estudios de Posgrado.
Facultad de Química, UNAM.


Dra. Laura María Gasque Silva
Asesora


Edgar Enrique Mijangos Aranda
Supervisor Técnico


Lucero González Sebastián
Sustentante

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Lucero González Sebastián
FECHA: 23-Abriem bre - 2005
FIRMA: [Handwritten Signature]

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Gasque, por ser una excelente académica, y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Muchas gracias por todo.

A todos mis compañeros del laboratorio 216 de posgrado, Edgar, Ana, Ingrid y por supuesto a la doctora Laura, por compartir muchos momentos de risa, de chetos y de coca colas.

A mi supervisor técnico Edgar Mijangos, por dedicar gran parte de su tiempo en la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Victor Ugalde por su asesoría.

Al Dr. Luis Ortiz Frade, por su apoyo y asesoría.

A la unidad de servicios y apoyo a la investigación (USAI) por realizar los análisis espectroscópicos.

Al jurado del presente trabajo por sus valiosos comentarios.

Al programa PAPIIT (programa de apoyo a los proyectos de investigación e innovación tecnológica), por el apoyo económico para realizar este proyecto de investigación.

Al proyecto de DGAPA IN106003, por el apoyo económico recibido durante la realización de esta tesis.

Y por supuesto a la máxima casa de estudios, UNAM, por ser mi segundo hogar, y brindarme la oportunidad de ser una profesionista.

DEDICATORIAS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres por darme la vida, y a toda mi familia por todo su apoyo y amor.

A mis mejores amigas: mi hermana Mónica y mi mamá.

A mis mejores amigos (as) de la universidad, Edgar, Ingrid, Eduardo.

A mi otra mejor amiga Lulú, por estar siempre conmigo.

A Fany y Juan por todo su apoyo y comprensión, definitivamente gran parte de todo este logro se los debo a ustedes. Muchas gracias.

A una persona muy especial para mí, Edgar, por ser mi asesor, amigo y muchas otras cosas, te quiero mucho, te agradezco infinitamente todo lo que haces por mi.

A todos mis compañeros de la carrera de química, Paulina, Soledad, Juan, Jacob, Ingrid, Lalo, las Marianas, Carolina y a todos mis compañeros de la división de Posgrado.

A la Facultad de Química de la UNAM, por estos cinco años de invertir en mi educación profesional.

Índice

Abreviaturas y símbolos	i
Índice	1
Introducción	4
1.- Antecedentes	6
1.1 Química de coordinación del cobre	6
1.2 Cobre en los sistemas biológicos	7
1.3 Clasificación de las enzimas de cobre	8
1.4 Enzimas de cobre que catalizan reacciones de oxidación	10
1.5 Sistemas modelo de los sitios activos de las enzimas de cobre	14
1.6 Reacción de Mannich en imidazoles	16
1.7 Ligantes derivados de imidazol y sus complejos Cu ₂ L	19
1.7.1 Ligantes	19
1.7.2 Complejos con ligantes abiertos	22
1.7.3 Complejos con ligantes cerrados	24
2.- Objetivos	28
3.- Resultados y discusión	29
3.1 Síntesis y caracterización del ligante Dimp	29
3.1.1 Síntesis	29
3.1.2 Análisis elemental	30
3.1.3 Espectroscopía de infrarrojo	30
3.1.4 Espectroscopía de RMN ¹ H	31
3.1.5 Espectroscopía de RMN ¹³ C	33
3.1.6 Experimento HETCOR	36
3.1.7 Experimento COSY	38
3.1.8 Espectrometría de masas	40

3.2 Síntesis y caracterización del complejo [Cu₂Dimp(H₂O)₄](ClO₄)₄	41
3.2.1 Síntesis	41
3.2.2 Análisis elemental	42
3.2.3 Espectroscopía de infrarrojo	42
3.2.4 Conductividad	43
3.2.5 Difracción de rayos X	44
3.2.6 Momento magnético	46
3.3 Determinación de las constantes de equilibrio	47
3.3.1 Determinación de los pK _a s del ligante	47
3.3.1.1 Diagrama de predominio de especies	49
3.3.2 Determinación de las constantes del complejo Cu ₂ Dimp	50
3.3.2.1 Diagrama de predominio de especies	52
3.4 Estudio cinético del complejo Cu₂Dimp	53
3.4.1 Estudios en MeCN:H ₂ O, 1:1	60
3.4.1.1 En función del pH	60
3.4.1.2 En función de la concentración del catalizador a pH= 7.5 y 8.5	62
3.4.1.3 En función de la concentración del sustrato a pH= 7.5 y 8.5	63
3.4.2 Estudios en MeOH:H ₂ O, 1:1	66
3.4.2.1 En función del pH	66
3.4.2.2 En función de la concentración de catalizador a pH= 7.5	67
3.4.2.3 En función de la concentración del sustrato a pH= 7.5	70
3.4.3 Determinación de los parámetros cinéticos: <i>V_{max}, K_M, k_{cat}, k_{cat}/K_M</i>	71

4.- Conclusiones	78
5.- Parte experimental	80
5.1 Reactivos	80
5.2 Equipos	81
5.3 Síntesis	83
5.3.1 Síntesis del ligante Dimp	83
5.3.2 Síntesis del complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$	84
5.4 Titulaciones potenciométricas	84
5.4.1 Normalización de la disolución de NaOH	84
5.4.2 Normalización del HNO_3 y determinación del % de CO_3^{2-} en el NaOH	85
5.4.3 Titulaciones potenciométricas para la obtención de los pK _s del ligante	87
5.4.4 Titulaciones potenciométricas para la obtención de las constantes formación (β) del Cu_2Dimp	88
5.5 Estudio cinético del complejo Cu_2Dimp	89
5.5.1 Estudios en MeCN:H ₂ O, 1:1	89
5.5.1.1 En función del pH	89
5.5.1.2 En función de la concentración del catalizador a pHs 7.5 y 8.5	91
5.5.1.3 En función de la concentración de sustrato	93
5.5.2 Estudios en MeOH:H ₂ O, 1:1	94
5.5.2.1 En función del pH	94
5.5.2.2 En función de la concentración del catalizador a pH= 7.5	95
5.5.2.3 En función de la concentración de sustrato	97
6.- Referencias	99

Abreviaturas y símbolos

Dimp	Ligante 2,8-dimetil-5,11-di-(2-metilpiridina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]-imidazo[4,5-c][1,6] diazecina
H _x Dimp	Distintos estados de protonación del ligante Dimp
Cu ₂ L	Complejo dinuclear de cobre(II)
Cu ₂ Dimp	Complejo dinuclear de cobre(II) con el ligante Dimp
IR	Espectroscopía de infrarrojo
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
COSY	Espectroscopía de correlación
HETCOR	Correlación heteronuclear
RPE	Resonancia paramagnética electrónica
FAB ⁺	Bombardeo con átomos rápidos. Detección de iones positivos
m/z	Relación masa / carga
μS	Micro siemens
δ	Desplazamiento químico.
MB	Magnetones de Bohr
ε ₀	Coefficiente de extinción molar estándar
log β	Logaritmo de la constante de formación acumulativa
v ₀	Velocidad inicial
V _{max}	Velocidad máxima
K _M	Constante de Michaelis-Menten
k _{cat}	Constante catalítica
DTBC	3,5-Di- <i>ter</i> -butilcatecol
DTBQ	3,5-Di- <i>ter</i> -butil- <i>o</i> -quinona
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfónico]
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

Introducción

La química bioinorgánica constituye una disciplina ubicada entre las áreas de la química inorgánica y la biología y aunque la biología está asociada generalmente a la química orgánica, los elementos inorgánicos son de importancia primordial para los procesos vitales. El estudio de este campo ha crecido enormemente durante las últimas décadas, lográndose un nivel de comprensión mucho mayor, gracias al progreso de los métodos físicos y químicos, los cuales han permitido analizar nuevos sistemas biológicos que dependen de la presencia de iones metálicos.

La bioinorgánica ha clasificado a los iones metálicos por su efecto en los seres vivos en tres categorías¹:

a) Esenciales: aquellos cuya presencia es determinante para el buen funcionamiento de procesos biológicos.

b) No esenciales: aquellos cuya presencia no es primordial para que se lleven a cabo reacciones en el metabolismo, pero que en caso de encontrarse presentes sí favorecen esas reacciones.

c) Tóxicos: son aquellos metales cuya acción es dañina para el desarrollo del ser vivo ya que su presencia inhibe reacciones biológicas.

Entre los metales esenciales se encuentran los elementos de la primera serie del bloque "d" los cuales participan en procesos enzimáticos, en transportes a nivel de membrana, en moléculas transportadoras de electrones, o de oxígeno. Entre los elementos más comunes que desempeñan funciones biológicas se encuentran el hierro, el zinc y el cobre formando parte de las metaloenzimas^{2,3}. Las metaloenzimas son enzimas que en su estructura contienen uno o más iones metálicos y son de gran importancia ya que participan en la catálisis de diversos procesos biológicos. Ejemplos de estas metaloenzimas son la tirosinasa y la catecol

oxidasa las cuales contienen átomos de cobre en su sitio activo y participan en la catálisis de las reacciones de oxidación^{4,5}.

Debido a que las metaloenzimas son moléculas complejas, su estudio se ha dificultado, por lo que se han preparado y caracterizado un gran número de modelos sintéticos de bajo peso molecular, basados en los sitios activos de algunas metaloenzimas, con el propósito de facilitar su estudio y poder entender mejor las propiedades físicas y químicas de estas macromoléculas. Los compuestos modelo sintéticos simulan alguna o varias de las propiedades físicas o químicas del sitio activo en la enzima^{6,7}.

Como resultado de la síntesis de sistemas modelo se han obtenido compuestos de coordinación de bajo peso molecular, los cuales se pueden modificar y mejorar continuamente para que puedan tener una actividad catalítica superior a catalizadores ya existentes, aunque aun resulta imposible obtener la eficiencia catalítica de las enzimas.

Debido a que el cobre es el tercer metal del bloque d más abundante del cuerpo humano su estudio en los sistemas biológicos resulta de gran interés, por lo que en esta tesis se presenta el estudio de un modelo sintético basado en las características del sitio activo de proteínas dinucleares de cobre.

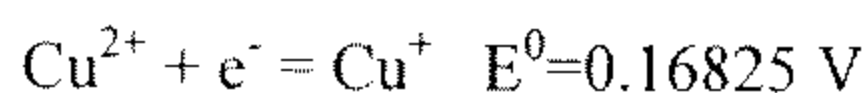
En la gran mayoría de las proteínas de cobre, éste se encuentra coordinado a residuos imidazólicos de histidina, por lo que la mayoría de los sistemas que se han propuesto como modelos, contienen ligantes con átomos de nitrógeno heteroaromáticos. Considerando también que en un gran número de estas proteínas, la actividad catalítica requiere la presencia de al menos dos átomos de cobre que interactúan íntimamente, buena parte de los modelos propuestos involucran complejos dinucleares⁸⁻¹⁰.

En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización de un sistema modelo, que puede emplearse como catalizador en reacciones de oxidación de catecoles.

1.- Antecedentes

1.1 Química de coordinación del cobre^{11,12}

El cobre (I) es un ácido blando de acuerdo a la teoría de ABDB ya que forma compuestos estables con ligantes donadores como: bromuros y yoduros, compuestos azufrados, y heterocíclicos insaturados. La configuración del ion Cu(I) es d^{10} , lo cual provoca que este ion sea espectroscópicamente invisible, pero por otro lado, su estado diamagnético hace posible su estudio por RMN. La geometría preferida para este ion es el tetraedro aunque también presenta complejos con geometrías lineal y triangular. Las estabilidades relativas de los estados cobre(I) y cobre(II) en disolución acuosa, están indicadas por los siguientes valores de potencial



Estos valores de potenciales indican que en disolución acuosa la especie Cu(I) dismuta para producir Cu^{2+} y Cu. Así, las propiedades redox de estos iones en disolución dependen principalmente de la naturaleza de los aniones u otros ligantes presentes y varían considerablemente con el disolvente.

El cobre (II) es un ácido comparativamente más duro que el Cu(I). Este ion al encontrarse en ambientes de simetría cúbica como la octaédrica sufre distorsiones en la geometría, ya que al tener una configuración d^9 las distorsiones espontáneas se producen para reducir la simetría, la energía y eliminar la degeneración, según el Teorema de Jahn-Teller. Así, los complejos que forma con moléculas pequeñas presentan una geometría tetragonal con cuatro ligantes ecuatoriales y ninguno, uno o dos ligantes axiales unidos débilmente. Los números de coordinación más comunes del cobre(II) son 4, 5 y 6.

El efecto Jahn-Teller provoca que los orbitales d se desplacen para que el orbital $d_{x^2-y^2}$ sea el orbital semilleno de más alta energía, disminuyendo así la

energía del sistema. La espectroscopia de absorción es útil en la caracterización de estos sistemas.

Debido a que en la región de baja energía en los espectros de absorción, predominan las transiciones desde los orbitales d llenos al $d_{x^2-y^2}$ semiocupado, y que la energía de estos orbitales está determinada por el campo de los ligantes, las transiciones $d-d$ asociadas son muy sensibles a la geometría.

Los momentos magnéticos de los complejos simples de Cu(II) caen generalmente dentro del intervalo de 1.75-2.20 MB, sin importar la geometría.

1.2 Cobre en los sistemas biológicos

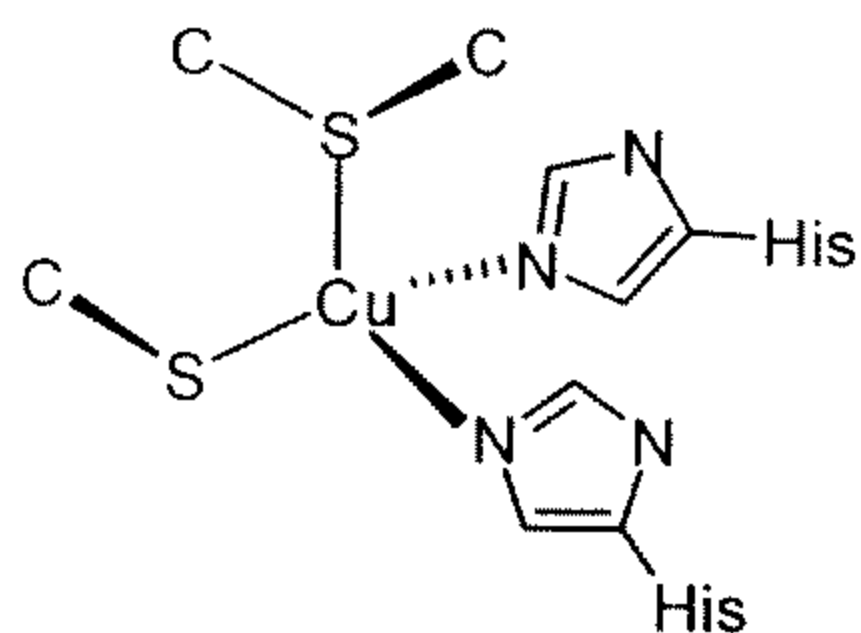
El cobre es considerado como un elemento bioesencial, que se encuentra presente en concentraciones del orden de partes por millón en los sistemas vivos¹. Una de las principales características de este metal en organismos es que no puede existir en cantidades apreciables en forma de ion libre (a excepción del estómago en donde el pH ácido sí lo permite), de tal manera que casi la totalidad del Cu se encuentra formando parte de complejos con proteínas. Las proteínas que contienen cobre están ampliamente distribuidas tanto en animales como en plantas. Muchas de estas proteínas son enzimas y el Cu es parte de su sitio activo¹³.

Las principales enzimas de Cu que se encuentran en el hombre son: ceruplasmina, citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, metalotioneína y tirosinasa, las cuales están involucradas en una gran variedad de procesos vitales como: la respiración, la pigmentación, funciones endocrinas y la eliminación de radicales libres. Las principales funciones de estas enzimas son: la transferencia de electrones, la catálisis de la reducción de O_2 a H_2O_2 y H_2O , la catálisis de la oxidación de sustratos orgánicos por O_2 y el transporte de dioxígeno y el metabolismo de éste.

1.3 Clasificación de las enzimas de cobre

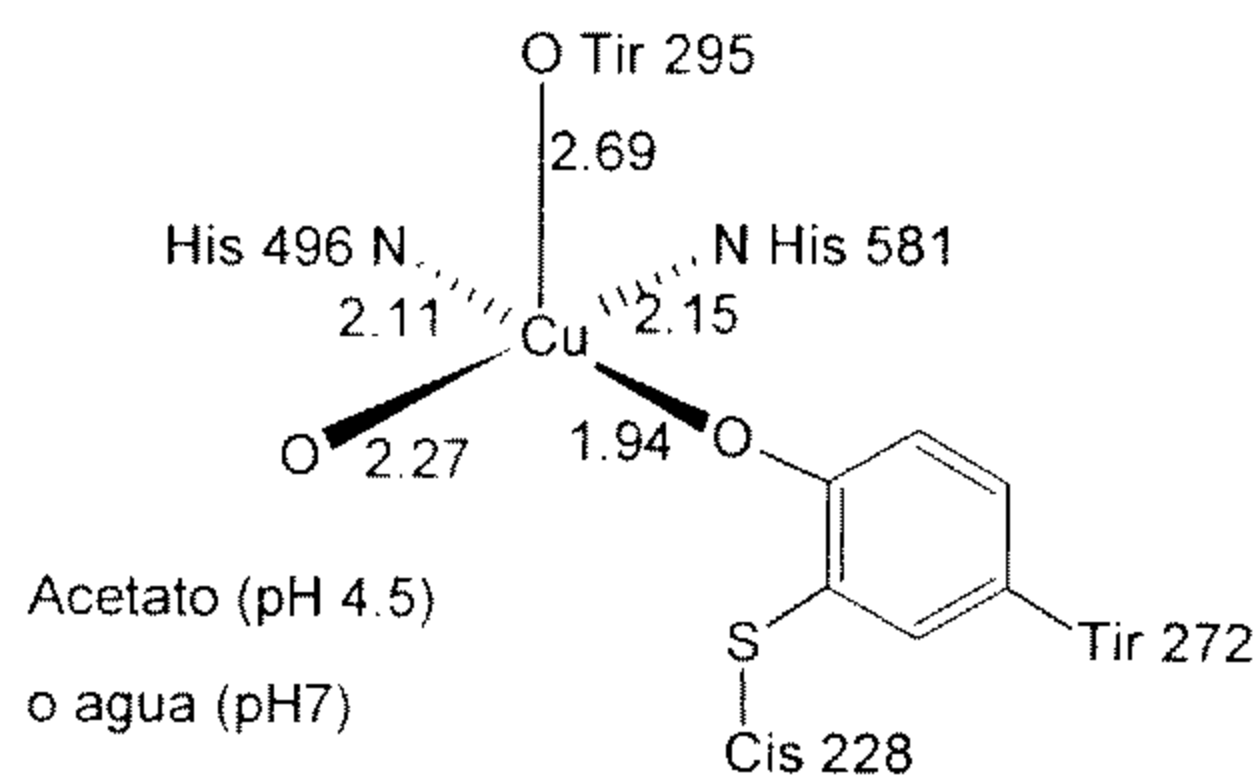
Las enzimas que contienen cobre se han clasificado de acuerdo a su sitio activo en tipo I, tipo II y tipo III. La clasificación se ha hecho con base en sus características espectroscópicas, que reflejan la estructura geométrica y electrónica de cada tipo^{5,13,14}.

Enzimas de cobre tipo I o proteínas azules de cobre. Este tipo de enzimas se distinguen por tener un solo ion metálico en su sitio activo con características espectroscópicas especiales, entre las cuales destaca el color azul causado por una intensa transferencia de carga ligante-metal ($\epsilon > 2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) del azufre de la cisteína al Cu(II), localizada alrededor de 600 nm. En este tipo de enzimas la esfera de coordinación está compuesta por un sistema N_2S_2 que incluye dos átomos de nitrógeno de los grupos imidazólicos de dos histidinas, un átomo de azufre del tiolato de una cisteína y otro del tioéter de una metionina. Las estructuras cristalinas de estas proteínas indican que sus centros metálicos tienen una esfera de coordinación tetraédrica fuertemente distorsionada, que se asocia con un estado intermedio entre las geometrías preferidas del Cu(II) (cuadrada) y del Cu(I) (tetraédrica). Otra característica de este tipo de sitios es que en el espectro de RPE se observa una constante de desdoblamiento hiperfino muy pequeña ($A_{//}$) de $50 - 90 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Por último los altos valores de los potenciales redox del par Cu(II)/Cu(I) (0.3-0.8 V), se asocia a los enlaces Cu-S presentes, así como a la asimetría de la estructura. Un ejemplo de este tipo de enzimas es la plastocianina, la cual es una proteína que tiene como función transferir electrones.



Sitio activo de la Plastocianina

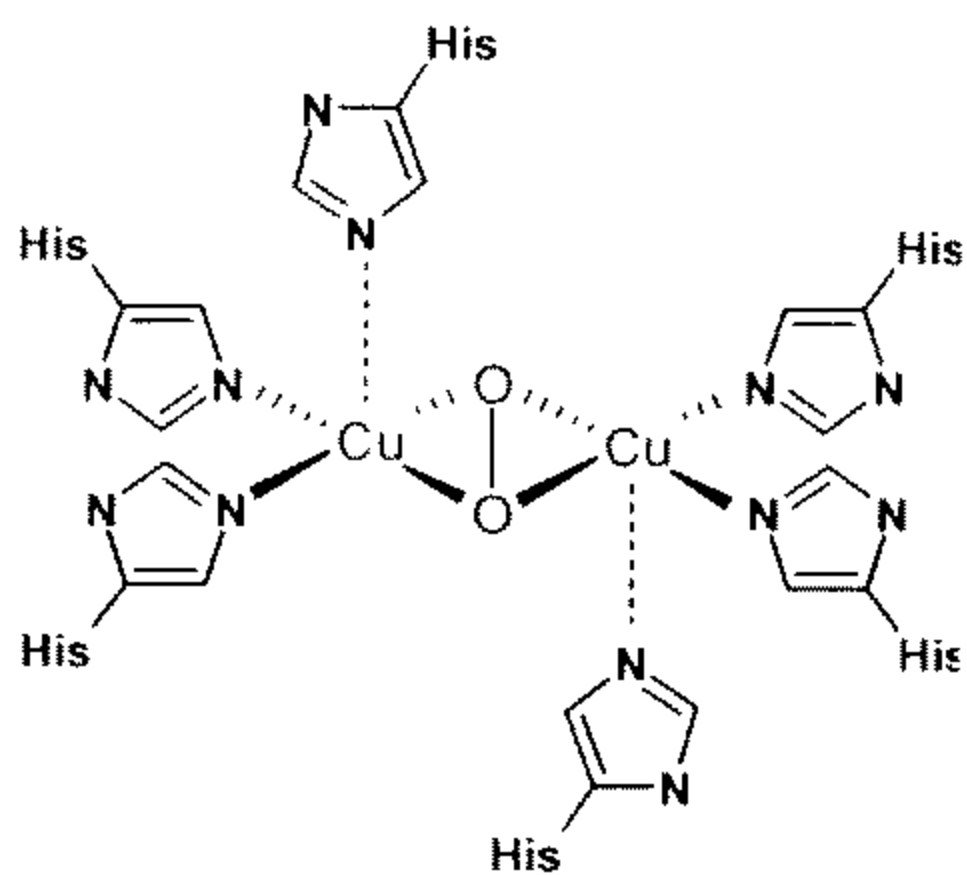
En las enzimas del Tipo II o también llamadas enzimas no azules de cobre, las propiedades espectroscópicas del cobre son muy parecidas a la de los compuestos de coordinación comunes de cobre, en las cuales los sitios activos presentan una esfera de coordinación cuadrada. Esta enzimas por lo regular no presentan bandas de transferencia de carga observables en sus espectros de absorción y las señales que presentan sus espectros RPE son similares a las de los complejos tetragonales comunes de Cu(II). Un ejemplo de este tipo de enzimas es la galactosa oxidasa, que cataliza la oxidación de varios alcoholes primarios a aldehídos, en esta reacción de catálisis hay transferencia de dos electrones. El sitio activo de esta enzima está constituido por un solo ion cobre (II) coordinado a dos imidazoles de restos de histidina, a dos tirosinas, una de ellas en la posición axial, y a una molécula de agua o un ion acetato, con una geometría de pirámide cuadrada. La tirosina ecuatorial se encuentra covalentemente unida a un residuo de cisteína en la posición orto del grupo hidroxilo



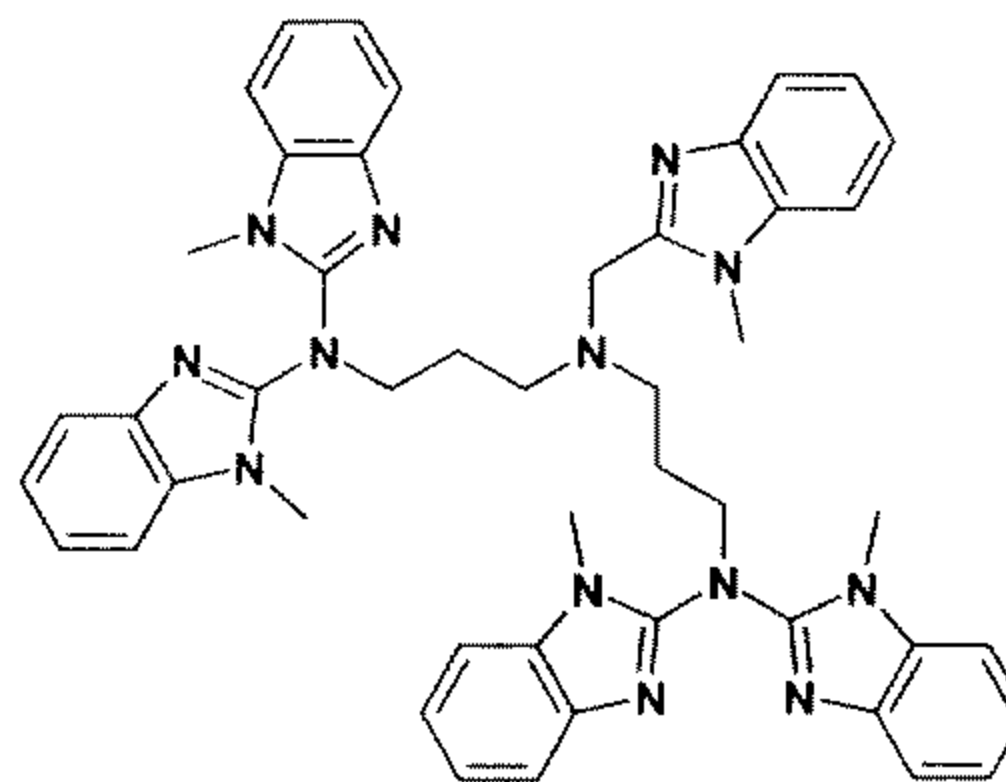
Sitio activo de la galactosa oxidasa

Las enzimas del Tipo III contienen en su sitio activo dos iones de cobre (II), los cuales se encuentran a muy poca distancia provocando que los electrones desapareados de cada ion se acoplen antiferromagnéticamente. Este acoplamiento se da gracias a que los dos sitios metálicos se mantienen en contacto a través de una interacción directa Cu-Cu o mediante uno o más ligantes puente que

presentan un traslape favorable entre los orbitales magnéticos del metal y los orbitales del ligante. Estas enzimas presentan una absorción en el espectro UV-Vis en aproximadamente 330 nm. La hemocianina y la tirosinasa son ejemplos de enzimas tipo III.



Hemocianina



Ligante para modelar la enzima Tirosinasa

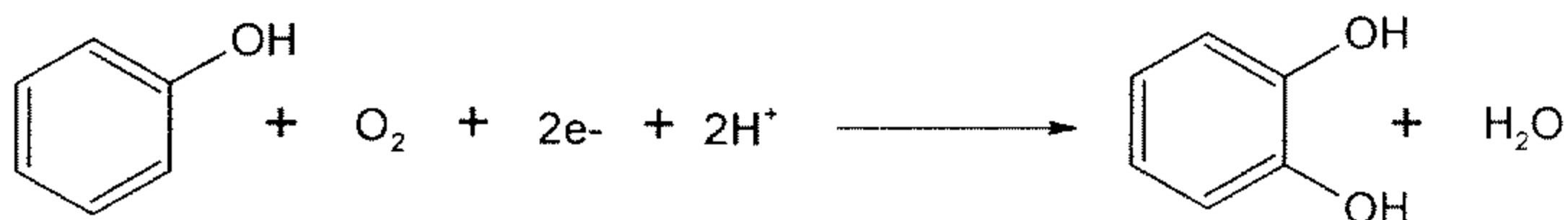
Existen otros tipos de enzimas de cobre, las cuales no pueden ser clasificadas en los tipos de enzimas descritas anteriormente debido a que estas contienen más de un sitio metálico.

1.4 Enzimas de cobre que catalizan reacciones de oxidación

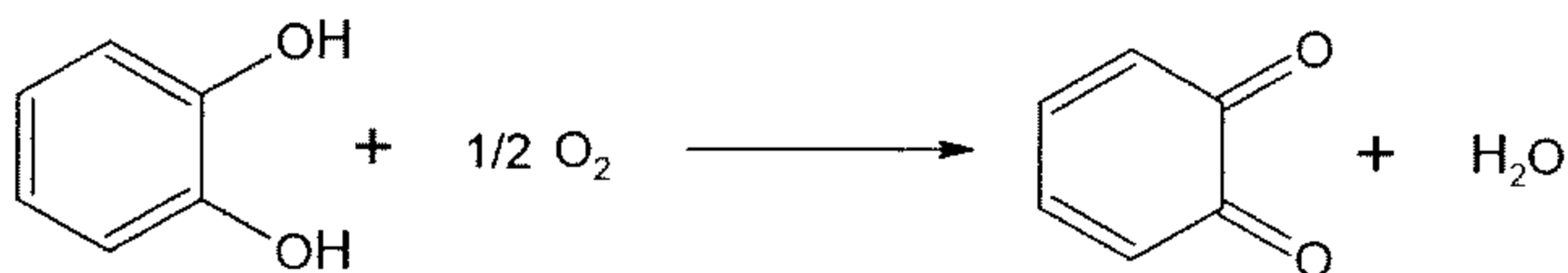
Estas enzimas también pueden clasificarse de acuerdo a la función que desempeñan en: oxidasas (oxidasas transferidoras de electrones), monooxigenasas (oxidasas de función mixta) y dioxigenasas (transferidoras de oxígeno)^{5,15}.

- Oxidasas : catalizan la transferencia de electrones al dioxígeno que puede reducirse a superóxido, peróxido o agua. Uno de los ejemplos de este tipo de enzimas es la azurina (enzima de cobre) que se encuentra en bacterias desnitrificantes, y presenta actividad oxidasa.

- Mono oxigenasas : catalizan reacciones de inserción de un solo átomo de oxígeno, mientras que el otro se reduce formando agua. Un ejemplo de esta clasificación es la tirosinasa que es una metaloenzima del tipo III, cuyo sitio activo contiene dos iones cobre (II) los cuales se encuentran acoplados magnéticamente. La tirosinasa es una monooxigenasa que utiliza el dioxígeno para la orto hidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa).



La tirosinasa también posee actividad de oxidasa, catalizando la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad catecolasa)¹⁶.



La tirosina es responsable de la producción de melanina y el pigmento responsable del oscurecimiento de las frutas, ésta se encuentra ampliamente en microorganismos, plantas y animales.

Aunque la estructura de esta enzima no es conocida aún, se sabe que ésta tiene grandes similitudes con la hemocianina, cuya estructura sí es conocida, por

lo que se asume que cada cobre se encuentra coordinado a 3 grupos imidazoles con una distancia entre ambos átomos de cobre de 3.4 Å.

De acuerdo a las características que presenta el sitio activo de la hemocianina, Solomon y colaboradores⁵ proponen un mecanismo de la actividad catalítica de la tirosinasa basados en la geometría y estructura electrónica del sitio activo de la oxihemocianina. Por medio de estudios químicos y espectroscópicos se han logrado caracterizar derivados del sitio activo de la hemocianina, mostrados a continuación:

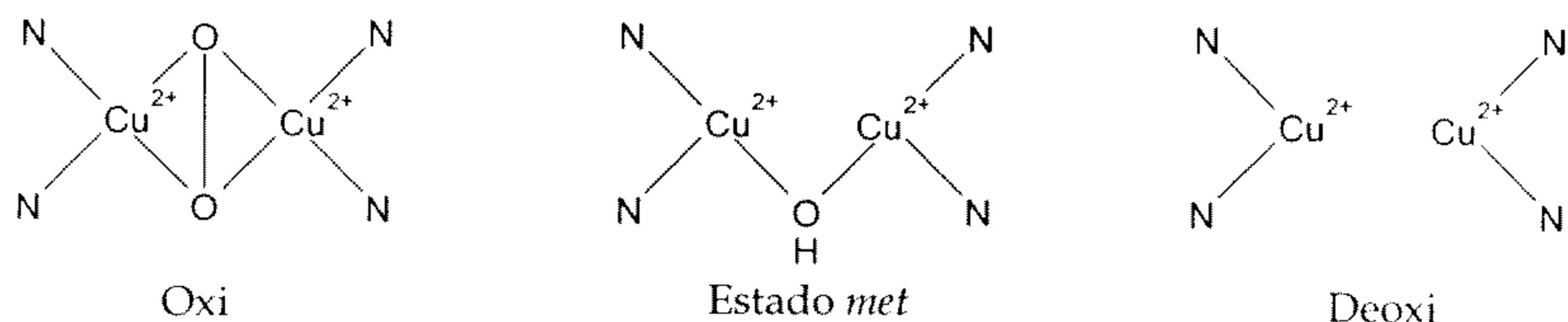


Figura 1.1 Sitios activos de la hemocianina

Los átomos de N coordinados a los núcleos de cobre provienen de histidinas. Es importante mencionar que cada ion metálico se encuentra coordinado a tres histidinas, aunque en la figura 1.1 se ha omitido la tercera para mostrar con más claridad cada una de las especies.

En la figura 1.2 se muestra el ciclo catalítico propuesto por Solomon y colaboradores⁵ para la oxidación del *o*-difenol a *o*-quinona realizado por la enzima Tirosinasa.

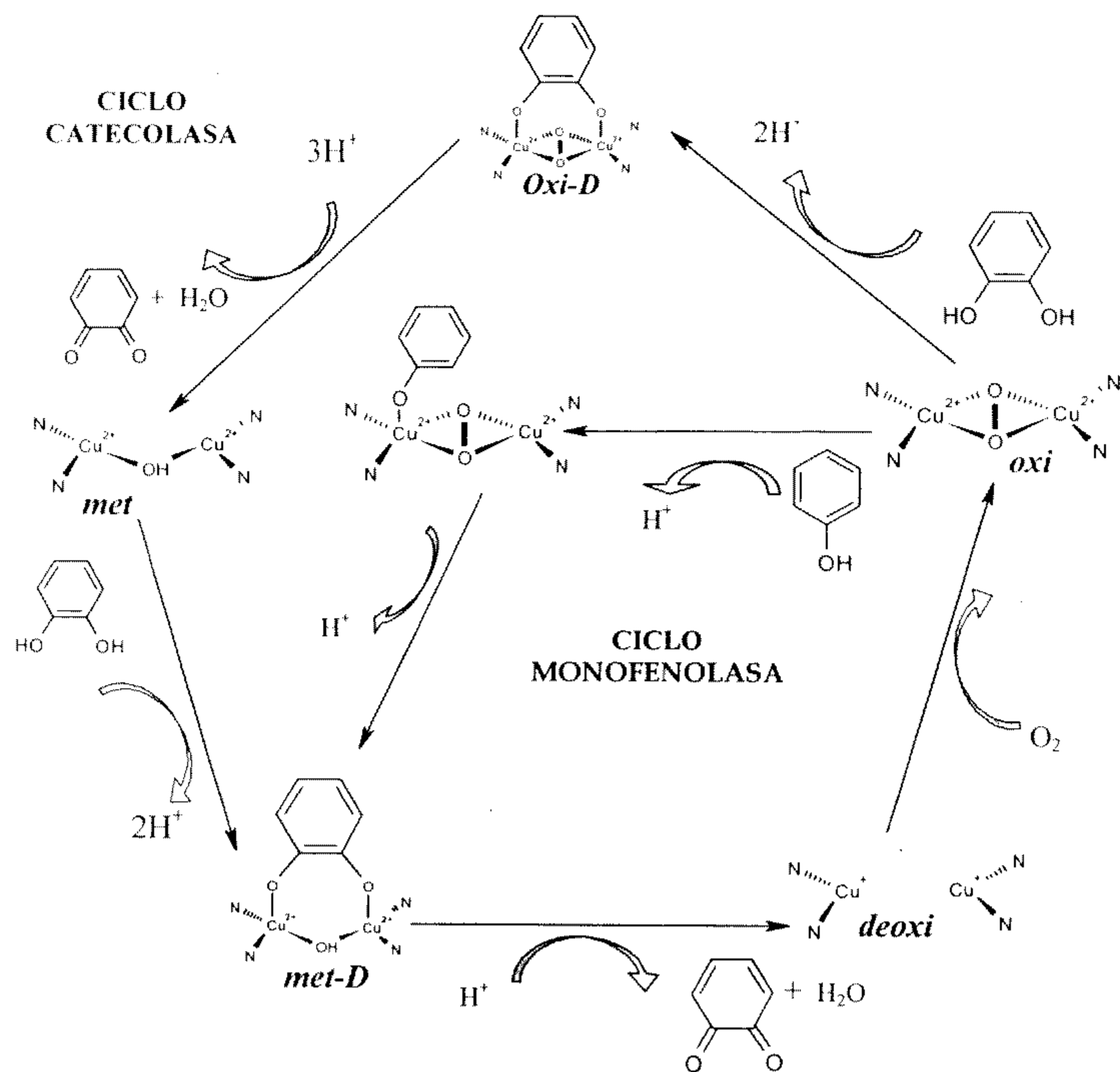


Figura 1.2 Ciclo catalítico de la oxidación de o-difenol a o-quinona por la enzima Tirosinasa.

Basados en los estudios de RPE de la tirosinasa los cuales no muestran señales en los espectros, se propone el estado *met* del sitio activo en el cual se encuentran los dos átomos de cobre puentados por un grupo OH, como en la hemocianina. El sitio *met* de la tirosinasa es competente cinéticamente para oxidar sustratos o-difenoles, pero no fenoles. El sitio oxirosinasa es producido por la adición de peróxido o por la reducción simultánea de los dos átomos de cobre al aceptar dos electrones (sitio deoxi), seguido por la formación de un enlace reversible de dióxígeno. El sitio oxirosinasa reacciona tanto con fenoles como o-

difenoles. Una de las diferencias entre las enzimas hemocianina y tirosina es que ésta última es capaz de reaccionar con sustratos, mientras que la hemocianina no.

En el mecanismo molecular de la tirosinasa se genera una especie en la cual se coordina el *o*-difenol, al estado *met* del sitio activo, el cual es oxidado a *o*-quinona, resultando un sitio deoxi, el cual se convierte rápidamente en el sitio oxi por la presencia de oxígeno molecular. En el ciclo catecolasa, tanto el estado oxi como el estado *met* reaccionan con *o*-difenoles, oxidándolos a *o*-quinonas.

- Dioxigenasas, catalizan reacciones en donde ambos átomos de oxígeno se incorporan al sustrato.

Debido a que los mecanismos por los que actúan las enzimas son complejos y muy diversos, la actividad catalítica de un gran número de complejos de cobre se ha investigado usando al 3,5-di-*tert*-butilcatecol como un sustrato modelo conveniente para evaluar su efectividad ya sea como modelos que tratan de simular los sitios activos de las metaloenzimas o como nuevos catalizadores para reacciones de oxidación.

1.5 Sistemas modelo de los sitios activos de las enzimas de cobre

El estudio de las enzimas de cobre en las últimas décadas ha sido de gran interés, debido al importante papel que éstas desempeñan en los sistemas vivos, y aunque la estructura de muchas metaloenzimas se conoce, el estudio de la mayoría de estas biomoléculas se ha dificultado por el tamaño y complejidad estructural que presentan. Así, los químicos inorgánicos y los bioquímicos, se han ocupado del estudio de sistemas modelo de bajo peso molecular, los cuales se han sintetizado,

basándose en las evidencias espectroscópicas de los sitios activos de las metaloenzimas¹⁷.

Los modelos se pueden clasificar en tres tipos: el corroborativo, donde es conocido el sitio activo de la enzima y el modelo se construye para estudiar las propiedades del sitio *in vitro*, para determinar si las propiedades de la metaloproteína están dominadas por la primera esfera de coordinación del metal. El segundo tipo es el especulativo, en el cual no se conoce la estructura pero hay datos espectroscópicos semejantes, por lo que es posible proponer una estructura del sitio activo por comparación. El tercer tipo es el modelo funcional, en el que se reproduce exactamente el sitio activo. Es importante mencionar que este último modelo aún no se ha podido desarrollar, debido a que las proteínas pueden doblarse para generar una estereoquímica especial que ayuda al metal para adoptar una geometría cercana a la del estado de transición propio de cada proceso catalítico.

Tomando en cuenta que en la mayoría de las proteínas con cobre, éste se encuentra coordinado a residuos imidazólicos de histidina, la mayor proporción de los sistemas que se han propuesto como modelos, contienen átomos de nitrógeno heteroaromáticos coordinados⁸⁻¹⁰. Considerando también que en un gran número de estas proteínas, la actividad catalítica requiere la presencia de al menos dos átomos de cobre que interactúen íntimamente, gran parte de los modelos propuestos involucran complejos dinucleares; los cuales son de gran importancia para la bioinorgánica, debido a las propiedades redox que presentan como catalizadores en procesos que involucran la transferencia de dos electrones.

De este modo, se propone que un buen sistema para modelar proteínas de cobre tipo III debe cumplir con las siguientes características:

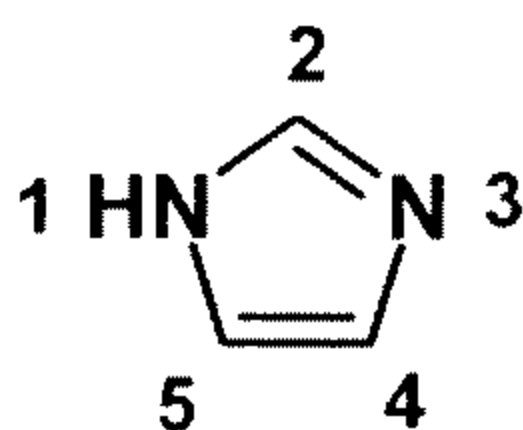
- El ligante debe tener átomos donadores de nitrógeno heteroaromático.

- El ligante debe ser capaz de estabilizar al cobre en sus dos estados de oxidación; tetraedro distorsionado para Cu(I) y tetragonal para Cu(II).
- El ligante debe ser capaz de mantener a los dos iones de cobre a una distancia de 3 a 5 Å y mantener este arreglo en disolución.
- El ligante debe coordinar a los iones metálicos con una alta constante de estabilidad, dejando por lo menos un sitio libre en cada núcleo para poder llevar a cabo las funciones catalíticas.

1.6 Reacción de Mannich en imidazoles

La mayoría de las enzimas de Cu(II) contienen en su sitio activo imidazoles coordinados al metal, por lo que es de gran importancia conocer la química del imidazol para la síntesis de compuestos modelo¹⁸⁻²⁰.

El imidazol presenta 4 posibles sitios de reacción en las posiciones 1, 2, 4, y 5.



La reacción de Mannich es un método muy útil, ya que es una reacción sencilla y eficaz para introducir en un solo paso grupos aminometil al anillo imidazólico.

La reacción de Mannich se puede llevar a cabo en medio ácido o básico²¹. En medio ácido el único producto que es posible obtener es la N-sustitución en la

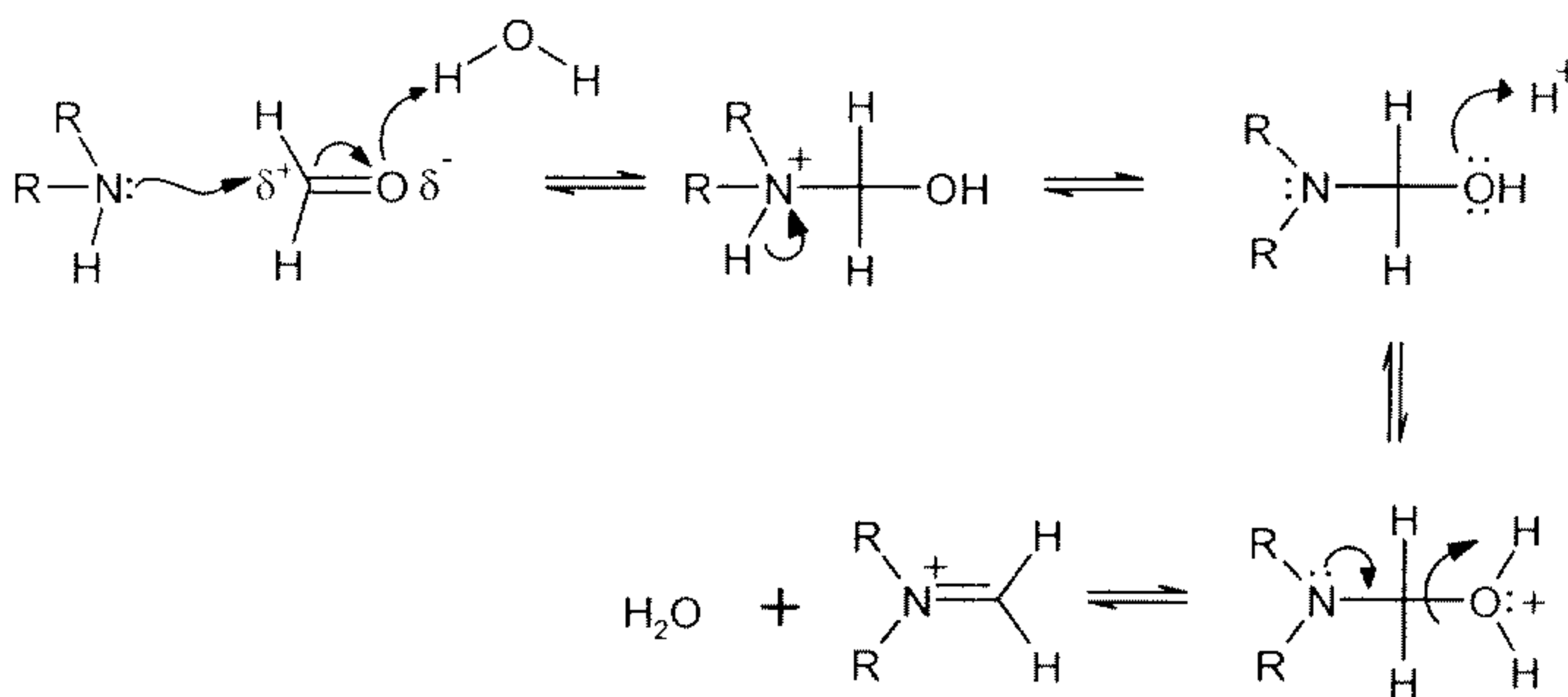
posición 1, mientras que en medio básico se favorecen la N-sustitución y la C-sustitución en las posiciones 2, 4 y 5. En medio básico la N-sustitución es una reacción reversible, mientras que la C-sustitución es irreversible.

La posición 1 es la más reactiva seguida de las posiciones 4 y 5 y por último la posición 2. La posición 1 del anillo imidazol debe encontrarse sin sustituir para que la reacción de Mannich se lleve a cabo.

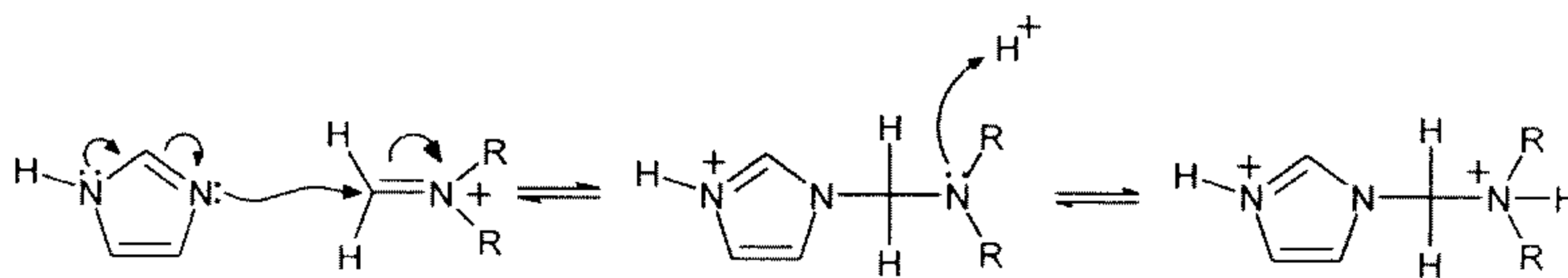
A continuación se presentan los mecanismos propuestos para la reacción de Mannich en medio ácido y básico²².

Medio ácido

Paso 1: formación de la sal de iminio.

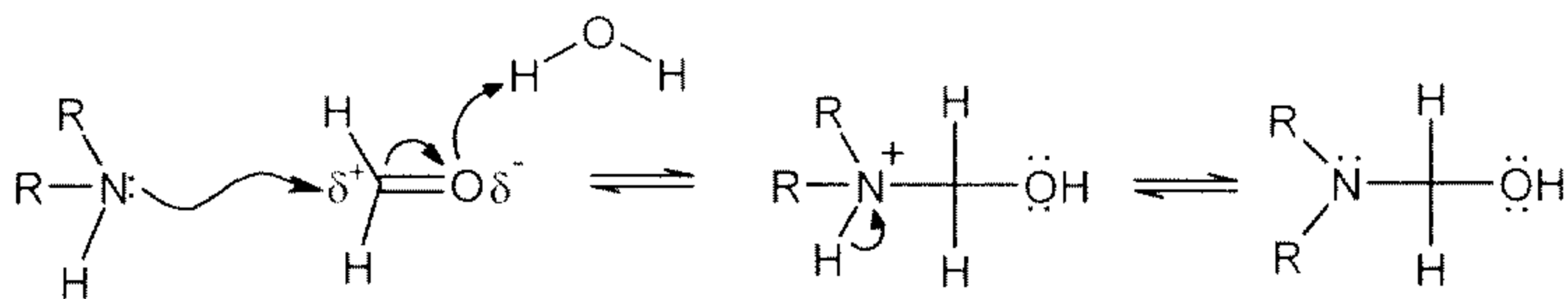


Paso 2: ataque en la posición N.



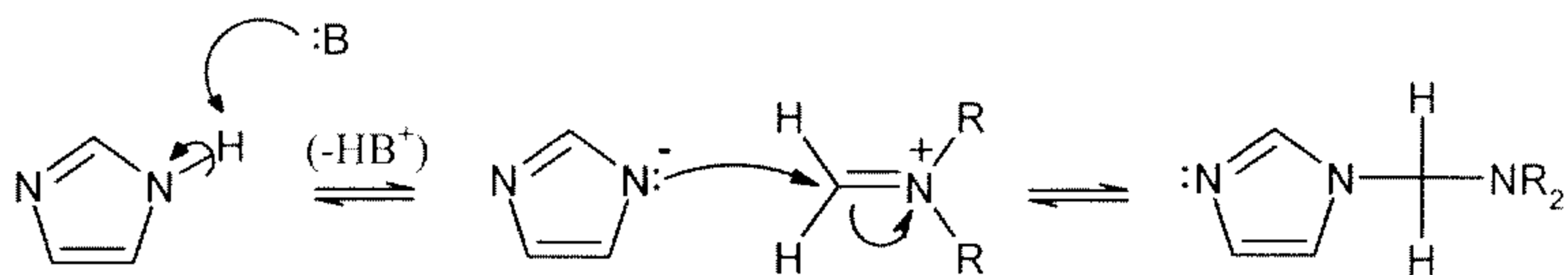
Medio básico

Paso 1: formación del *gem*-aminoalcohol

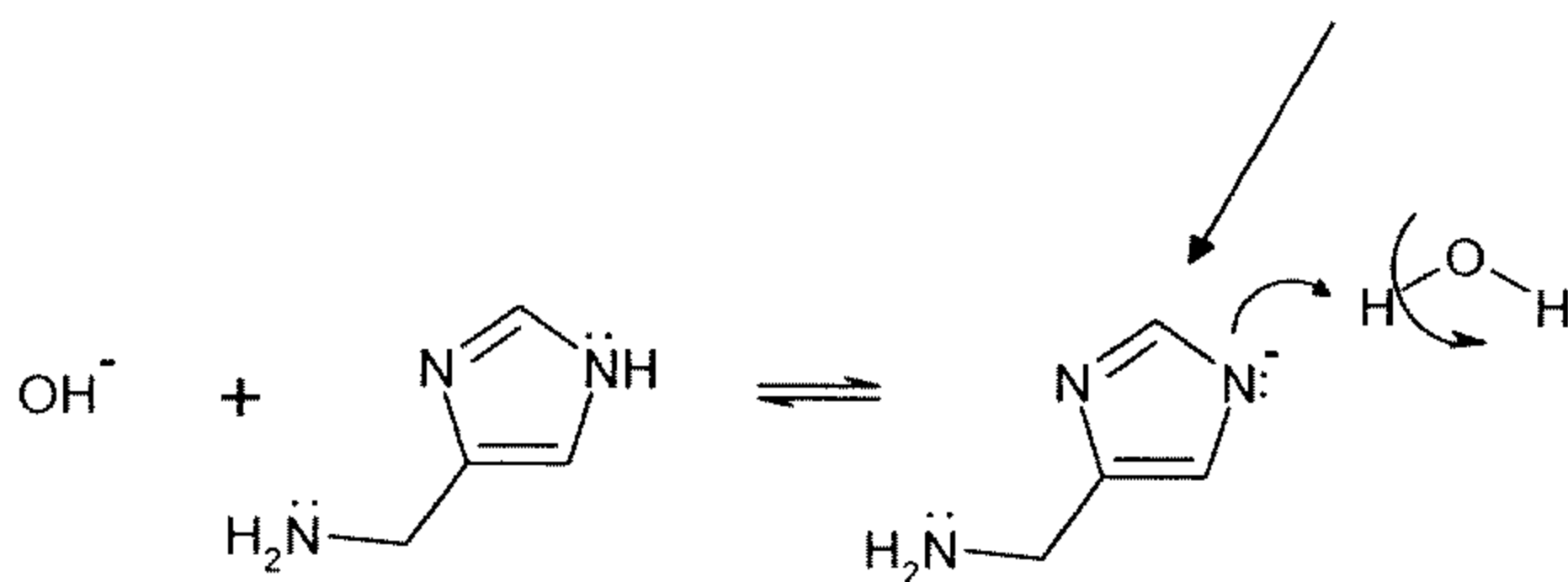
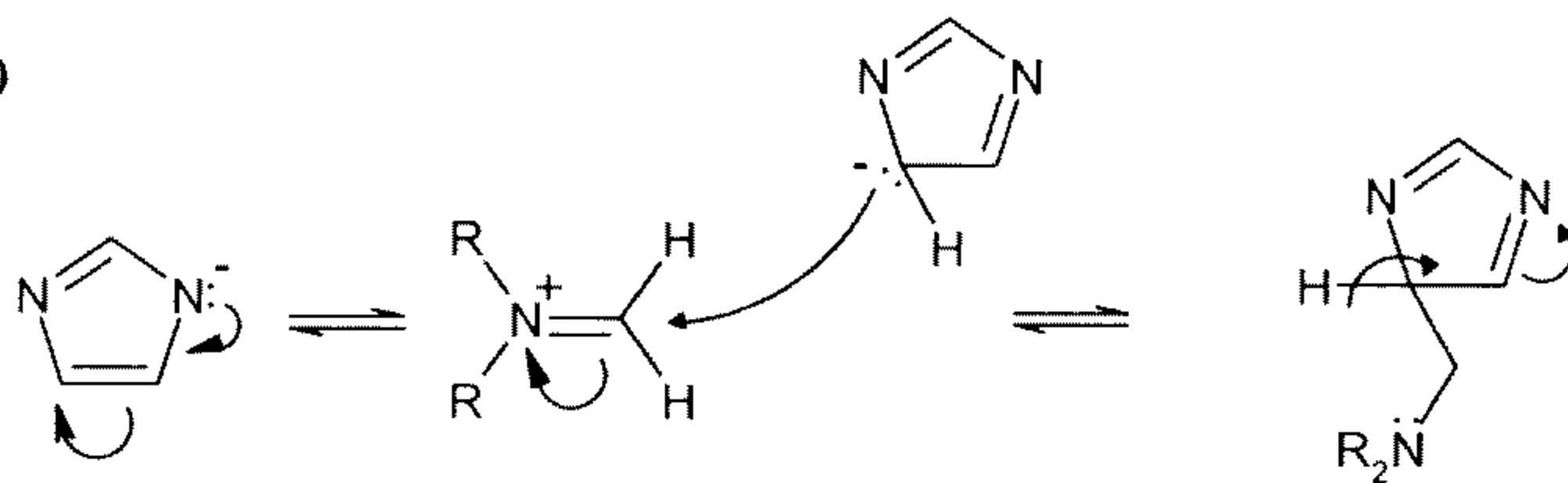


Paso 2: ataque en la posición N y C

a)



b)



1.7 Ligantes derivados de imidazol y sus complejos Cu₂L

El imidazol juega un papel muy importante en los sistemas vivos, ya que se encuentra como ligante en muchas metaloenzimas.

Uno de los propósitos de la bioinorgánica es la síntesis de compuestos modelo, que sean capaces de coordinarse al Cu(II), los cuales nos conduzcan a un mejor entendimiento de la relación entre la estructura y función de los sitios activos de las cobreproteínas y eventualmente a la utilización de este conocimiento en catálisis y otras aplicaciones técnicas. Por este motivo, se han sintetizado nuevos compuestos derivados de imidazol, los cuales se encuentran en un entorno apto para la formación de quelatos y así poder estudiar sus propiedades químicas y físicas.

Dado el gran interés de los sistemas dinucleares, se han realizado trabajos para obtener ligantes con la capacidad de formar estos compuestos.

Por medio de la reacción de Mannich, se han sintetizado diversos ligantes capaces de formar complejos dinucleares de Cu(II), obteniendo dos tipos diferentes, a los cuales se les ha clasificado como abiertos y cerrados debido a la estructura obtenida y al tipo de complejo dinuclear que forman²²⁻²⁶.

Estos ligantes se sintetizaron por medio de la reacción que se presenta a continuación:

|

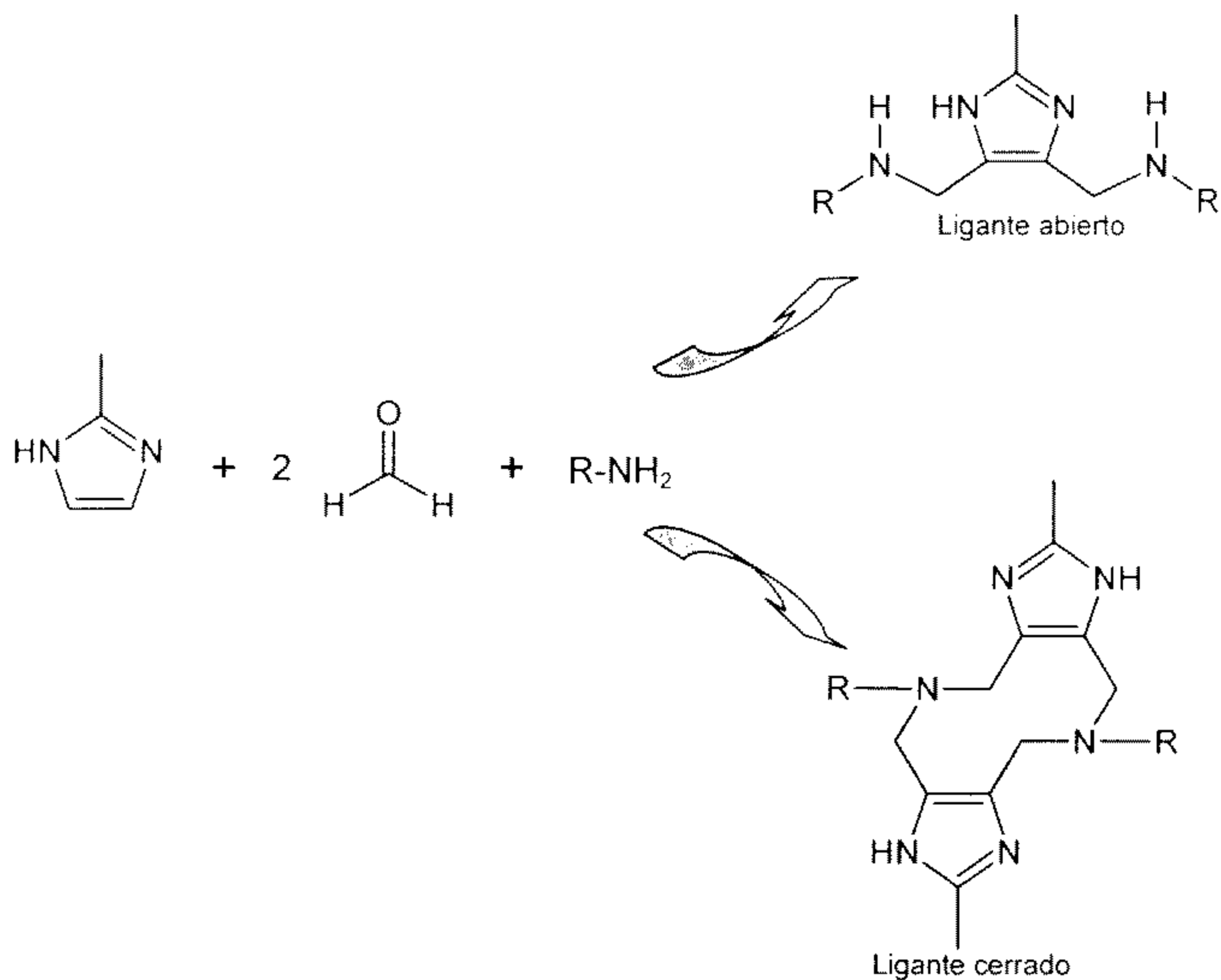
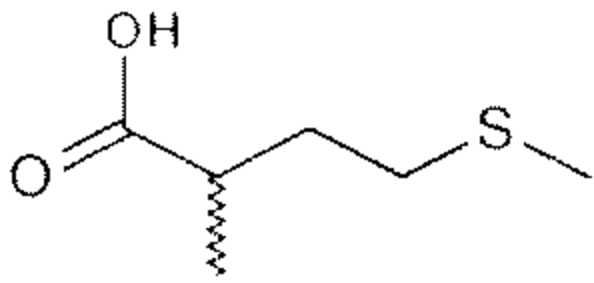
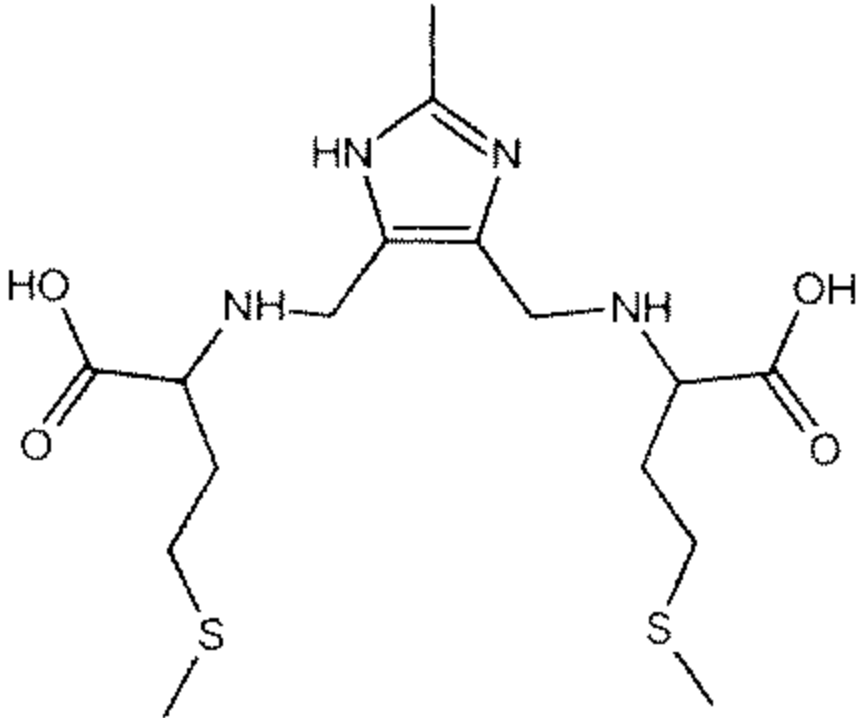
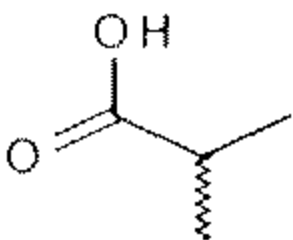
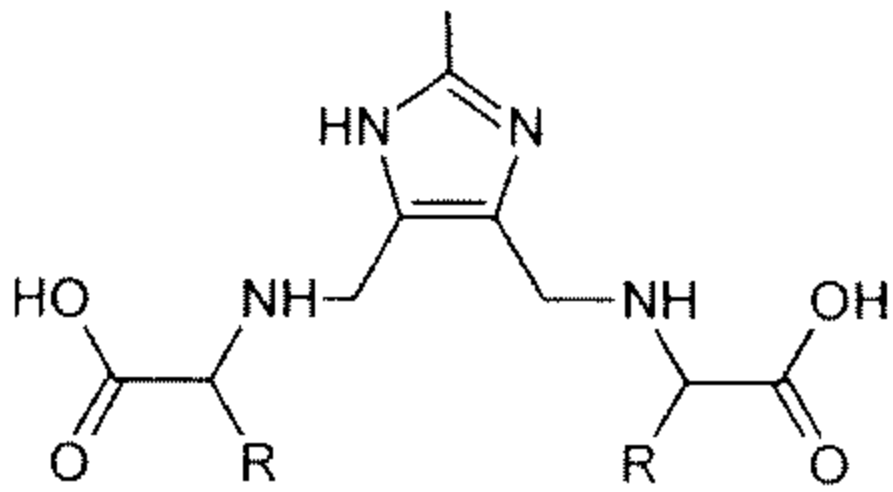
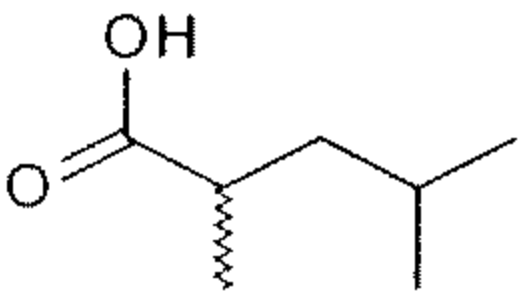
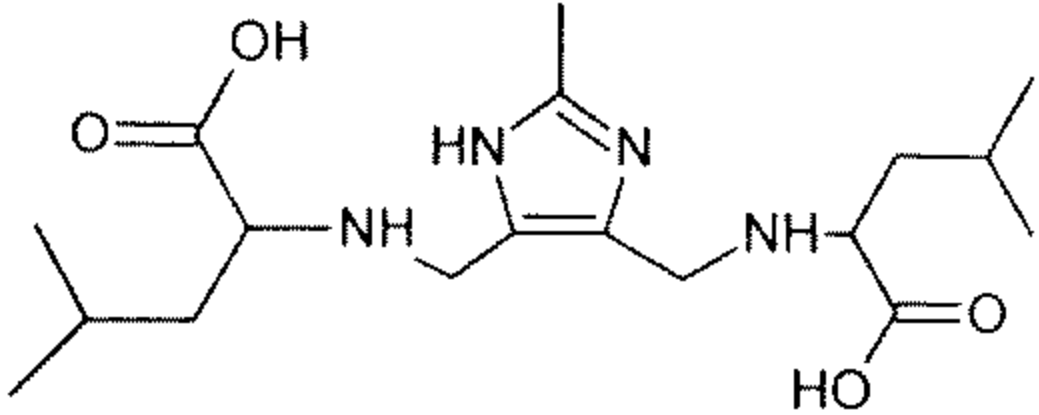
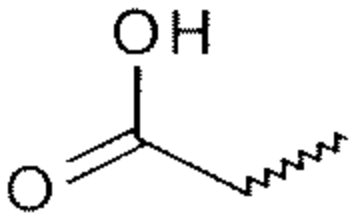
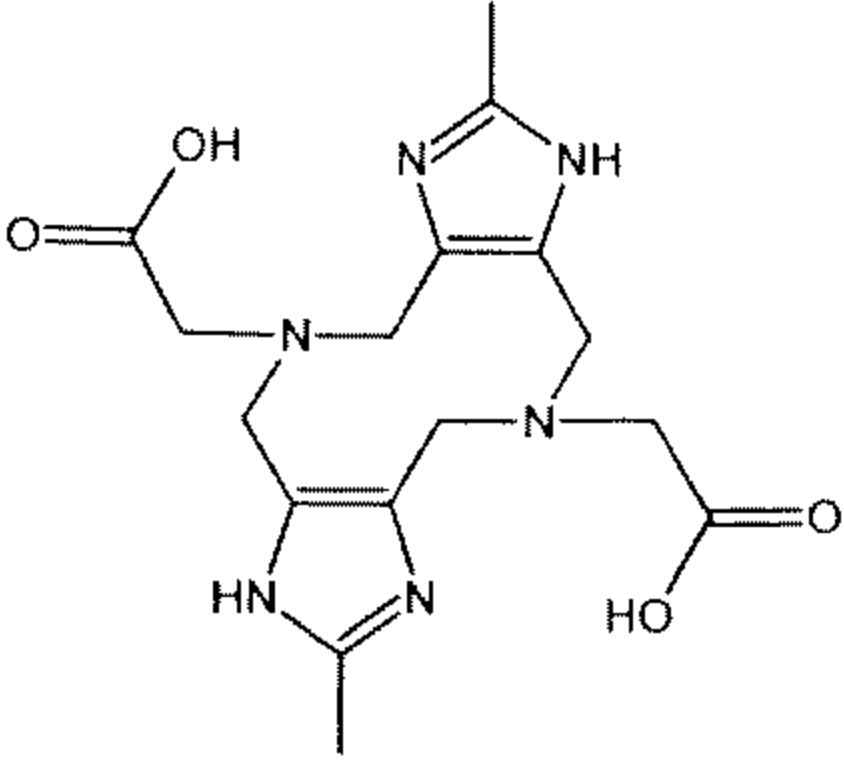



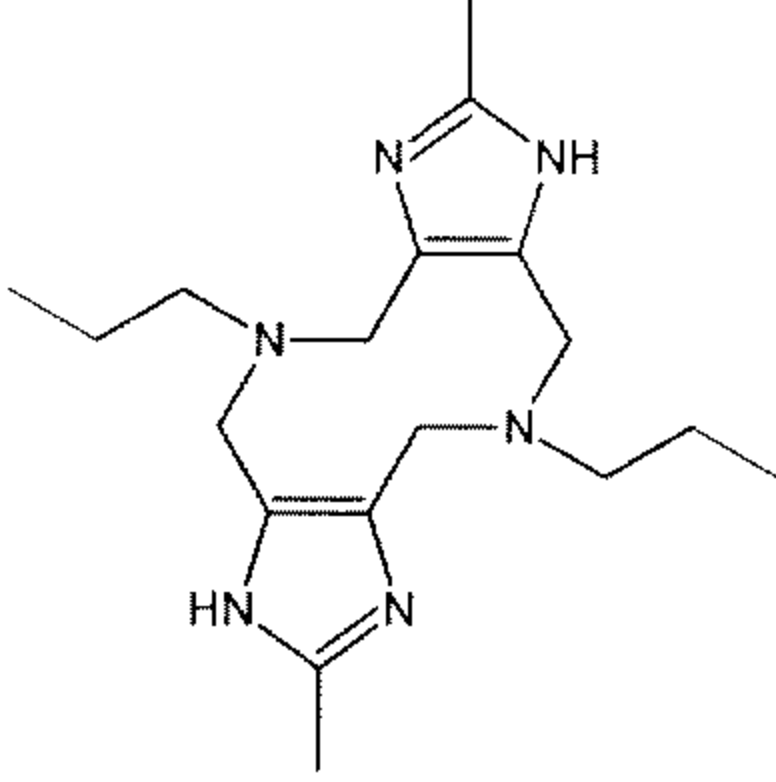
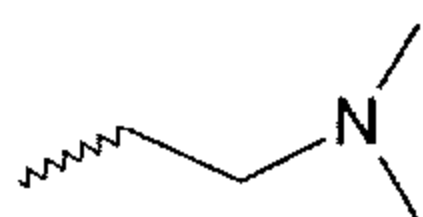
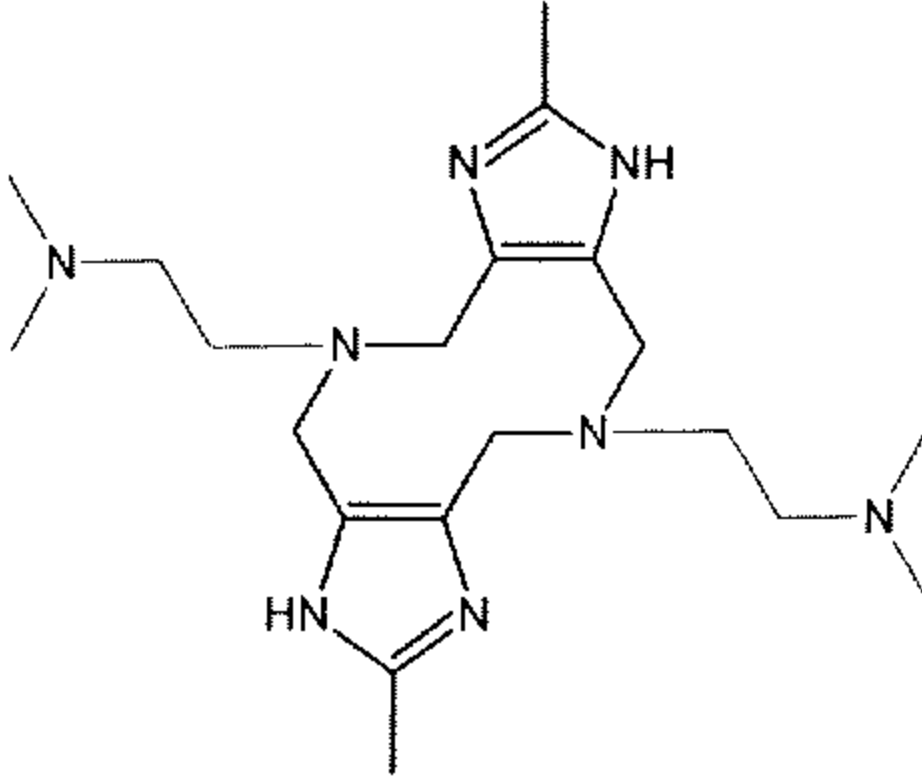
Figura 1.3 Reacción de Mannich para la síntesis de ligantes abiertos y cerrados

La síntesis de reacción para los compuestos abiertos y cerrados se llevó a cabo en medio básico.

Ligantes Tipo I "Abiertos"	
R	Ligante
	<p style="text-align: center;">Fenmeim</p>

	 <p style="text-align: center;">Metmeim</p>
	 <p style="text-align: center;">Alameim</p>
	 <p style="text-align: center;">Leumeim</p>

Ligantes Tipo II "Cerrados"	
R	Ligante
	

	<p style="text-align: center;">Glymeim</p>  <p style="text-align: center;">Promeim</p>
	 <p style="text-align: center;">Dimeim</p>

Con estos ligantes se han obtenido diversos complejos dinucleares de cobre (II). A continuación se muestran las estructuras cristalinas de algunos de estos complejos.

1.7.2 Complejos con ligantes abiertos.

Con los ligantes abiertos, se han obtenido dos modos distintos de coordinación de estos ligantes. Una, en la que se presenta la formación de puentes imidazolato y otra, en la que no.

Leumeim²⁶

El complejo obtenido para este ligante contiene dos átomos de cobre en entornos diferentes formando un polímero unidimensional, figura 1.4

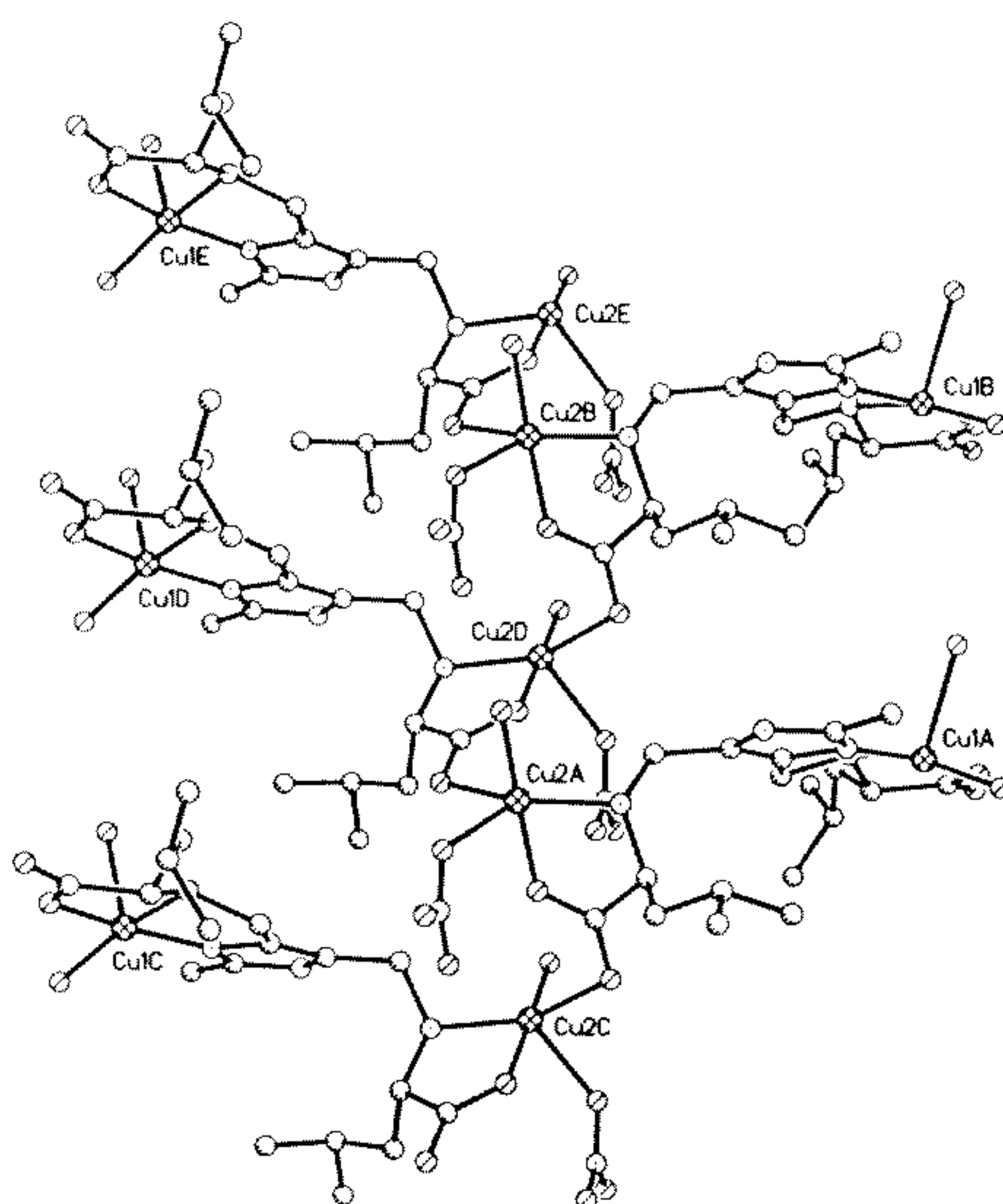


Figura 1.4 Estructura de rayos X del complejo $[Cu_2(Leumeim)(NO_3)(H_2O)]NO_3 \cdot H_2O$

Ambos átomos de cobre presentan geometría de pirámide cuadrada distorsionada. El Cu1 se encuentra unido al nitrógeno del anillo imidazol, al N del aminoácido y a uno de los oxígenos del carboxilato, así como a dos moléculas de agua. El Cu2 se une a una molécula de agua, al oxígeno del carboxilato, al nitrógeno del aminoácido y a un oxígeno del nitrato. También se encuentra unido a un átomo de oxígeno del grupo carboxilato de una molécula vecina de leumeim, lo que da origen a la cadena polimérica que puede apreciarse en la figura 1.4.

Fenmeim²⁷

Con el ligante Fenmeim se obtuvo la estructura mostrada en la figura 1.5.

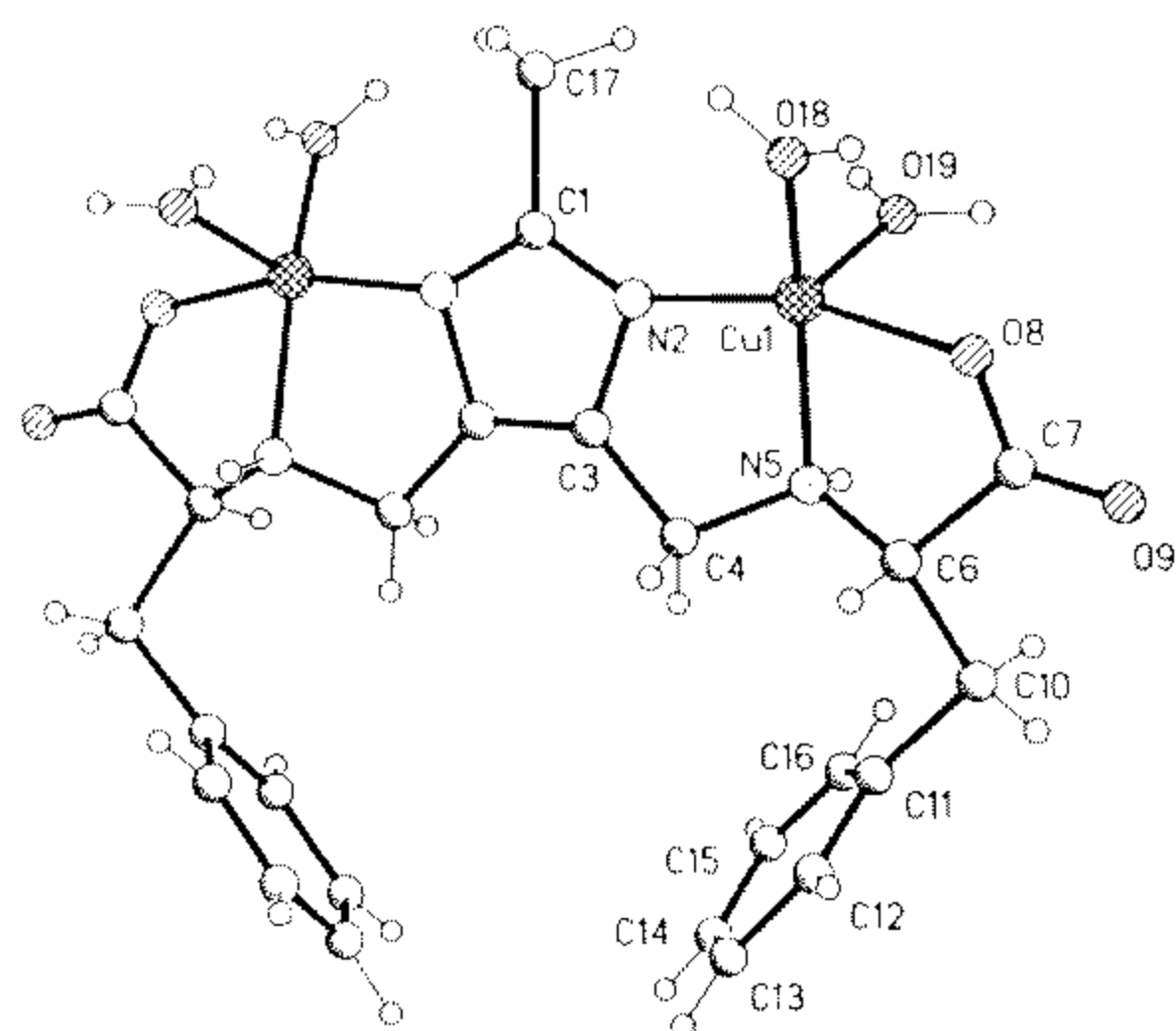


Figura 1.5 Estructura de rayos X del complejo $[Cu_2(\text{Fenmeim})(H_2O)_4]NO_3 \cdot H_2O$

Aquí, ambos átomos de cobre se encuentran en entornos de coordinación equivalentes, generados por la desprotonación del grupo imidazol.

La geometría es nuevamente de pirámide cuadrada distorsionada, en cuyo plano se encuentran el nitrógeno imidazólico, el nitrógeno alifático, el oxígeno del carboxilato, y una molécula de agua; en la posición apical hay otra molécula de agua.

1.7.3 Complejos con ligantes cerrados

Promeim^{23,24,25}

El ligante promeim, al ofrecer dos sitios de coordinación con solamente dos átomos donadores cada uno, no forma complejos fácilmente aislables. Se ha logrado obtener estructuras cristalinas sólo con contraiones coordinantes como el Cl^- y el AcO^- .

Con cloruros se obtiene el polímero que se muestra en la figura 1.6

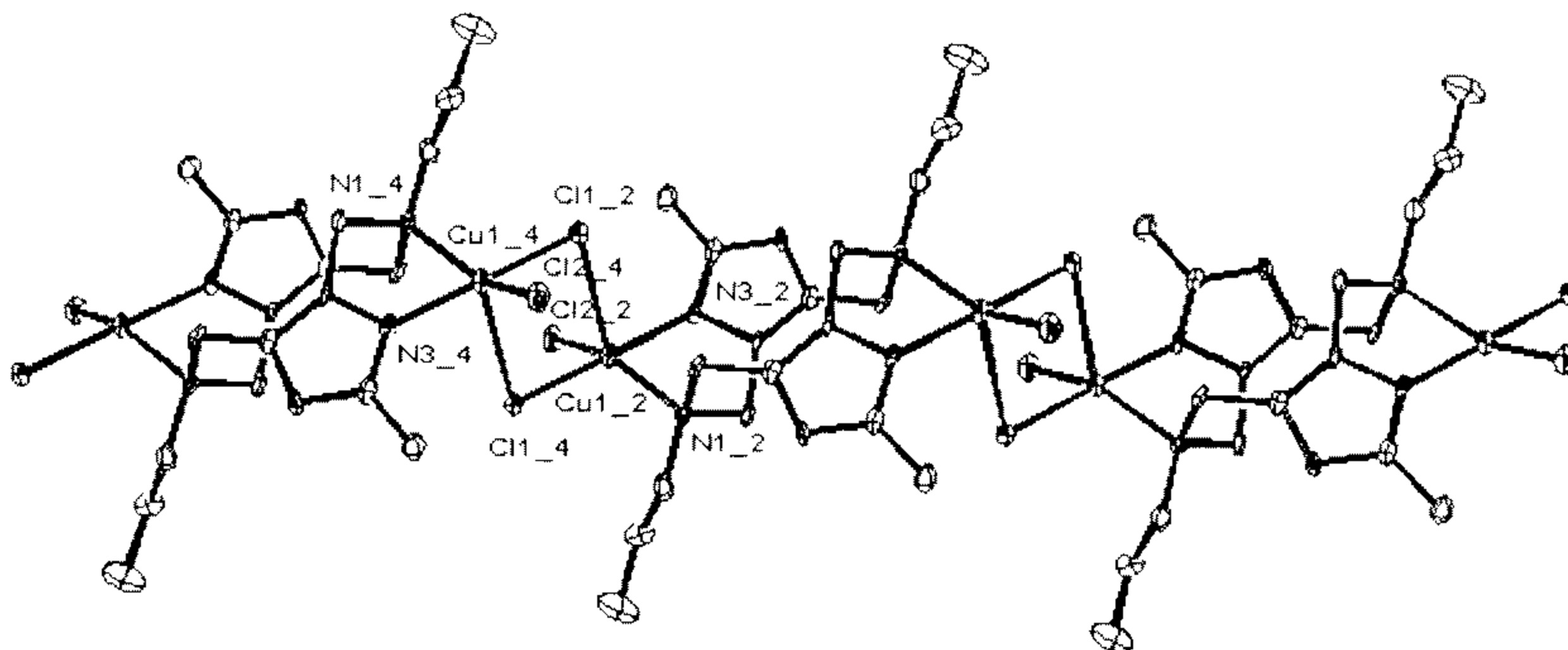


Figura 1.6 Estructura de rayos X del complejo $[Cu_2(\mu-Cl)_2Cl_2(Promeim)] \cdot H_2O$

Dos átomos de cobre coordinados a distintas moléculas de promeim, se encuentran puenteados por dos iones cloruro. Estos átomos de cobre son cristalográficamente equivalentes y presentan una geometría aproximada de pirámide cuadrada.

En el plano de la pirámide se encuentran, además de los iones cloruro puente, dos átomos de nitrógeno, uno correspondiente al grupo imidazol, y el otro a la amina terciaria. La posición apical se encuentra ocupada por un cloruro terminal.

Con Acetatos se logró obtener la estructura que se muestra en la figura 1.7.

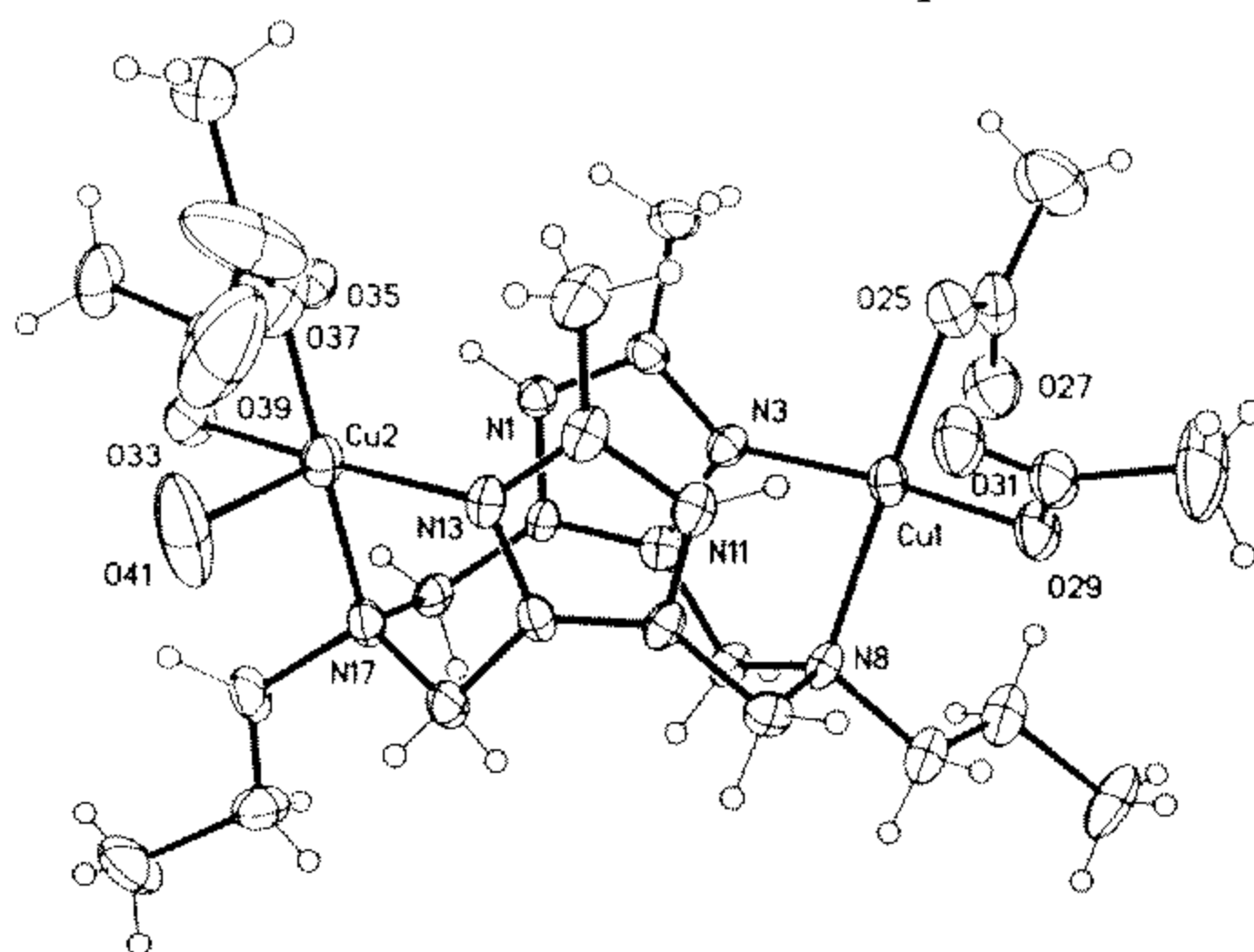


Figura 1.7 Estructura de rayos X del complejo $[Cu_2(AcO)_4(H_2O)(Promeim)]$

En esta estructura los dos átomos de cobre, que se encuentran también en entornos con geometría de pirámide cuadrada distorsionada, no son equivalentes.

Lo más notable de esta estructura es que el anillo diacezinico del ligante se encuentra en configuración de bote, distinta a la configuración de silla que estos anillos han adoptado en todos los demás complejos de la familia caracterizados cristalográficamente.

Glymeim²³

Con este ligante se han obtenido dos compuestos muy semejantes entre sí, $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Glimeim})](\text{ClO}_4)_2$ y $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Glimeim})](\text{NO}_3)_2$. En la figura 1.8 se muestra la estructura cristalina de este último.

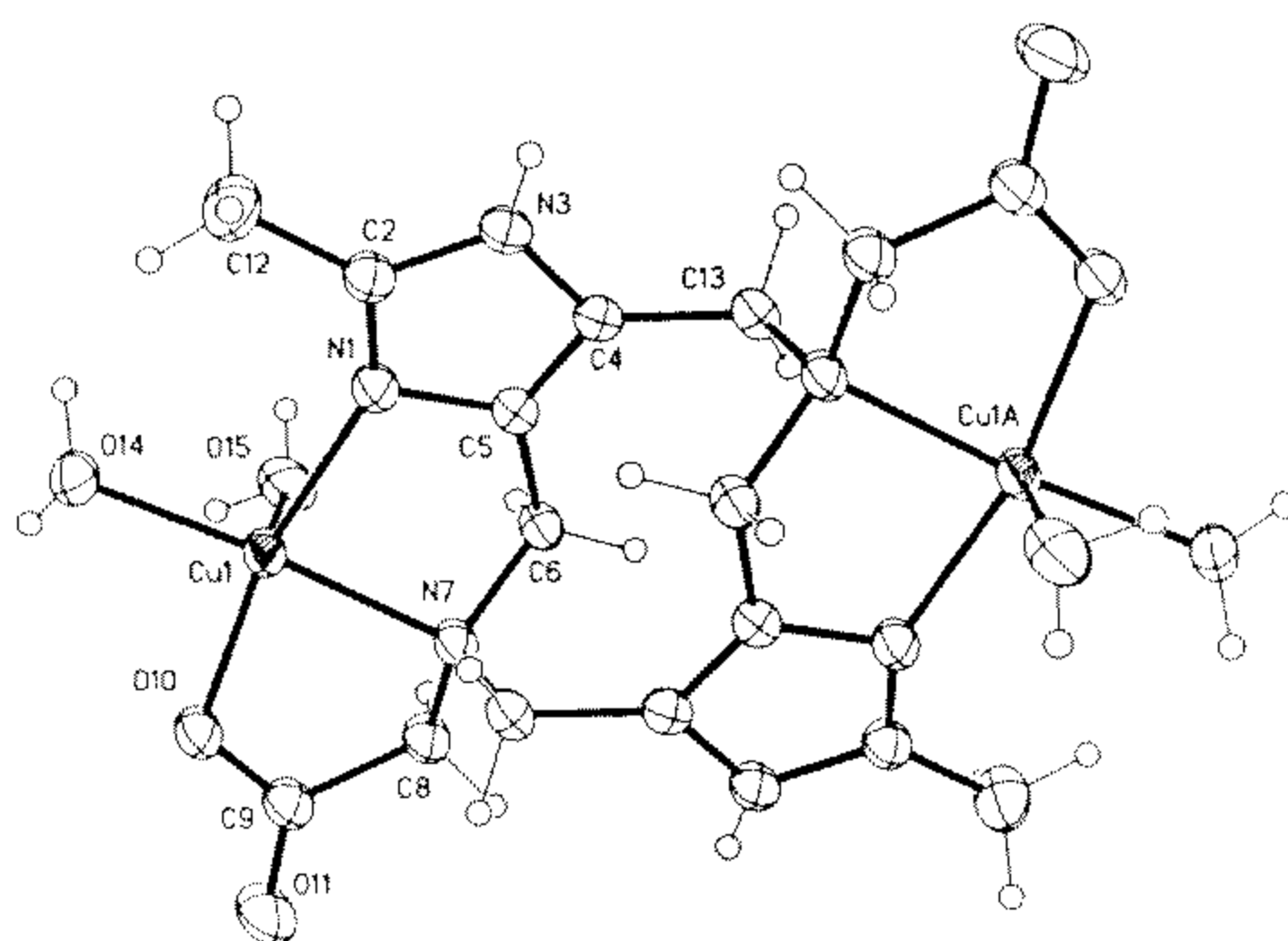


Figura 1.8 Estructura de rayos X del complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Glimeim})](\text{NO}_3)_2$

Los dos cobres se encuentran en entornos muy semejantes, de pirámide cuadrada, aunque por pequeñas diferencias no son cristalográficamente equivalentes. Una molécula de agua ocupa la posición apical y la base de la pirámide está conformada por el nitrógeno del imidazol, el nitrógeno alifático, un átomo de oxígeno del carboxilato, y otra molécula de agua.

Dimeim^{25,28,29}

Con este ligante se han logrado cristalizar varios complejos semejantes al variar el contraión:

$[\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Dimeim})]$, $[\text{Cu}_2(\text{AcO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Dimeim})](\text{AcO})_2$,
 $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Dimeim})](\text{ClO}_4)_4$, $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Dimeim})](\text{BF}_4)_4$ y
 $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Dimeim})](\text{BF}_4)_2$

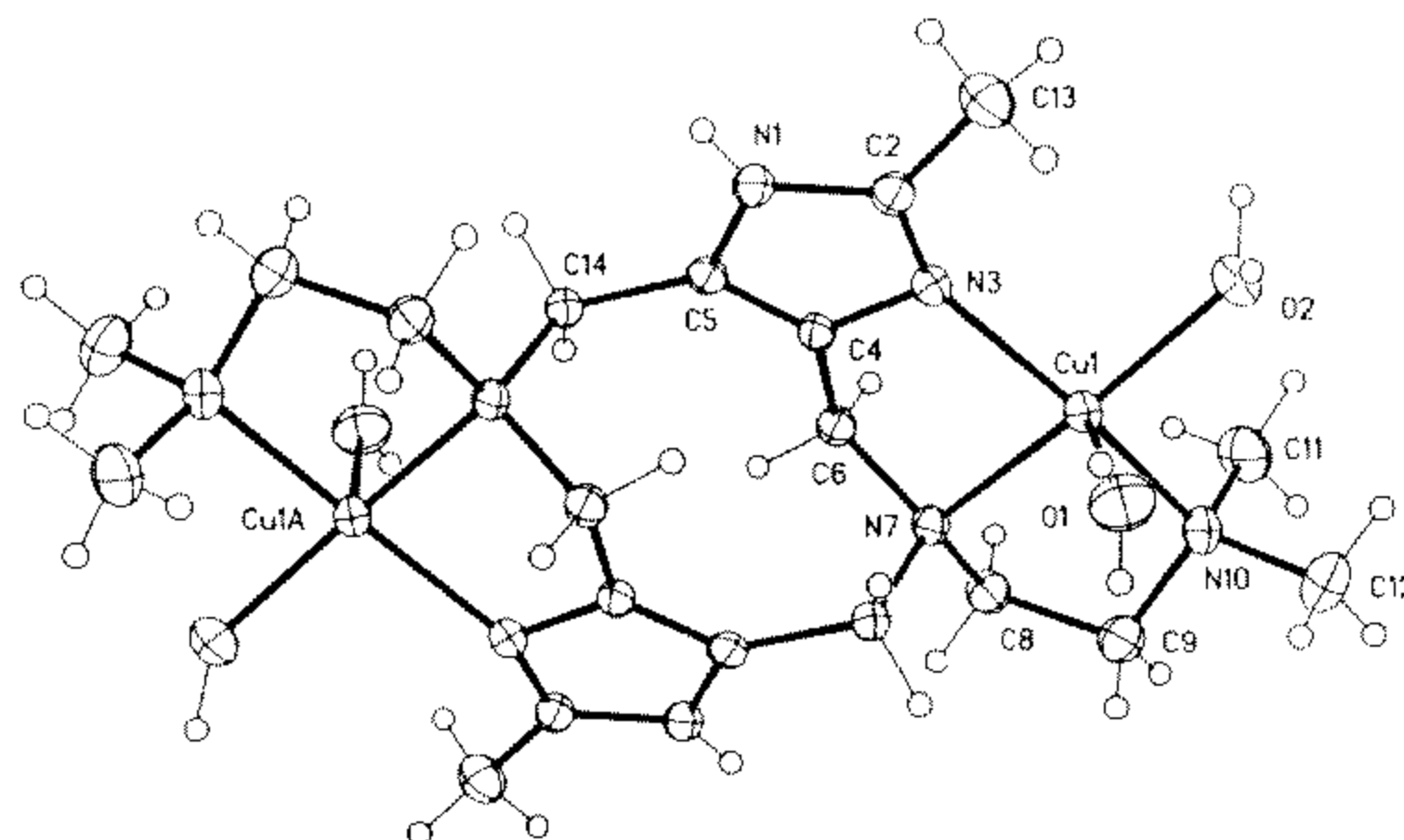


Figura 1.9 Estructura de rayos X del complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Dimeim})](\text{ClO}_4)_4$

En la figura 1.9 se muestra la estructura del catión $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Dimeim})]^{4+}$ obtenido a partir del $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$

En todos estos complejos el entorno de coordinación tiene geometría de pirámide cuadrada distorsionada. En la base de la pirámide se encuentran tres átomos de nitrógeno del ligante y la cuarta posición la ocupa una molécula de agua o un contraión (AcO^- , SO_4^{2-}). La posición apical en todos los casos es ocupada por una molécula de agua.

Es digno de mención que con el anión BF_4^- se lograron obtener dos complejos, $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_4(\text{Dimeim})](\text{BF}_4)_4$, y $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Dimeim})](\text{BF}_4)_2$. El segundo es un producto de hidrólisis del primero y se obtiene a un pH superior. También se encontraron evidencias de la formación de la especie hidrolizada mediante la determinación potenciométrica de las constantes de formación de estos complejos.

2.- *Objetivos*

Objetivo general

➤ Sintetizar, caracterizar y estudiar la actividad catalítica del complejo dinuclear de cobre [Cu₂Dimp] obtenido a partir de un ligante del tipo cerrado derivado de imidazol y piridina, en la oxidación del 3,5-di-*ter*-butil catecol.

Objetivos particulares

➤ Sintetizar el ligante Dimp por medio de una reacción de Mannich, utilizando como reactivos: el 2-metilimidazol, la 2-aminometilpiridina y el formaldehído.

➤ Caracterizar el ligante Dimp mediante las técnicas espectroscópicas de infrarrojo, RMN ¹H, ¹³C, espectrometría de masas, análisis elemental y potenciometría.

➤ Sintetizar el complejo dinuclear de cobre [Cu₂Dimp].

➤ Caracterizar el [Cu₂Dimp] en estado sólido por medio de rayos X, IR y análisis elemental.

➤ Caracterizar el [Cu₂Dimp] en disolución mediante potenciometría.

➤ Evaluar la actividad catalítica del complejo [Cu₂Dimp] en la reacción de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol.

3.- Resultados y discusión

3.1 Síntesis y caracterización del ligante Dimp

3.1.1 Síntesis

El ligante 2,8-dimetil-5,11-di-(2-metilpiridina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]-imidazo[4,5-c][1,6] diazecina (Dimp) se sintetizó por medio de una reacción de Mannich en medio básico que permite la aminometilación del anillo imidazólico por la condensación de formaldehído y aminas (figura 3.1).

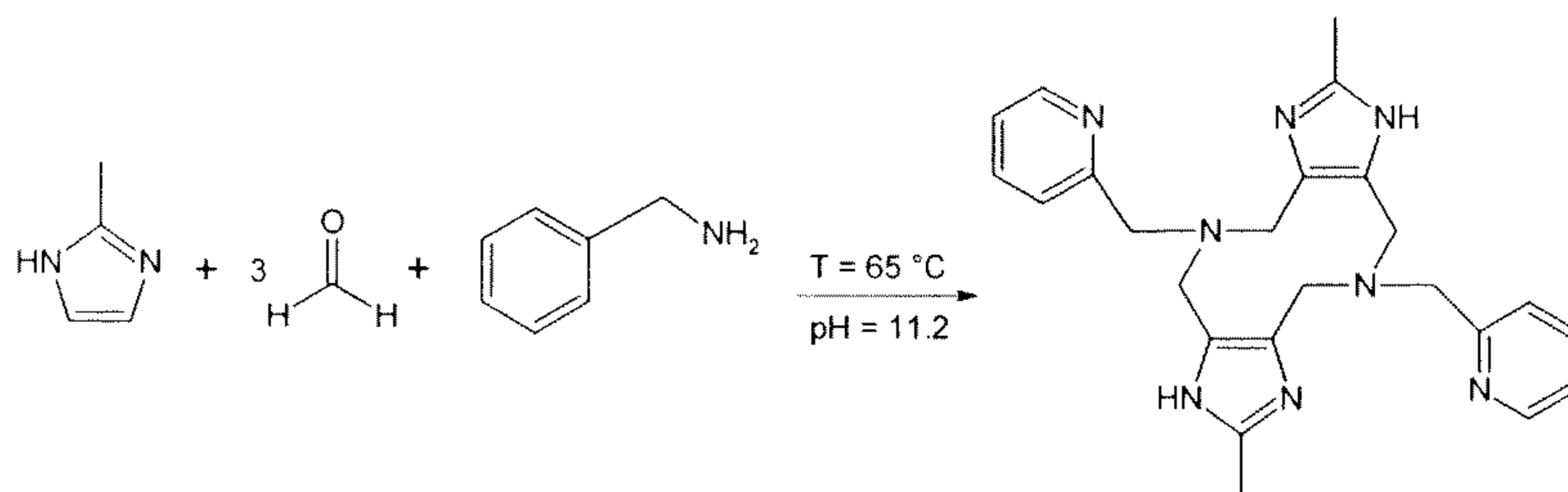


Figura 3.1 Reacción de Mannich para la síntesis del ligantes Dimp

Para la obtención del ligante se mezclan 1eq de 2-metil imidazol previamente disuelto en agua, con 1eq de 2-aminometilpiridina, la cual se agrega gota a gota. Esta disolución se mantiene en agitación hasta observar una mezcla homogénea, a la cual se le agregan 3eq de formaldehído (50% de exceso), se homogeniza, y se lleva hasta un $\text{pH}=11.2$ con una disolución de KOH. El volumen final de la mezcla es de aproximadamente 100mL. Esta mezcla se coloca en un baño de aceite a 65°C con agitación por 90 horas. Después del tiempo de reacción, se obtiene el compuesto Dimp como producto un sólido blanco.

3.1.2 Análisis Elemental

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje experimental y teórico de los elementos carbono, hidrógeno y nitrógeno, también se presenta el porcentaje de error de cada elemento, obtenido en el análisis elemental.

Elemento	%Experimental	%Teórico	%Error
C	57.69	57.58	0.19
N	22.08	22.38	-1.36
H	7.32	7.25	0.96

Tabla 3.1 Análisis elemental para el Dimp • 4H₂O (C₂₄H₄₀N₈O₄)

3.1.3 Espectroscopía de Infrarrojo

En la figura 3.2 se muestra el espectro de IR que se obtuvo para el ligante Dimp, utilizando pastillas de KBr.

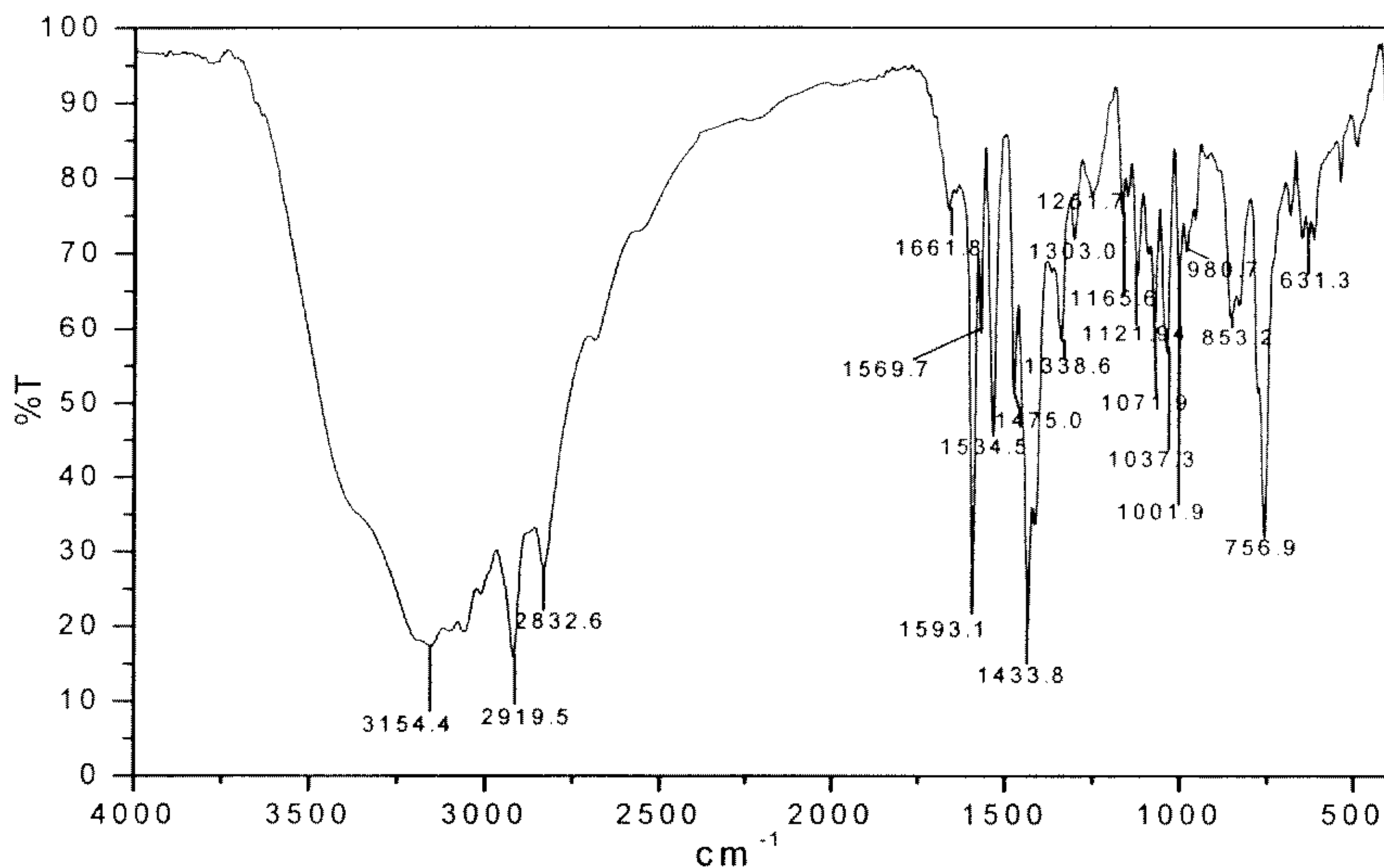


Figura 3.2 Espectro de IR del ligante Dimp

En la Tabla 3.2 se muestran las bandas características del ligante Dimp observadas en el espectro de IR.

Grupo	Bandas (cm ⁻¹)
-CH ₃ , -CH ₂	2919.5, 2832.6
-C-H de la piridina	3154.4, 756.9
-C=C de la piridina	1433.9
-N-H del imidazol	1593.2
-C=C del imidazol	1569.7, 1534.5
-N=C del imidazol	1661.8
-N-C del imidazol	1475.0
-N-C amina alifática	1251.7

Tabla 3.2 Principales bandas obtenidas en el espectro de IR para el ligante Dimp

Las bandas -N=C y -N-C del imidazol libre aparecen en 1624 y 1460 cm⁻¹ respectivamente³⁰.

3.1.4 Espectroscopía de RMN ¹H

El análisis de la muestra se hizo utilizando como disolvente D₂O a la cual se le agregaron unas gotas DCl para lograr que se disolviera. En la figura 3.3 se presenta el espectro de RMN ¹H para el ligante Dimp.

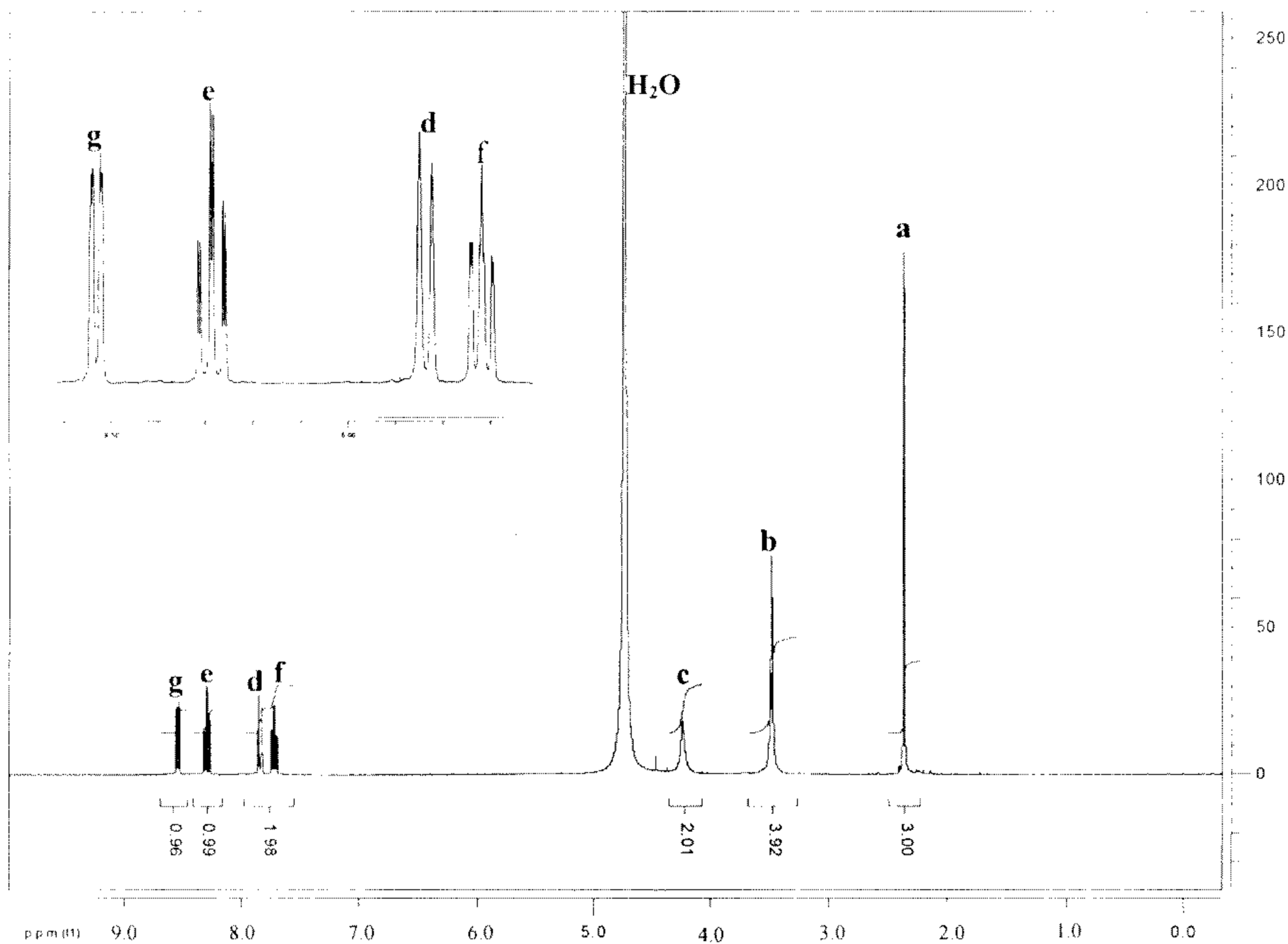
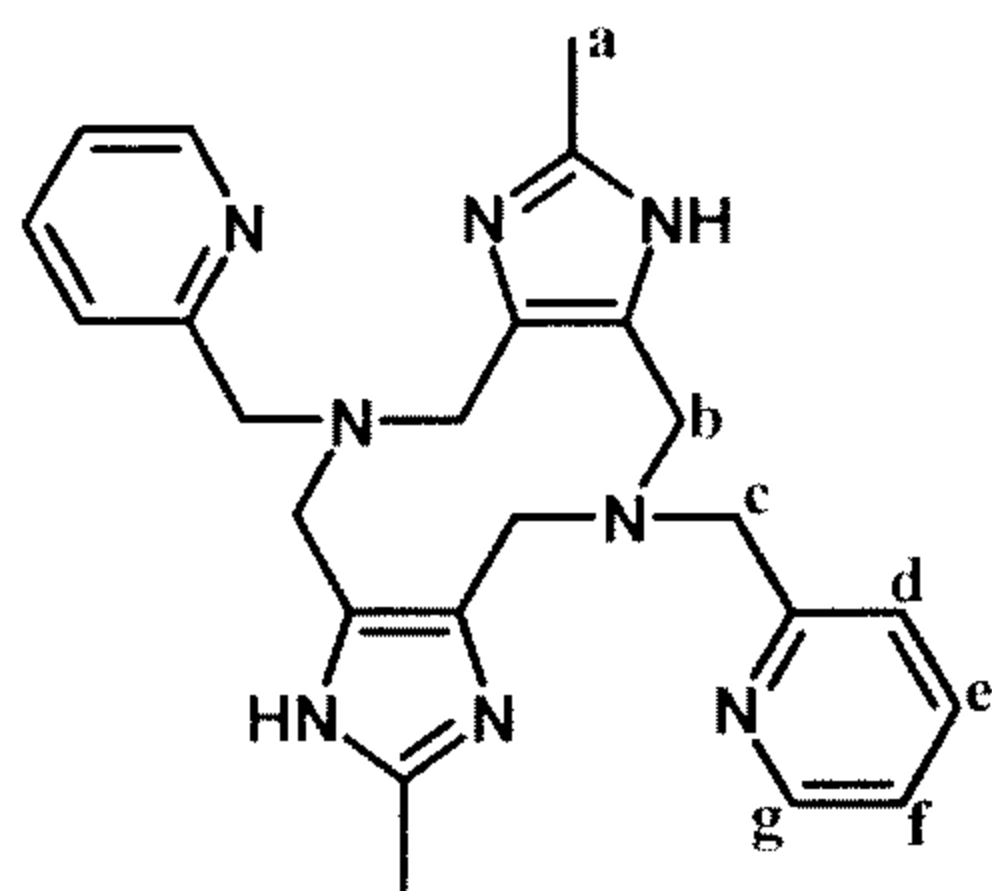


Figura 3.3 Espectro de RMN ^1H del ligante Dimp

En el espectro se observan 7 tipos de protón de los cuales cuatro señales corresponden a los protones de la piridina (protón d, e, f, g) las otras tres señales pertenecen al metilo del imidazol (protón a), una al metileno proveniente de la condensación del formaldehído y el imidazol (protón b), y otra al metileno de la 2-aminometil piridina (protón c). El protón de la amina secundaria del imidazol no se observa, debido a que éste se intercambia con deuterio.

En la siguiente tabla 3.3 se muestran los desplazamientos de cada protón, la multiplicidad y la integral de cada uno.



Protón	δ (ppm)	Integral	Multiplicidad
a	2.3	3	Singulete
b	3.4	4	Singulete
c	4.2	2	Singulete
d	7.9	1	Triplete dobleteado
e	8.3	1	Doblete
f	7.7	1	Triplete dobleteado
g	8.5	1	Doblete dobleteado

Tabla 3.3 Señales de RMN ^1H del ligante Dimp

Debido a que el Dimp es una molécula simétrica la integración de las señales del espectro de RMN ^1H son la mitad del valor real.

3.1.5 Espectroscopia de RMN ^{13}C

El espectro se obtuvo utilizando como disolvente $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$. En la Figura 3.4 se presenta el espectro de RMN ^{13}C para el ligante Dimp.

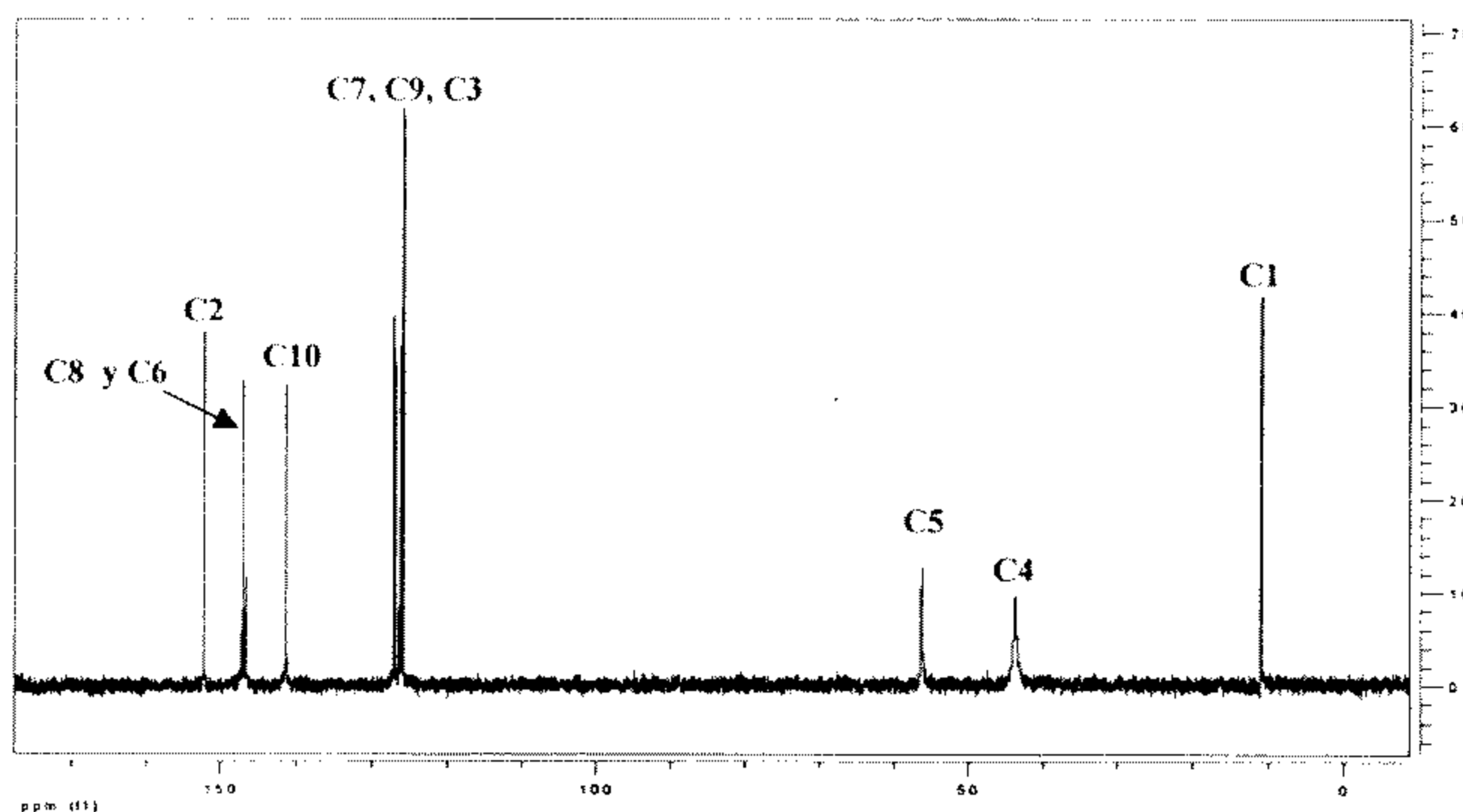


Figura 3.4 Espectro de RMN ^{13}C del ligante Dimp

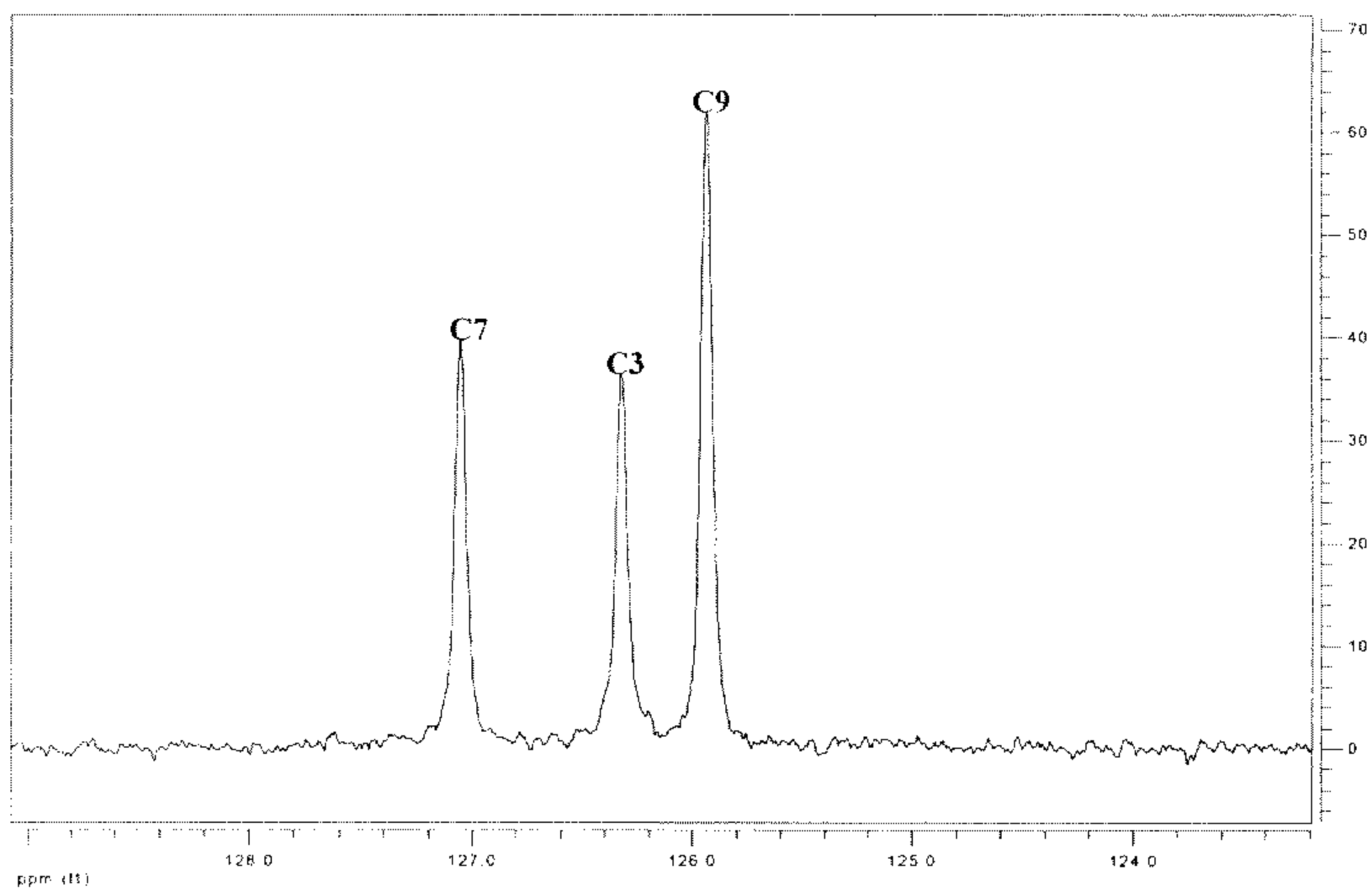


Figura 3.5 Expansión del espectro de RMN ^{13}C del ligante Dimp

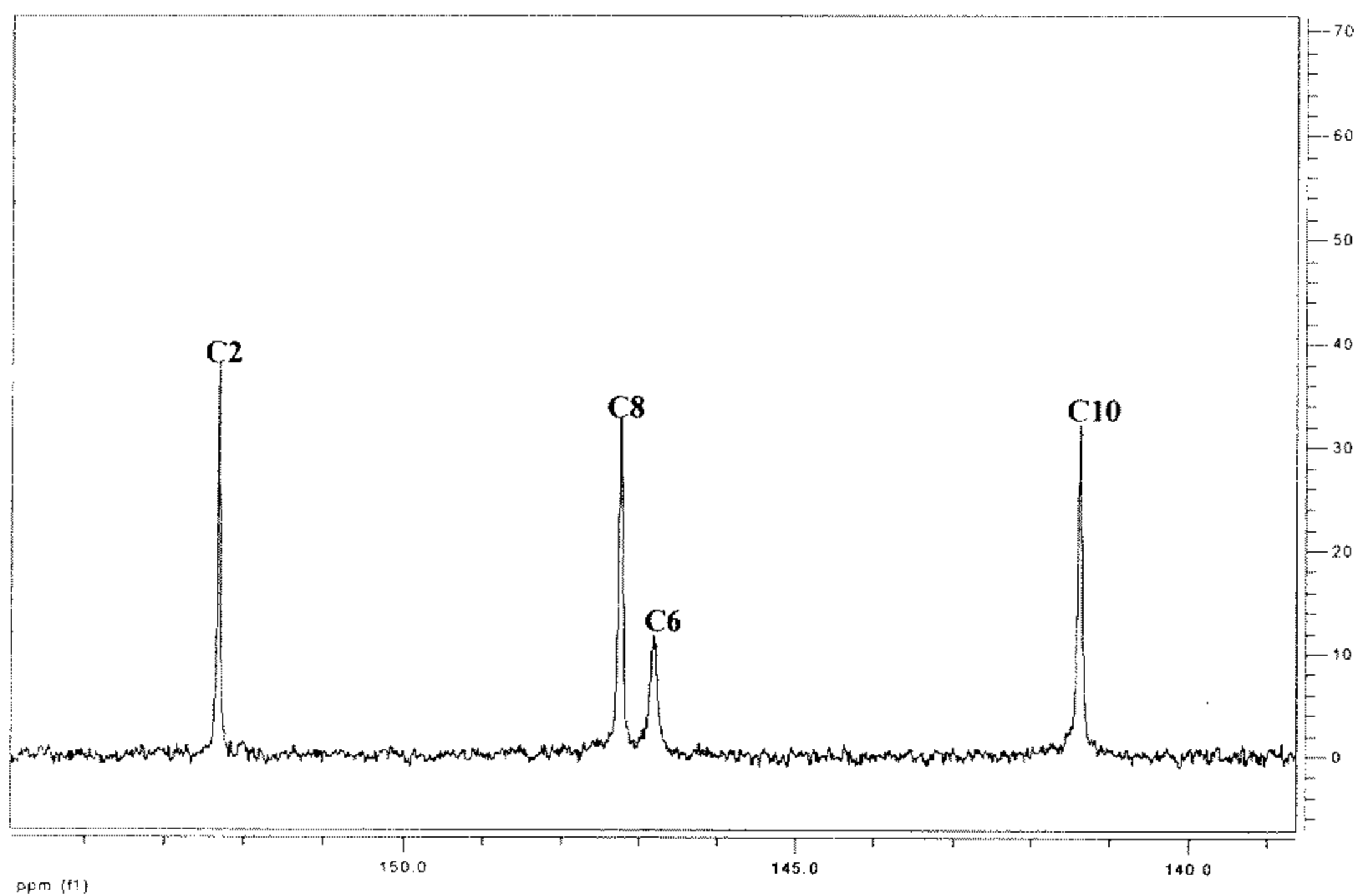
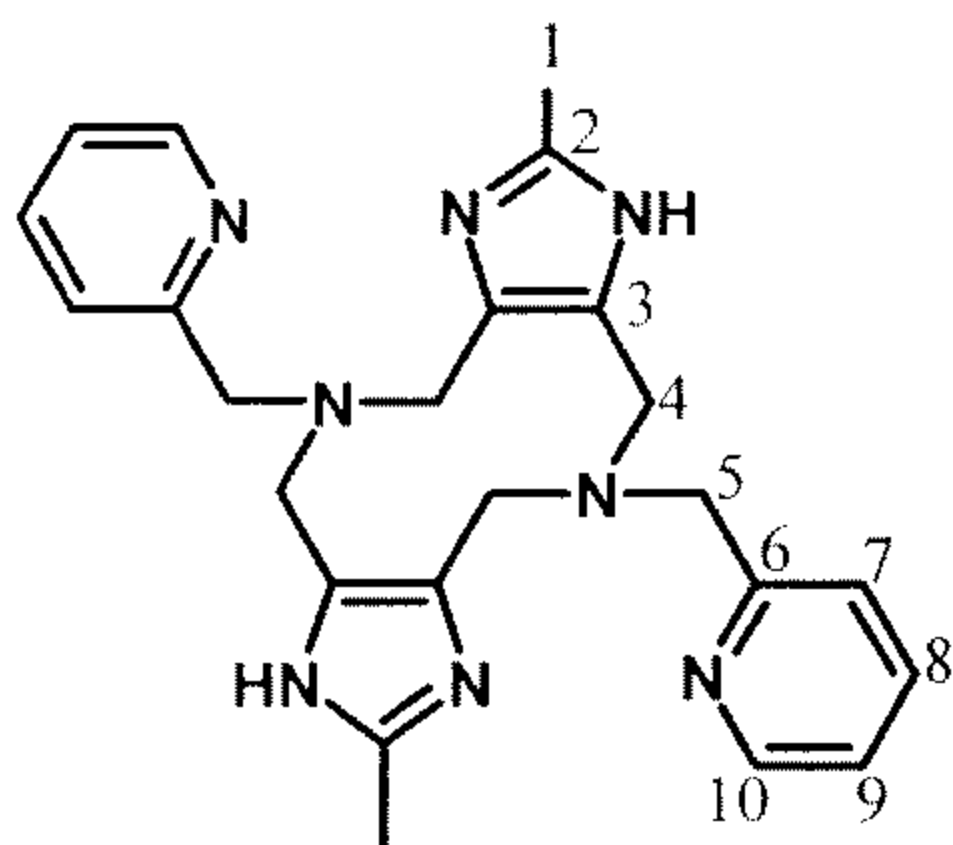


Figura 3.6 Expansión del espectro de RMN ^{13}C del ligante Dimp

La estructura del ligante Dimp es simétrica por lo cual sólo se observan diez señales en el espectro de RMN ^{13}C , una señal pertenece al metilo del imidazol (carbono 1), una al carbono proveniente de la condensación del formaldehído y el imidazol (carbono 4), 5 señales pertenecen al anillo de la piridina (carbonos 6, 7, 8, 9 y 10), dos señales a los carbonos del imidazol (carbonos 2 y 3) y otra señal al carbono α a la amina que une a la piridina con ésta (carbono 5).

En la siguiente tabla se muestran los desplazamientos químicos y el tipo de carbono al que pertenecen.



Carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono
1	11.0	Primario
2	152.3	Cuaternario
3	125.9	Cuaternario
4	43.8	Secundario
5	56.2	Secundario
6	146.8	Cuaternario
7	127.0	Terciario
8	147.3	Terciario
9	126.3	Terciario
10	141.4	Terciario

Tabla 3.4 Señales de RMN ^{13}C del ligante Dimp

La región alifática indica la correlación de cada núcleo de carbono con un núcleo de hidrógeno, con lo que se puede afirmar que los protones con desplazamientos químicos en 2.3, 3.4 y 4.2, protones a, b, c, se acoplan con los carbonos 1, 4 y 5, respectivamente. Los protones a, b y c presentan una multiplicidad de un singulete lo cual indica que no hay núcleos vecinos con los cuales se estén acoplando.

En la región aromática (figura 3.8) se observa acoplamiento para cada uno de los núcleos de carbono 7, 8, 9 y 10 con su correspondiente núcleo de hidrógeno d, e, f y g con desplazamientos químicos en 7.9, 8.3, 7.7 y 8.5, los cuales corresponden al anillo de la piridina.

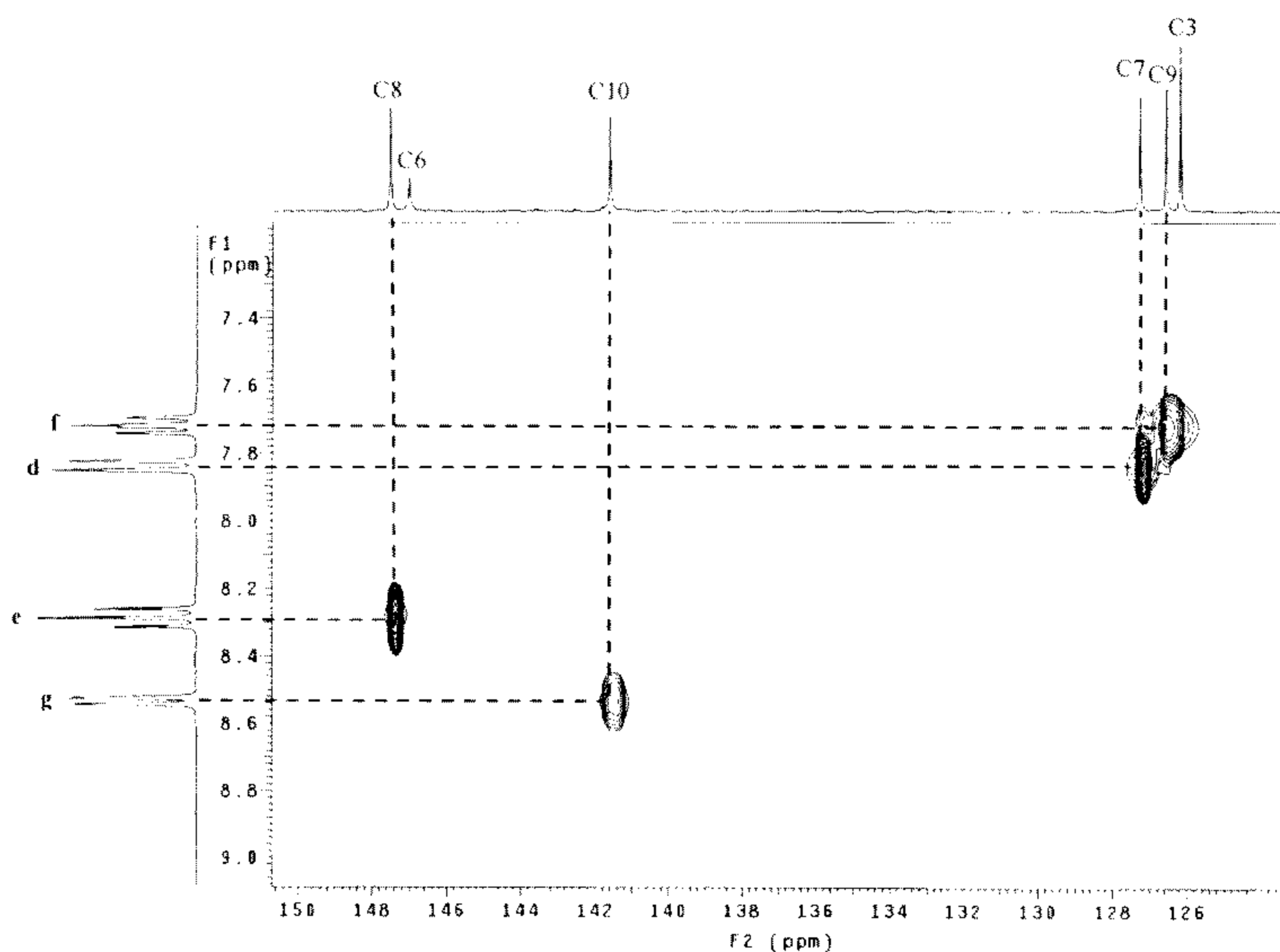


Figura 3.8 Expansión de la región aromática del espectro HETCOR del ligante Dimp

3.1.7 Experimento COSY

El estudio COSY muestra acoplamientos H-H.

Con el objeto de asignar cada uno de los protones de la piridina, los cuales presentan multiplicidades diferentes a un singulete se realizó un experimento de correlación homonuclear COSY, el cual se muestra en las figuras 3.9.

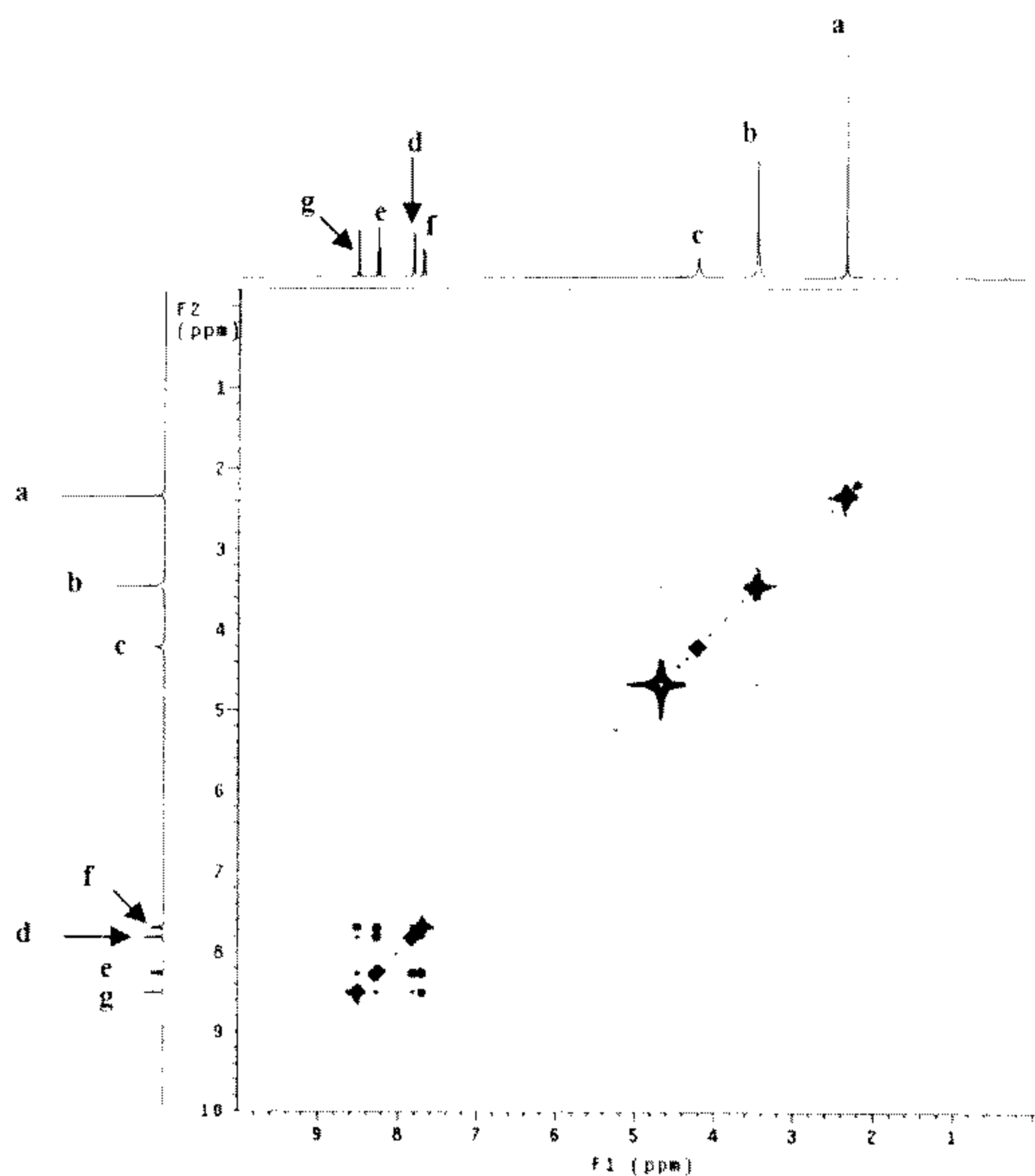


Figura 3.9 Espectro COSY del ligante Dimp

La asignación de los protones aromáticos con los desplazamientos químicos se hizo en base a la multiplicidad que presentan las señales y el acoplamiento observado en el espectro.

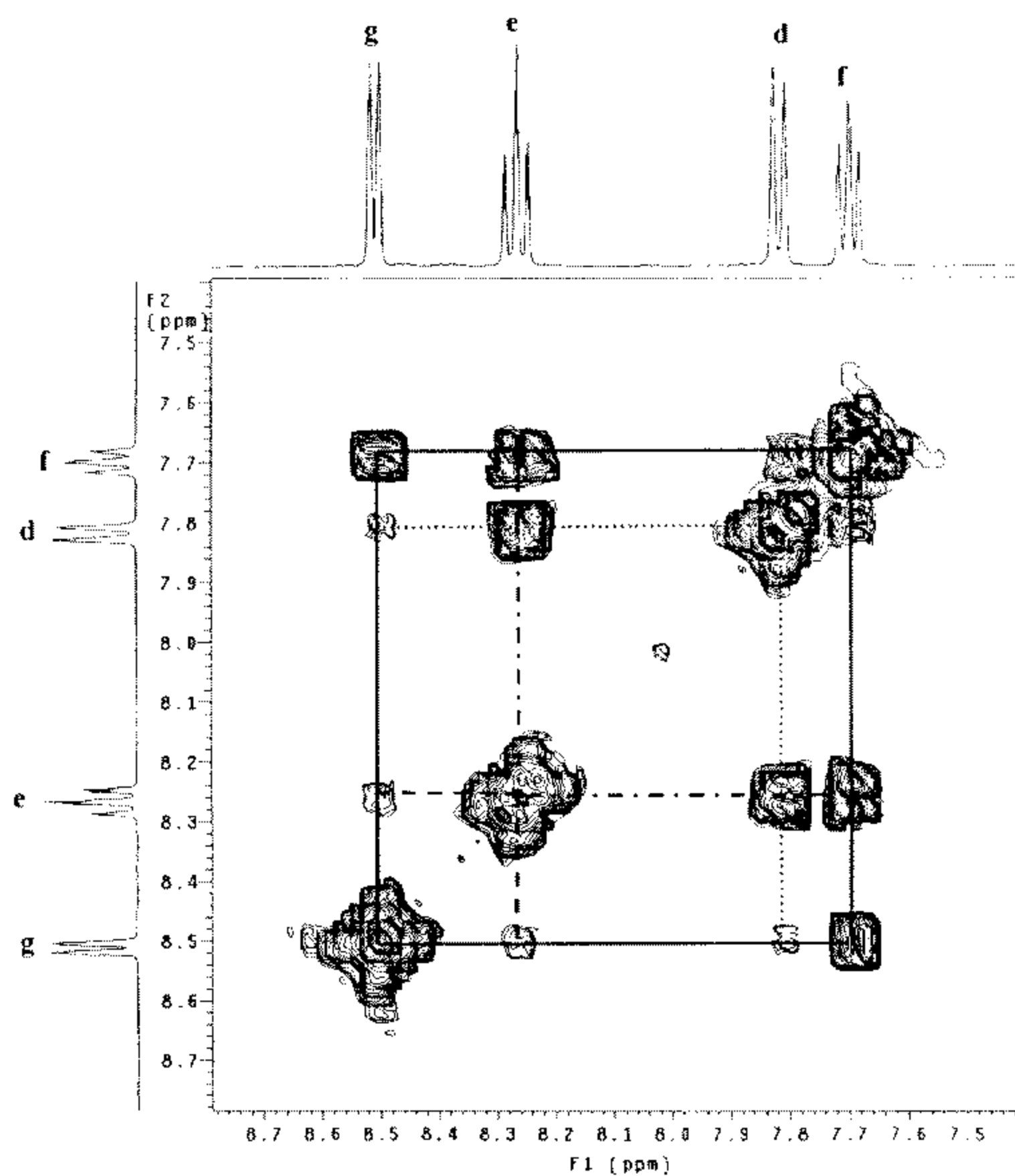


Figura 3.10 Expansión de la región aromática del espectro COSY del ligante Dimp

En la expansión de la región aromática (figura 3.10) se puede observar que existe un fuerte acoplamiento entre el protón *f* (con multiplicidad de un triplete dobleteado y δ 7.7) y los protones *g* y *e*, el protón *d* (con multiplicidad de un triplete dobleteado y δ 7.9) presenta un fuerte acoplamiento con el protón *e* y un acoplamiento débil con el protón *g*, el protón *e* (con multiplicidad de un doblete y δ 8.3) como ya se mencionó presenta un fuerte acoplamiento con los protones *d* y *f*, y un débil acoplamiento con el protón *g*, por último también se observa que el protón *g* (con multiplicidad de un doblete dobleteado y δ 8.5) se está acoplando fuertemente con el protón *f* y débilmente con los protones *d* y *e*.

3.1.8 Espectrometría de masas

En la figura 3.11 se muestra el espectro de masas para la molécula Dimp que se obtuvo empleando el método de ionización FAB⁺, utilizando como matriz alcohol nitrobenílico. En el espectro aparece la señal del ión (M⁺⁺1) en m/z = 429 que corresponde con el patrón isotópico de C₂₄H₂₈N₈. También se observan las señales (M+1) en m/z = 215 y 858 las cuales corresponden a la fragmentación de la mitad de la molécula Dimp y al dímero de ésta.

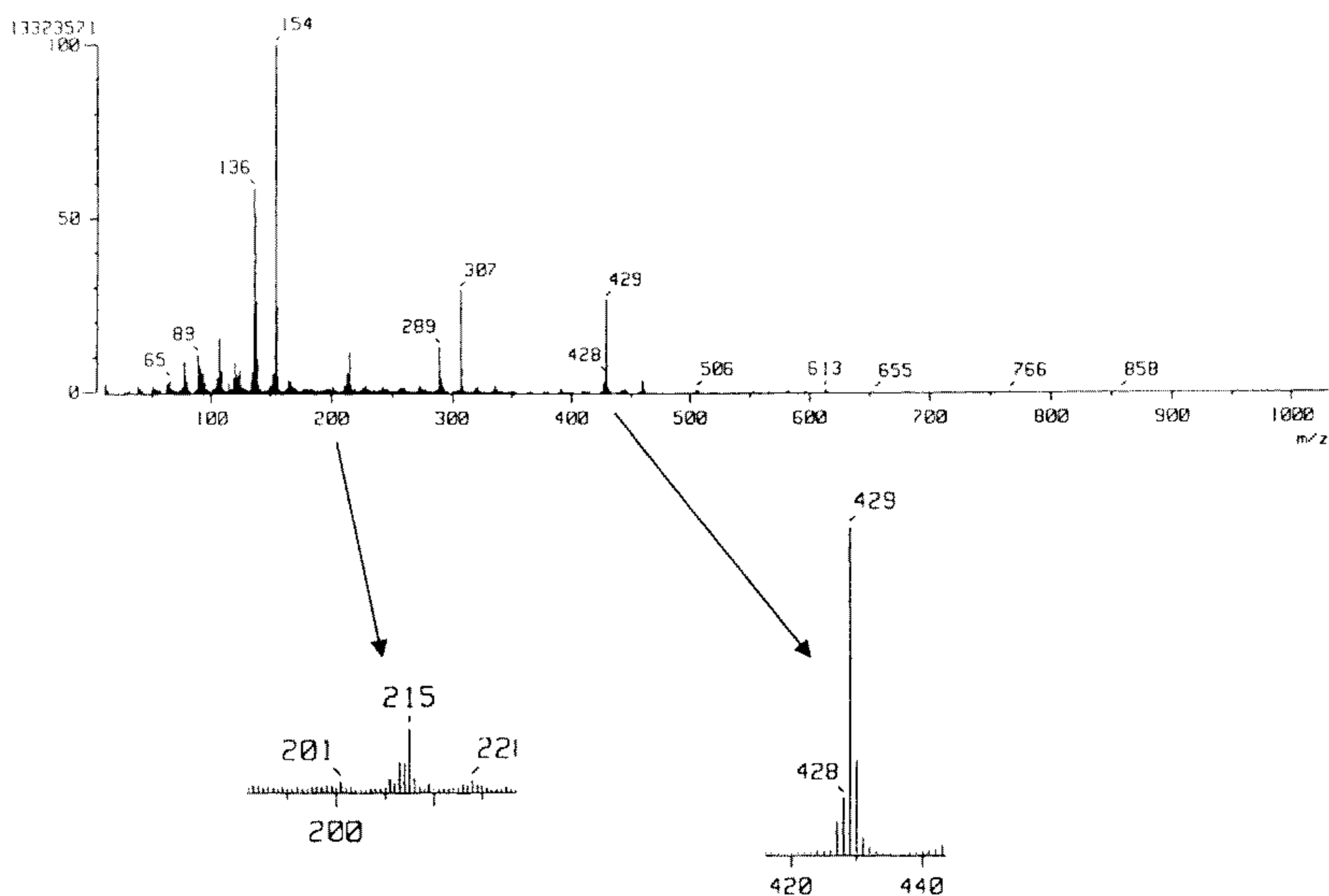


Figura 3.11 Espectro de masas del ligante Dimp

3.2 Síntesis y caracterización del complejo [Cu₂(H₂O)₄Dimp](ClO₄)₄

3.2.1 Síntesis

Con el ligante Dimp es posible obtener compuestos dinucleares de cobre(II). El siguiente esquema muestra la reacción que se llevó a cabo para la formación del complejo.

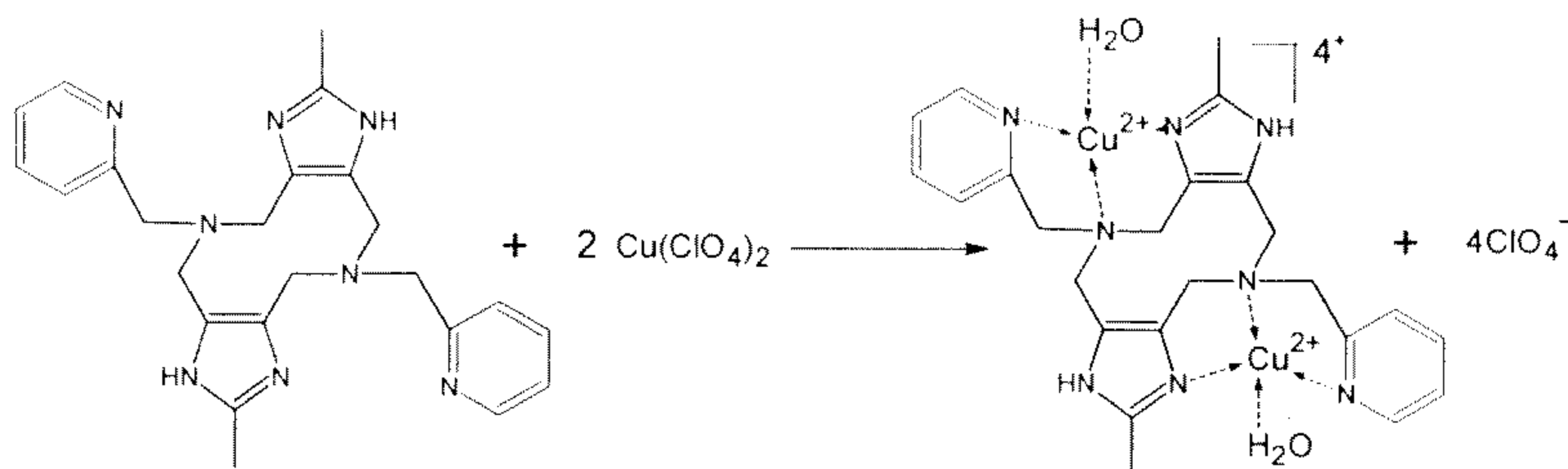


Figura 3.12 Esquema de reacción para la obtención del complejo [Cu₂Dimp(H₂O)₂](ClO₄)₄

La síntesis se llevó a cabo en una mezcla MeCN:H₂O, 1:1, en la cual se disolvieron 2 eq. de Cu(ClO₄)₂•6H₂O en aproximadamente 5 mL de mezcla, a esta disolución se le agregó 1 eq. del ligante Dimp.

El ligante se agregó en forma de suspensión en MeCN:H₂O, gota a gota y con agitación constante hasta observar una mezcla homogénea.

La mezcla se dejó aproximadamente por 10 días y de ella se obtuvieron cristales del tamaño adecuado para su estudio por difracción de rayos X.

Los cristales que se obtuvieron tienen una forma de prisma rectangular de color azul rey.

3.2.2 Análisis elemental

En la tabla 3.5 se presentan los porcentajes teóricos y experimentales así como los errores porcentuales, del análisis de los elementos nitrógeno, carbono e hidrógeno, para el compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$.

ELEMENTO	%EXPERIMENTAL	%TEÓRICO	%ERROR
C	28.05	28.11	0.21
N	10.75	10.93	1.67
H	3.63	3.54	2.48

Tabla 3.5 Análisis elemental para el compuesto $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Dimp}](\text{ClO}_4)_4$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_{18}\text{Cl}_4\text{Cu}_2$)

3.2.3 Espectroscopía de infrarrojo

Para obtener el espectro IR se utilizó la técnica de pastilla de KBr. En la figura 3.13 se muestra el espectro de IR obtenido para el $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})\text{Dimp}]^{4+}$.

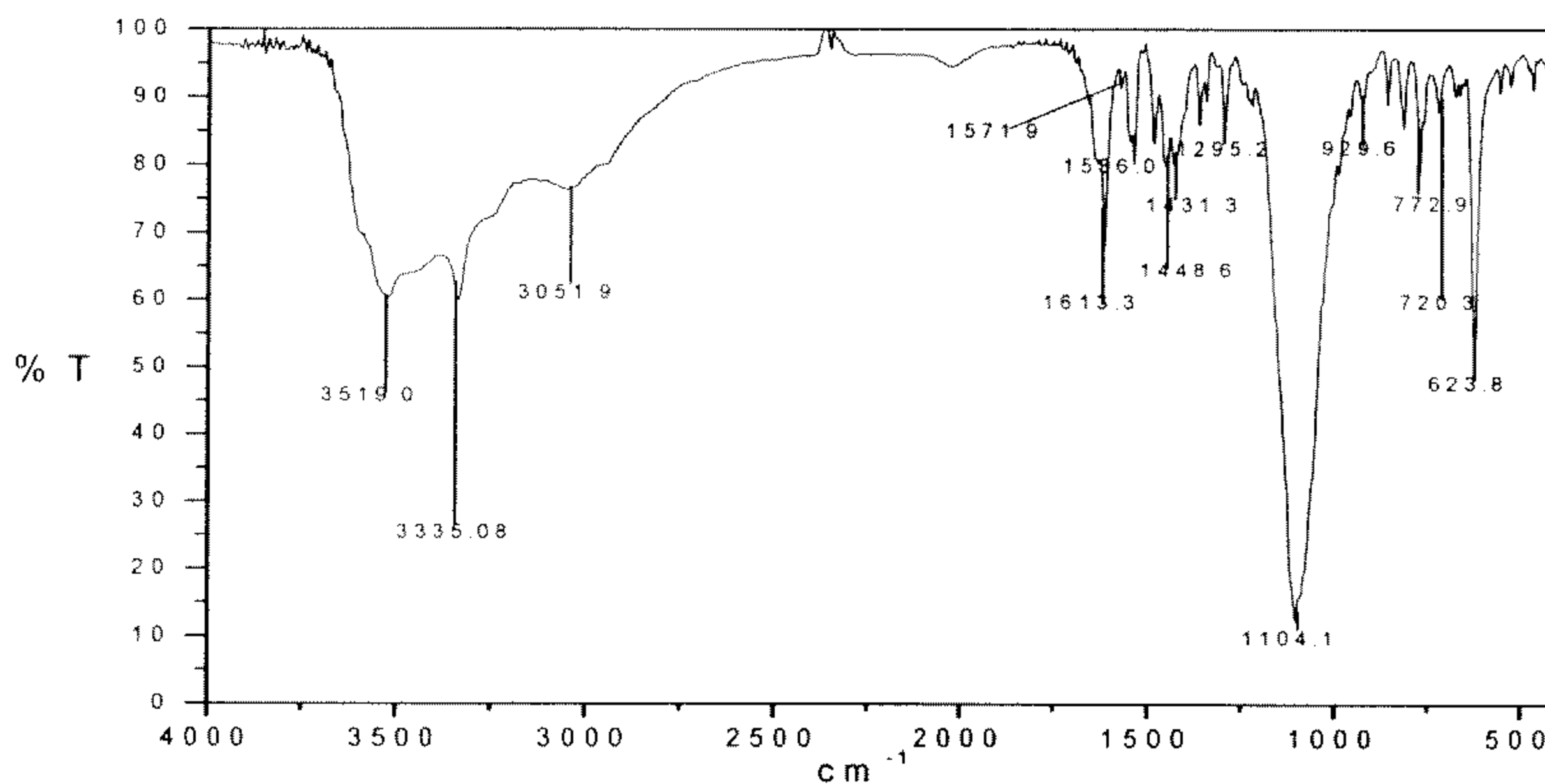


Figura 3.13 Espectro de IR del complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$

En la tabla 3.6 se muestran las bandas características del complejo de Cu^{2+} observadas en el espectro.

Grupo	Bandas (cm^{-1})
-C-H de la piridina	3051.99, 772.91
-C=C de la piridina	1431.35
-C=C del imidazol	1571.99, 1536.07
-N=C del imidazol	1613.33
-N-C del imidazol	1448.66
-N-C amina alifática	1295.26
ClO_4^-	1104.13, 929.59

Tabla 3.6. Principales bandas obtenidas en el espectro de IR para el complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$.

En este espectro no se observan las bandas características del $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, debido a que estas se encuentran inmersas en la banda ancha del H_2O . Por otra parte, en este espectro de IR se observan dos bandas asignadas al perclorato; en la literatura³⁰ se menciona que los percloratos iónicos presentan dos bandas, una en el intervalo de 1170 a 1050 cm^{-1} y otra débil cerca de 935 cm^{-1} .

3.2.4 Conductividad

Para medir la conductividad se hizo una disolución del compuesto en agua con una concentración 1E-03M a 25°C, obteniéndose un valor de 602 $\mu\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

Sabiendo que el perclorato es un anión muy poco coordinante en disolución, podríamos esperar para nuestro complejo, un comportamiento de electrolito 1:4.

El valor obtenido está ligeramente por arriba del intervalo de conductividad reportado para este tipo de electrolitos, que es de 560 $\mu\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$ ³¹. Esto puede

atribuirse al carácter ácido que posee el complejo dinuclear, que como se verá en la sección 3.3.2, se hidroliza parcialmente de acuerdo a la reacción:



La presencia de aún una pequeña fracción de iones H^+ en la disolución puede causar un incremento considerable en el valor observado de la conductividad, debido a la gran movilidad de estos iones.

3.2.5 Difracción de rayos X

Como se mencionó al describir la síntesis (sección 3.2.1) de este compuesto, se obtuvieron cristales de calidad cristalográfica para los cuales se determinó la estructura molecular y cristalina, en estado sólido, por medio de difracción de rayos X.

En la tabla 3.7 se presentan los datos cristalográficos obtenidos para el complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Dimp}] (\text{ClO}_4)_4$.

Fórmula Empírica	$\text{C}_{24} \text{H}_{32} \text{Cl}_4 \text{Cu}_2 \text{N}_8 \text{O}_{18}$
Masa molar	989.46
Tamaño del cristal	0.6 x 0.3 x 0.3 mm
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	$P-1$
Dimensiones de la celda unitaria	$a = 7.3350(10) \text{ Å}$ $\alpha = 85.160(10)$ $b = 11.4580(10) \text{ Å}$ $\beta = 77.120(10)$ $c = 14.0490(10) \text{ Å}$ $\gamma = 81.230(10)$
Volumen	1136.0(2) Å ³
Z	1
Densidad calculada	1.446 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	1.242 mm ⁻¹
F(000)	502

Tabla 3.7 Datos cristalográficos obtenidos para el compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2] (\text{ClO}_4)_4$

Las principales distancias y ángulos de enlace se muestran en las tablas 3.8 y 3.9 respectivamente. En la figura 3.14 se presentan estructuras de rayos X del compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2$

Cu(1)-O(1W)	1.970(4)
Cu(1)-N(3)	1.990(4)
Cu(1)-N(1)	1.992(4)
Cu(1)-N(2)	2.071(4)
Cu- perclorato	2.546

Tabla 3.8 Distancias de enlace del compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$

O(1W)-Cu(1)-N(3)	99.8(2)
O(1W)-Cu(1)-N(1)	95.45(19)
N(3)-Cu(1)-N(1)	164.71(18)
O(1W)-Cu(1)-N(2)	174.1(2)
N(3)-Cu(1)-N(2)	83.16(17)
N(1)-Cu(1)-N(2)	81.64(17)

Tabla 3.9 Ángulos de enlace del compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$

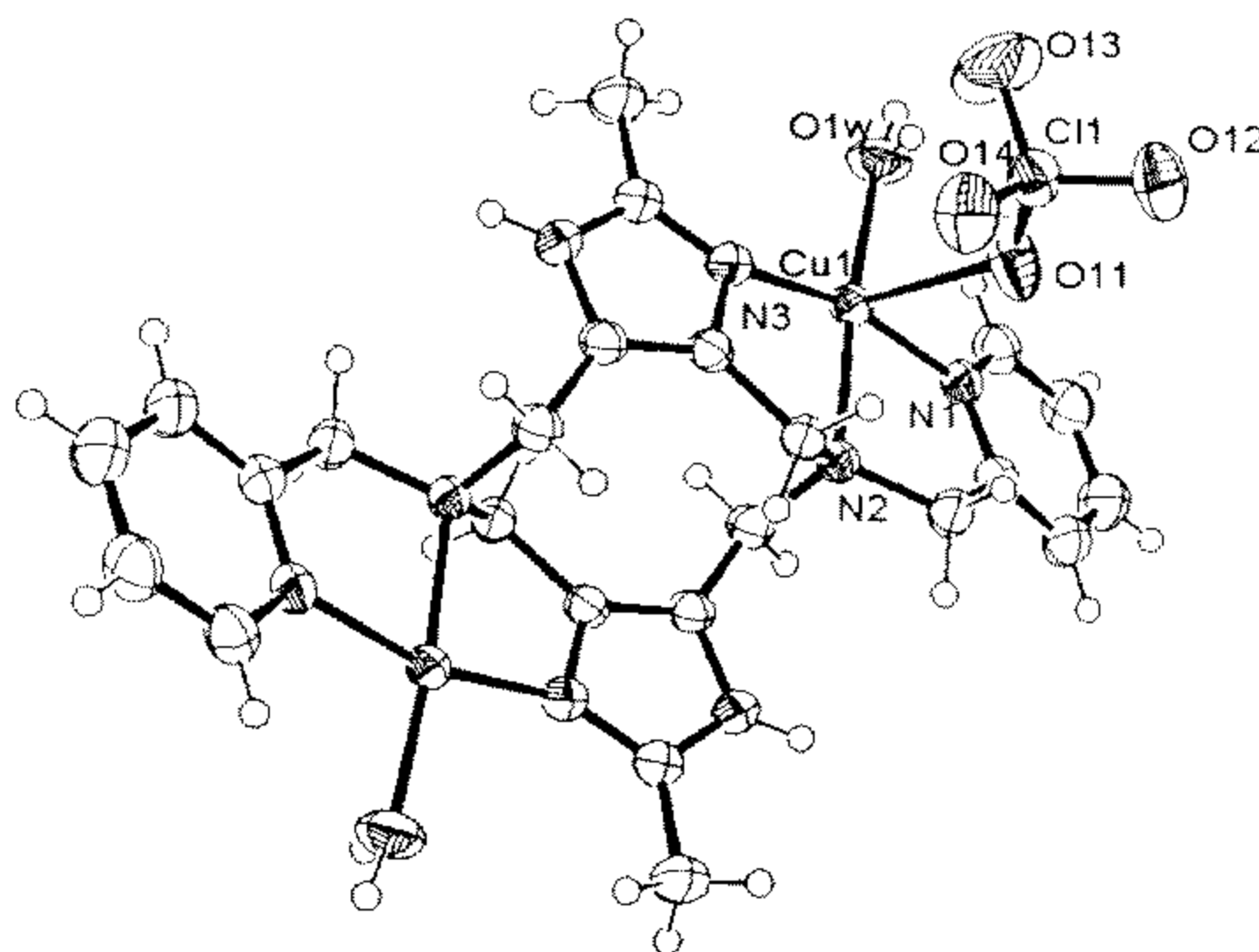


Figura 3.14 Estructura de rayos X del compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$.

De acuerdo con los datos presentados se puede observar que los átomos de cobre se encuentran en entornos de coordinación equivalentes, en una geometría tetragonal con interacciones axiales débiles. Los átomos donadores coordinados a los átomos de cobre son los nitrógenos del ligante Dimp (N- de la piridina, N-amina terciaria y N-imidazol), y una molécula de agua que ocupa la cuarta posición. En las posiciones axiales se encuentra dos iones perclorato a una distancia de enlace mayor que la de los otros átomos coordinados, como se suele esperar en los compuestos de cobre (II) por efecto de Jahn Teller. Cada ion perclorato se encuentra puenteando a un cobre de una molécula Cu_2Dimp , con el cobre de otra molécula. En la figura 3.15 se muestra el arreglo cristalino.

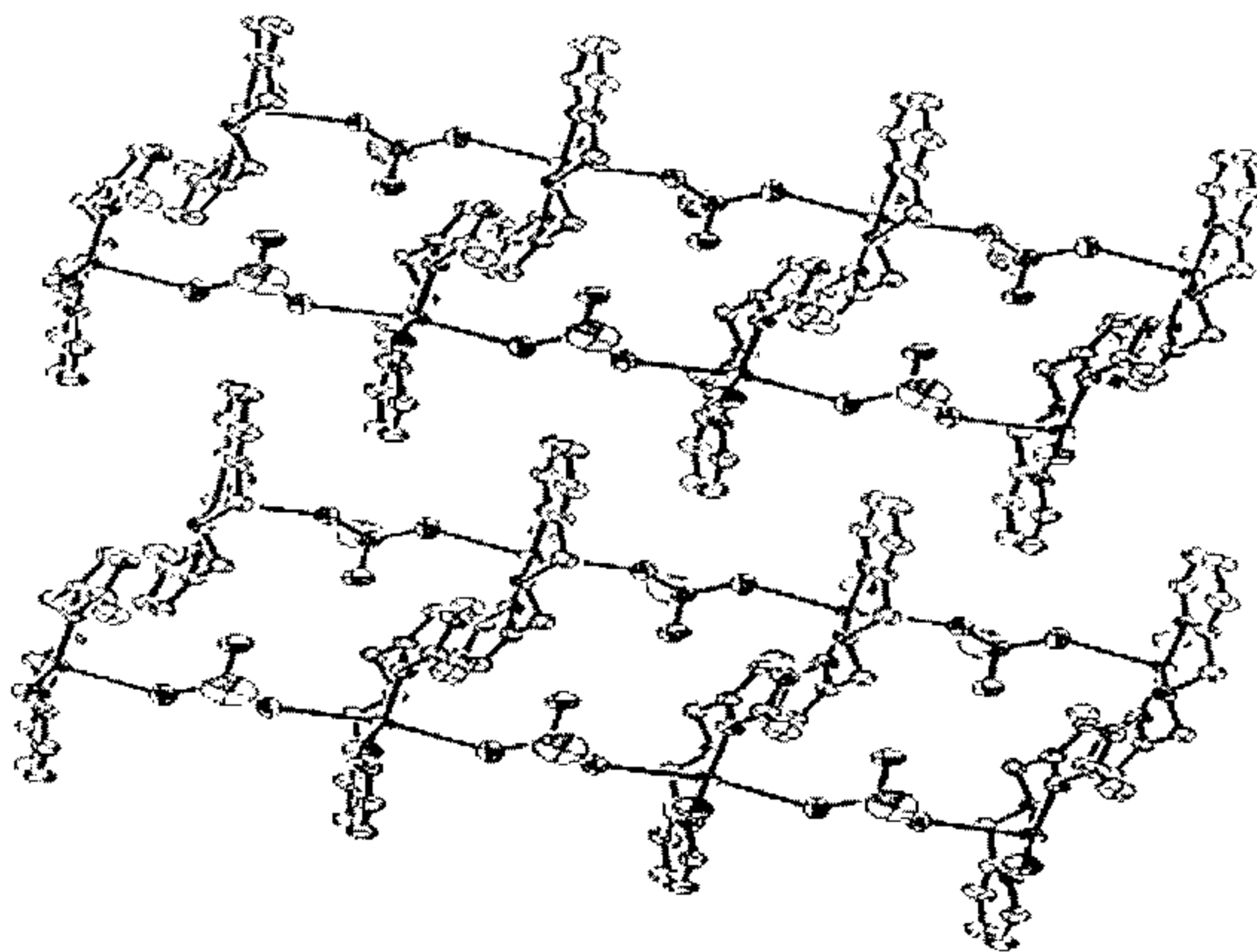


Figura 3.15 Arreglo cristalino del compuesto $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$

3.2.6 Momento magnético

El momento magnético efectivo de este compuesto se obtuvo utilizando el método de Gouy³², por lo que se obtuvo la susceptibilidad magnética por gramo a temperatura ambiente. Así, con el peso molecular del compuesto se obtuvo la susceptibilidad magnética molar y utilizando las constantes de Pascal³³, se corrigió este valor con las contribuciones diamagnéticas de los átomos en la molécula. Así,

el valor del momento magnético efectivo (μ_{eff}) obtenido es de 2.58MB para los dos iones de cobre (II). Este valor es muy bajo, ya que para un solo ion de Cu(II) el valor esperado es de 1.7-2.2 MB, lo cual indica que en la molécula existe interacción antiferromagnética entre los iones cobre. Esta interacción puede ser de tipo intermolecular o intramolecular. Hasta el momento, con los resultados obtenidos, no se pueden diferenciar, estas opciones.

3.3 Determinación de las constantes de equilibrio

3.3.1 Determinación de los pK_{as} del ligante

Las constantes de acidez fueron obtenidas a partir de titulaciones potenciométricas, las cuales se realizaron utilizando un titulador Metrom 702 SM titrino. Las titulaciones se hicieron por duplicado, manteniendo constante la fuerza iónica con una disolución de KNO_3 0.1M, una temperatura de 25°C y un burbujeo de N_2 .

La preparación de la muestra se hizo de la siguiente manera: se preparó una disolución 0.1M de KNO_3 , a la cual se le agregó 1 eq. de ligante Dimp y 7 eq. de HNO_3 (previamente normalizado) en un volumen final de 100mL, las concentraciones finales fueron 1.25mM para Dimp y 8.75mM para el HNO_3 . El volumen titulado fue de 25mL.

Se tituló con una disolución de NaOH valorada con una concentración aproximada y una concentración de CO_3^{2-} menor al 2% (ver sección experimental). La agitación y el burbujeo de N_2 se mantienen hasta el término de la titulación.

Los datos obtenidos de las titulaciones se procesaron utilizando el programa de computación hyperquad 2003³⁴ el cual compara las curvas de titulación

obtenidas experimentalmente con las curvas teóricas, que se obtienen a partir de la introducción de un modelo que propone los valores de los pK_as. Para cada ajuste, el programa proporciona el valor del parámetro estadístico χ^2 , que debe ser menor de 12.6 para tener un 95% de confiabilidad.

Los valores iniciales de las constantes de acidez para la molécula Dimp, que se introdujeron al hyperquad, fueron simulados por el programa Chem sketch, el cual aproxima los pK_as de la estructura deseada por medio de la comparación con estructuras semejantes en una base de datos interna.

En la siguiente tabla se presentan los equilibrios del ligante Dimp, los log β y los pK_as obtenidos.

Equilibrio	Log β	pK _a s	Desviación Estándar
Dimp + H ⁺ → HDimp ⁺	7.95	7.95	0.0395
HDimp ⁺ + H ⁺ → H ₂ Dimp ²⁺	14.57	6.62	0.0326
H ₂ Dimp ²⁺ + H ⁺ → H ₃ Dimp ³⁺	19.42	4.85	0.0349
H ₃ Dimp ³⁺ + H ⁺ → H ₄ Dimp ⁴⁺	23.67	4.25	0.0337
H ₄ Dimp ⁴⁺ + H ⁺ → H ₅ Dimp ⁵⁺	25.96	2.29	0.0460

Tabla 3.10 Constantes de acidez del ligante Dimp obtenidas con el programa de computación Hyperquad 2003.

En la figura 3.16 se muestran las curvas de titulación potenciométricas experimentales y teóricas graficadas por el programa hiperquad; el valor obtenido de χ^2 fue de 4.98.

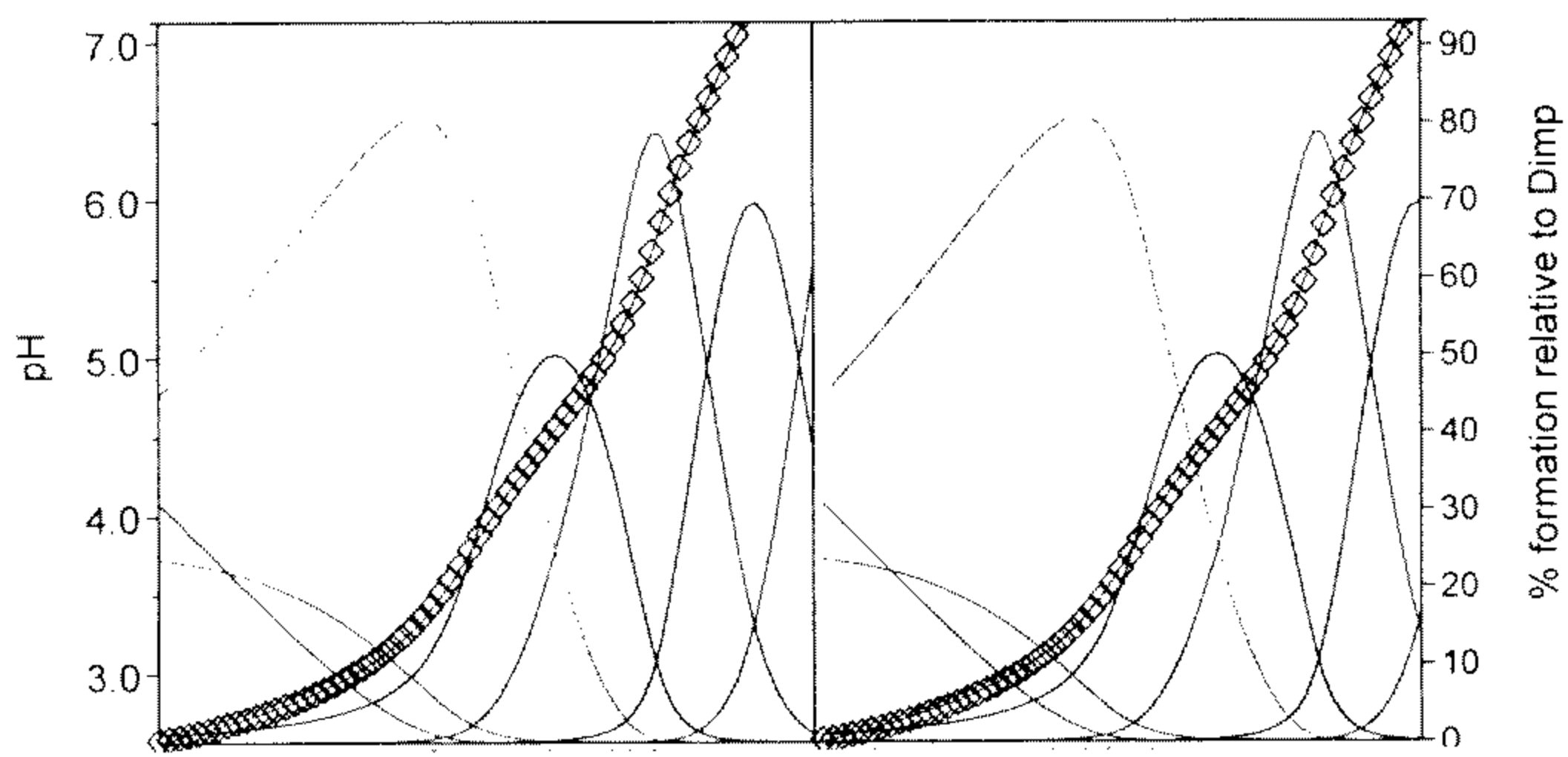


Figura 3.16 Curvas de titulación potenciométrica experimental (□) y teórica (-) del ligante Dimp.

3.3.1.1 Diagrama de predominio de especies

Con las constantes de acidez calculadas para el ligante Dimp y el programa Medusa³⁵ se obtuvo el diagrama de predominio de especies que se presenta a continuación.

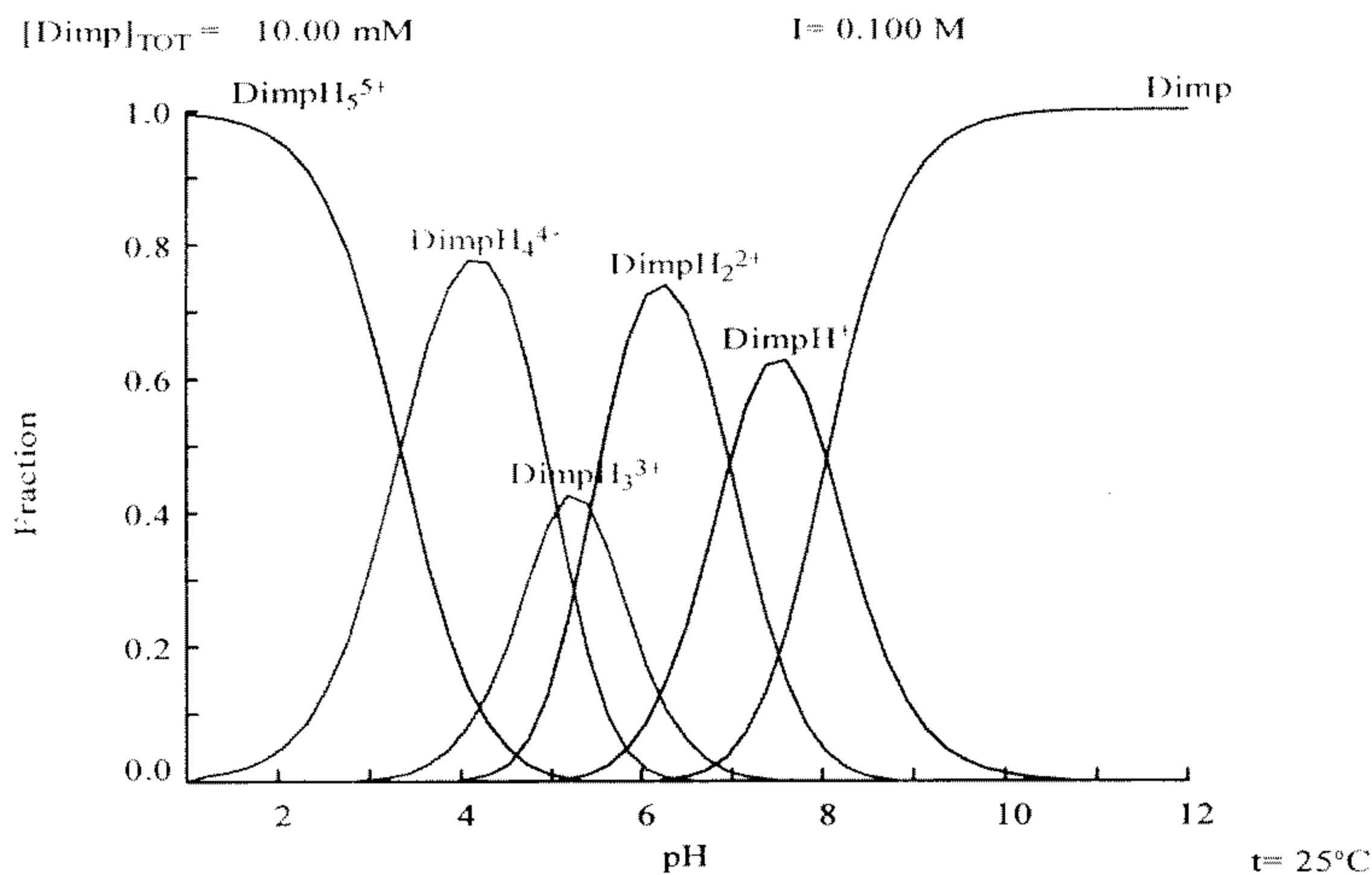


Figura 3.17 Diagrama de predominio de especies del ligante Dimp.

3.3.2 Determinación de las constantes de formación del complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{ClO}_4)$

La determinación de las constantes de formación se hizo de manera similar a la de las constantes de acidez.

La muestra se preparó con una disolución 0.1M de KNO_3 , a la cual se le agregó 1 eq de ligante Dimp, 7 eq. de HNO_3 y 2 eq. de una disolución de Cu^{2+} estandarizado; en un volumen final de 100mL, con las concentraciones de Dimp 1.25mM, HNO_3 8.75mM y Cu^{2+} 2.5 mM. El volumen titulado fue de 25mL. La titulación se hizo por triplicado. El complejo se tituló con NaOH valorada con una concentración de CO_3^{2-} menor al 2%.

En la siguiente figura se presentan las curvas de titulación potenciométricas experimentales y teóricas obtenidas por el programa hyperquad.

El valor obtenido de χ^2 fue de 6.72.

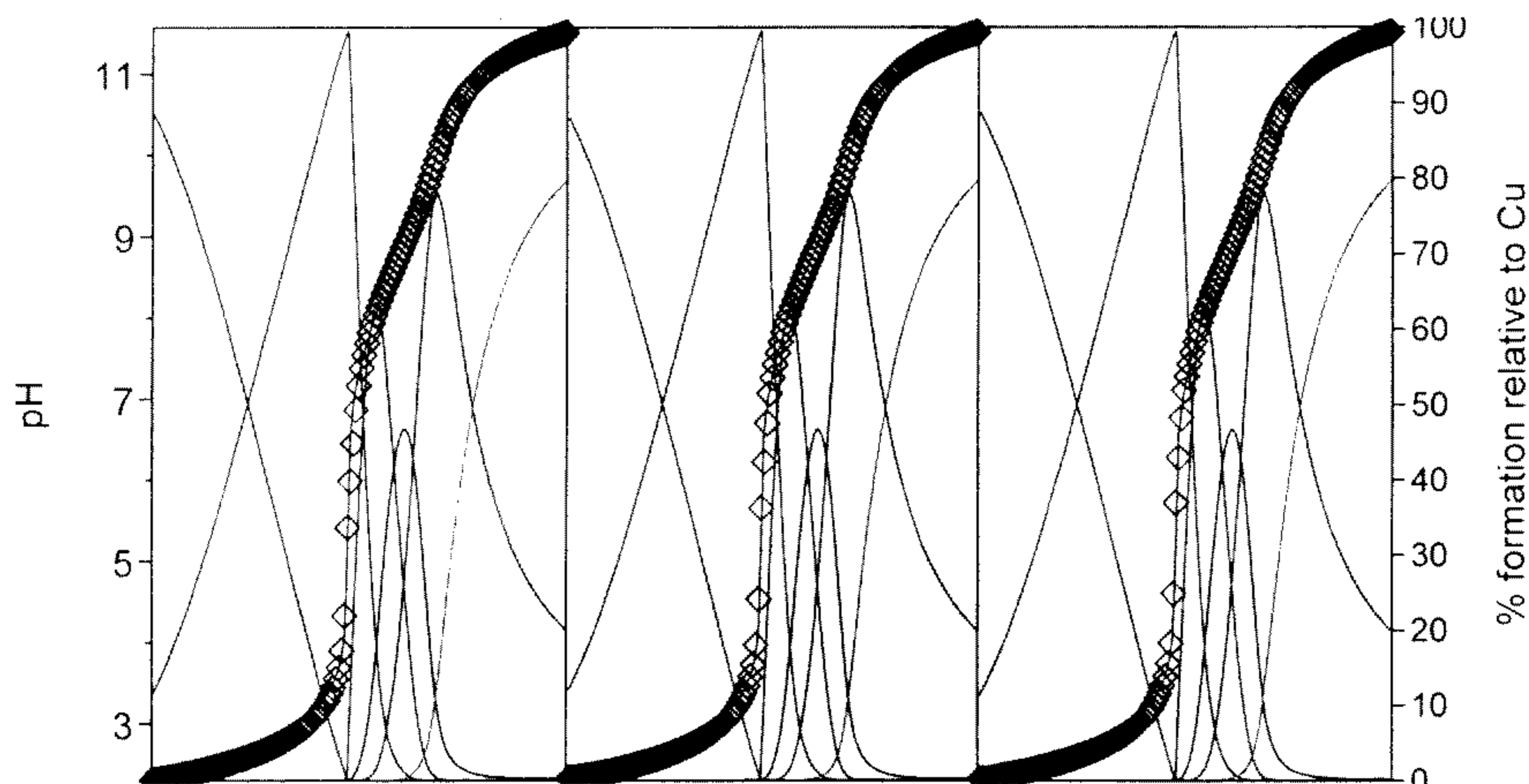


Figura 3.18 Curvas de titulación potenciométricas experimentales (\square) y teóricas (-) del complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_6\text{Dimp}]^{4+}$.

En la tabla 3.11 se presentan las constantes de formación acumulativas, los pK_{as} y los equilibrios correspondientes para cada constante.

Equilibrio	$\log \beta$	Desviación Estándar	pK_{as}
$2[Cu(H_2O)_6]^{2+} + Dimp \rightarrow [Cu_2Dimp(H_2O)_4]^{4+}$	18.63	0.0342	
$[Cu_2Dimp(H_2O)_4]^{4+} - H^+ \rightarrow [Cu_2Dimp(H_2O)_3(OH)]^{3+}$	11.09	0.0327	7.54
$[Cu_2Dimp(H_2O)_3(OH)]^{3+} - H^+ \rightarrow [Cu_2Dimp(H_2O)_2(OH)_2]^{2+}$	2.44	0.0243	8.65
$[Cu_2Dimp(H_2O)_2(OH)_2]^{2+} - H^+ \rightarrow [Cu_2Dimp(H_2O)(OH)_3]^{1+}$	-6.73	0.0289	9.16
$[Cu_2Dimp(H_2O)(OH)_3]^{1+} - H^+ \rightarrow [Cu_2Dimp(OH)_4]$	-17.60	0.0303	10.87

Tabla 3.11 Constantes de formación para distintas especies de Dimp con cobre (II).

Las constantes acumulativas presentadas corresponden a las obtenidas por el programa hyperquad .

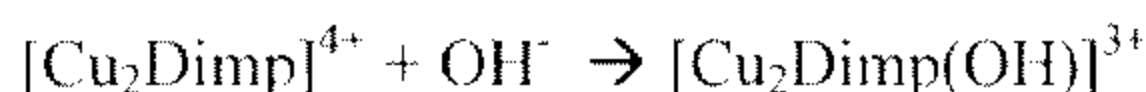
La constante de formación del complejo dinuclear de cobre corresponde a dos iones de Cu^{2+} equivalentes, por lo que si se quiere estimar la constante de formación para un solo cobre, es necesario dividir el valor entre dos, dando un valor de 9.32 para el compuesto mononuclear; este valor es semejante a los reportados en la literatura para complejos mononucleares con ligantes tridentados donadores por N, como el complejo $[Cu(\text{tris}(\text{aminometil})\text{metano})]^{2+}$ con $\beta_1=9.9$ ³⁴

Referente a los hidroxocomplejos, los equilibrios presentados son los correspondientes a las hidrólisis consecutivas obteniéndose valores de $\log \beta$ por lo que si sólo se desean saber los valores de las constantes de hidrólisis (pK_{as}), es necesario restar el valor de la constante de formación del complejo dinuclear de Cu (II) para la primera hidrólisis y para las hidrólisis subsecuentes se resta el valor de la hidrólisis anterior. Con los valores de los pK_{as} y los equilibrios de las hidrólisis también es posible obtener los valores de las constantes de formación de los hidroxocompuestos (β_{OH}). A continuación se presentan el equilibrio de la primera hidrólisis:



$$K_a = \frac{[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})]^{3+} [\text{H}^+]}{[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}} \quad \text{Ec 1}$$

Y el equilibrio de formación del primer complejo hidroxido:



$$\beta_{\text{OH}} = \frac{[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{OH})]^{3+}}{[\text{Cu}_2\text{Dimp}]^{4+} [\text{OH}^-]} \quad \text{Ec 2}$$

Si la ecuación 2 se multiplica y se divide por $[\text{H}^+]$ se obtiene que $\beta_{\text{OH}} = K_a/K_w$, si se convierte a $\text{Log}\beta_{\text{OH}}$ se tiene que $\text{Log}\beta_{\text{OH}} = pK_w - pK_a$, así en la tabla 3.12 se muestran los valores de $\text{Log}\beta_{\text{OH}}$. Los valores de $\text{Log}\beta_{\text{OH}}$ de los hidroxocomplejos subsecuentes se obtuvieron de manera similar.

Equilibrio	Log β_{OH}
$[\text{Cu}_2\text{Dimp}]^{4+} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{OH})^{3+}$	6.46
$[\text{Cu}_2\text{Dimp}]^{4+} + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{OH})_2^{2+}$	19.35
$[\text{Cu}_2\text{Dimp}]^{4+} + 3\text{OH}^- \rightarrow \text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{OH})_3^+$	32.84
$[\text{Cu}_2\text{Dimp}]^{4+} + 4\text{OH}^- \rightarrow \text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{OH})_4$	45.13

Tabla 3.12 Constantes de formación acumulativas (β_{OH}) de los compuestos hidroxido dinucleares con el ligante Dimp.

3.3.2.1 Diagrama de predominio de especies

A continuación se presenta el diagrama de predominio de especies obtenido por el programa MEDUSA para el complejo dinuclear de cobre (II).

$I = 0.100 \text{ M}$

$[\text{Dimp}]_{\text{TOT}} = 5.00 \text{ mM}$

$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{TOT}} = 10.00 \text{ mM}$

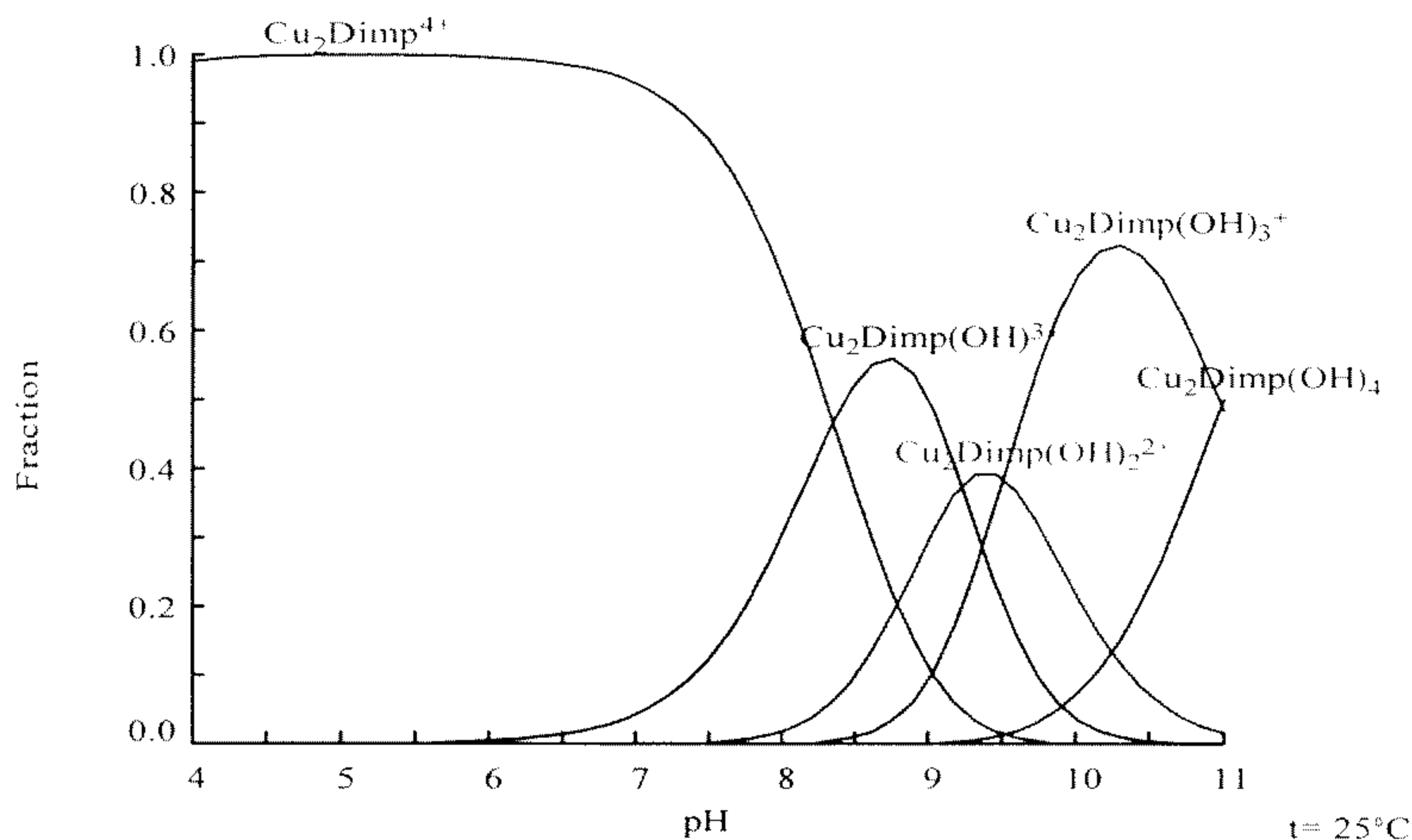


Figura 3.19 Diagrama de predominio de especies del complejo Cu_2Dimp .

En este diagrama puede apreciarse que la formación del complejo $[\text{Cu}_2(\text{Dimp})]$ es casi completa desde $\text{pH}=4$, y que los equilibrios de hidrólisis se empiezan a volver importante a partir de $\text{pH} = 7$. En el intervalo de pH desde 7 hasta 11, coexisten en la disolución varios complejos con distinto grado de desprotonación.

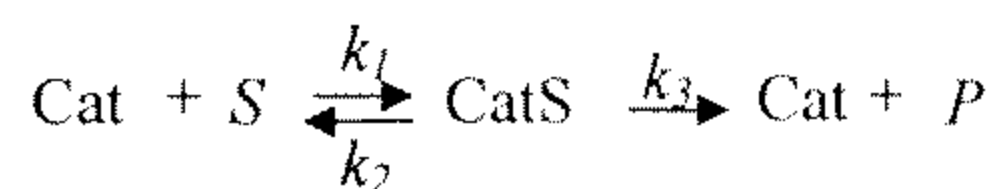
3.4 Estudio cinético del complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}]$

Modelo de catálisis enzimática de Michaelis-Menten ^{36,37}

Las propiedades catalíticas de un gran número de sistemas dinucleares de cobre se han evaluado en la reacción de oxidación de catecoles a *o*-quinonas en presencia de oxígeno. Esta actividad catecolasa es realizada en los sistemas biológicos por las enzimas catecol oxidasa y tirosinasa, ambas con un centro

bimetálico. Las reacciones enzimáticas se caracterizan porque aunque se aumente la concentración de sustrato la velocidad no aumenta linealmente, ya que aparece un efecto de saturación debido a que todos los centros activos están ocupados. La velocidad depende de la cantidad de enzima con sustrato suficiente.

Comúnmente la actividad catalítica de las enzimas es evaluada utilizando el modelo de Michaelis-Menten, quienes propusieron un modelo simple para explicar la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas. Esta teoría se ha desarrollado plenamente para el caso sencillo de una reacción en la que sólo hay un sustrato. En este modelo el catalizador se combina reversiblemente con su sustrato para formar el complejo catalizador-sustrato [CatS] que subsecuentemente se rompe para formar el producto, hecho que regenera al catalizador. El modelo para una molécula de sustrato se muestra a continuación:



Donde k_1, k_2 y k_3 son las constantes de velocidad de la reacción.

Según esto, podemos afirmar que:

$$v_1 = k_1 [\text{Cat}] [\text{S}] \quad (\text{Ec } 3)$$

$$v_2 = k_2 [\text{CatS}] \quad (\text{Ec } 4)$$

$$v_3 = k_3 [\text{CatS}] \quad (\text{Ec } 5)$$

En el modelo de Michaelis-Menten la velocidad de reacción debe ser evaluada en los primeros instantes, es decir, se mide la velocidad inicial de la reacción (v_0), que es la velocidad ejercida por el catalizador, inmediatamente después de que se ha puesto en contacto con el sustrato. La razón de lo anterior es que en ese momento la concentración del producto de la reacción que se ha acumulado, es muy pequeña y, por lo tanto, la reacción en el sentido inverso puede ser ignorada.

También se asume la hipótesis del estado estacionario según en la cual la concentración del CatS no cambia con el tiempo, esto quiere decir que la velocidad de formación de [CatS] es igual a aquella para su desintegración. Por lo que:

$$v_1 = v_2 + v_3 \quad (\text{Ec 6})$$

En este modelo la velocidad de la reacción está limitada por la segunda etapa de la reacción catalítica, es decir por el rompimiento del complejo CatS para obtener el catalizador libre y el producto. Entonces si [CatS] es constante, la velocidad de formación de los productos es constante, obteniendo que:

$$v_0 = v_3 = k_3 [\text{CatS}] = \text{constante} \quad (\text{Ec 7})$$

En donde la concentración total del catalizador es

$$[\text{Cat}]_{\text{Total}} = [\text{Cat}] + [\text{CatS}] \quad (\text{Ec 8})$$

al despejar [Cat] se tiene que: $[\text{Cat}] = [\text{Cat}]_{\text{Total}} - [\text{CatS}]$ y como sabemos que $v_1 = v_2 + v_3$, podemos decir que:

$$k_1[\text{S}] [\text{Cat}]_{\text{Total}} - k_1 [\text{S}] [\text{CatS}] = k_2 [\text{CatS}] + k_3 [\text{CatS}] \quad (\text{Ec 9})$$

Si definimos $K_M = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}$ (Ec 10) como la constante de Michaelis-Menten

y despejamos [CatS], tenemos que: $[\text{CatS}] = \frac{[\text{Cat}]_{\text{Total}} [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$ (Ec 11)

Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto es:

$$v_0 = v_3 = k_3 [\text{CatS}] = \frac{k_3 [\text{Cat}]_{\text{Total}} [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \quad (\text{Ec 12})$$

Cuando la concentración de sustrato es tan elevada que prácticamente todo el catalizador está unido al sustrato [CatS], se alcanzará la velocidad inicial máxima, V_{max} , dada por:

$$V_{\text{max}} = k_3 [\text{Cat}]_{\text{Total}} \quad (\text{Ec 13})$$

Donde k_3 es conocida como número de recambio o constante catalítica (k_{cat}).

Si introducimos el parámetro V_{max} en la ecuación general de la velocidad, obtenemos la expresión conocida como de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ec 14})$$

La representación gráfica de esta ecuación (v_0 frente a $[S]_0$) para las cinéticas que obedecen el modelo Michaelis-Menten es una hipérbola debido a una dependencia de primer orden para concentraciones bajas y un comportamiento de saturación para concentraciones mayores, cuando la velocidad es prácticamente independiente del sustrato presente. En la gráfica, V_{max} corresponde al valor máximo al que tiende v_0 y K_M corresponde a la concentración del sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la determinación de los parámetros cinéticos. Una de las transformaciones se obtiene, sencillamente, tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación 14:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} \quad \text{Ec 15}$$

Esta ecuación se conoce como la ecuación de *Lineweaver-Burk*.

Cuando se grafica el inverso de la velocidad ($1/v_0$) contra el inverso de la concentración de sustrato ($1/[S]$), se obtiene una línea recta, en la cual:

- La pendiente es K_M/V_{max}
- La abscisa en el origen es $-1/K_M$
- La ordenada en el origen es $1/V_{max}$

Esta representación doble recíproca tiene la ventaja de que permite una determinación mucho más exacta del valor de V_{max} , ya que en la representación sencilla v_0 frente a $[S]$, sólo se obtiene su valor aproximado puesto que es un valor límite a una concentración del sustrato infinita.

De esta forma, a partir de datos experimentales, se pueden calcular gráficamente los valores de K_M y V_{max} de un catalizador para diversos sustratos.

Por otra parte la determinación de V_{max} permite calcular el valor de la constante de velocidad k_3 ó constante catalítica (k_{cat}).

Significado de los parámetros cinéticos:

K_M : es la constante de Michaelis-Menten y es característica de una enzima y en particular para un sustrato. Refleja la afinidad de la enzima por el sustrato. Un valor numérico de K_M pequeño refleja una **alta afinidad** de la enzima por su sustrato. El valor numérico de K_M grande refleja una **baja afinidad** de la enzima por su sustrato.

k_{cat} : constante catalítica. Es la capacidad del enzima para llevar a cabo la transformación. Recibe también el nombre de número de recambio, es la cantidad máxima de moléculas transformadas por unidad de tiempo (sustrato a producto) por molécula de enzima o por número de sitios activos.

k_{cat}/K_M : se ha definido como una medida de la eficiencia catalítica para cualquier par catalizador-sustrato. Así la eficiencia catalítica k_{cat}/K_M constituye el parámetro adecuado para comparar la actividad de diferentes catalizadores frente a un mismo sustrato.

Determinación de los parámetros cinéticos del complejo Cu₂Dimp

Se sabe que muchos compuestos que contienen cobre catalizan una gran variedad de reacciones químicas. Muchas reacciones, principalmente las que se llevan a cabo en disolución acuosa, involucran sistemas de óxido-reducción y un ciclo redox Cu⁺-Cu²⁺, utilizando como agente oxidante al oxígeno molecular. Una reacción bien conocida es la oxidación de catecoles que es realizada por la enzima Tirosinasa, en la cual el oxígeno molecular se reduce a agua, mientras que el *o*-difenoel se oxida a *o*-quinona. La catálisis ocurre en el sitio activo de la enzima, en el cual se encuentran dos iones de Cu(II) puenteados por un grupo OH y coordinados a tres grupos imidazoles cada uno, con una distancia aproximada de 3.4 Å. En la figura 1.2 se muestra el ciclo catalítico de la oxidación de *o*-difenoel a *o*-quinona realizado por la enzima Tirosinasa.

El compuesto Dimp debido a las aminas y grupos imidazoles que contiene en su estructura, es capaz de formar un complejo dinuclear de cobre con propiedades catalíticas.

El estudio cinético de este complejo se llevó a cabo siguiendo por UV-vis la reacción modelo que se presenta a continuación.



Figura 3.20 Reacción modelo: oxidación del 3,5-di-ter-butilcatecol .

La formación de la 3,5-di-ter-butil-*o*-quinona que se obtiene como producto, es fácil de analizar espectrofotométricamente porque presenta una absorción característica en 400 nm ($\epsilon_0 = 1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeOH:H₂O y $\epsilon_0 = 1624.39 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeCN:H₂O).

Esta reacción de oxido-reducción utiliza como sustrato el 3,5-di-*ter*-butcatecol, debido a que el potencial del par redox catecol/quinona es relativamente bajo, por lo que es fácil de oxidar, además, los sustituyentes voluminosos hacen que las reacciones de oxidación subsecuentes, como la apertura del anillo, sean lentas^{38,39,40}. La reacción utiliza como catalizador el complejo Dimp con Cu(II) y como agente oxidante al O₂.

Para la obtención de las constantes catalíticas del complejo de Cu(II) con el ligante Dimp se empleó el método de velocidades iniciales de reacción siguiendo la aparición de la 3,5-di-*ter*-butil-*o*-quinona en función del tiempo en los primeros instantes de la reacción. La pendiente de esta recta corresponde a la velocidad inicial (v_0).

Si la dependencia de la velocidad de reacción (v_0) con respecto a la concentración del catalizador es lineal, el orden de reacción con respecto a éste es de pseudo-primer orden. Si se cumple con esta característica se confirma que efectivamente se están midiendo velocidades iniciales y se puede emplear el modelo enzimático de Michaelis-Menten, así, al graficar el inverso de las velocidades iniciales versus el inverso de la concentración de sustrato se debe obtener un línea recta (gráfico Lineweaver-Burk) del cual se obtiene los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} , V_{max} y k_{cat}/K_M .

Por otra parte, es importante evaluar el comportamiento catalítico del complejo dinuclear de cobre en diferentes disolventes, para determinar la dependencia entre la actividad catalítica de los compuestos modelo y el medio de reacción.

Por esta razón el estudio catalítico se hizo en dos mezclas de disolventes: MeCN:H₂O y MeOH:H₂O ambos en proporción 1:1.

3.4.1 Estudios en MeCN:H₂O, 1:1

3.4.1.1 Efecto del pH

Uno de los factores determinantes en una reacción catalítica es el pH, ya que en diversos estudios de sistemas modelo se ha observado que el pH puede inducir cambios en la esfera de coordinación de complejos dinucleares de Cu(II)^{41,42} por lo cual, el primer estudio catalítico que se realizó, fue la variación de pH, con el objetivo de encontrar el valor de pH, en el cual se obtiene un máximo en la actividad catalítica del complejo.

Debido a que la solubilidad del sustrato en la mezcla MeCN:H₂O es relativamente baja, las concentraciones que se utilizaron fueron 20mM del sustrato, 3,5-di-*ter*-butilcatecol [DTBC], 0.3mM de catalizador Cu₂Dimp. Tanto la concentración del DTBC como la del complejo se mantuvieron constantes en este estudio. La proporción catalizador-sustrato fue 1:67 respectivamente.

El pH se estableció utilizando los siguientes amortiguadores, MES (ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico), HEPES (ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfónico]) y TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano) con una concentración 0.1M en medio acuoso.

En la siguiente tabla se muestran los pHs ajustados con cada uno de los amortiguadores no coordinantes para Cu.

Amortiguador	pKa	pHs		
MES	6.0	5.5	6.0	6.5
HEPES	7.8	7.0	7.5	8.0
TRIS	8.3	8.5	9.0	9.5

Tabla 3.13 Amortiguadores de pH empleados en los estudios cinéticos y sus valores de pKa.

En la figura 3.21 se muestra la grafica de v_o vs pH, para la reacción en presencia de catalizador y para la reacción sin catalizador, sólo con los amortiguadores.

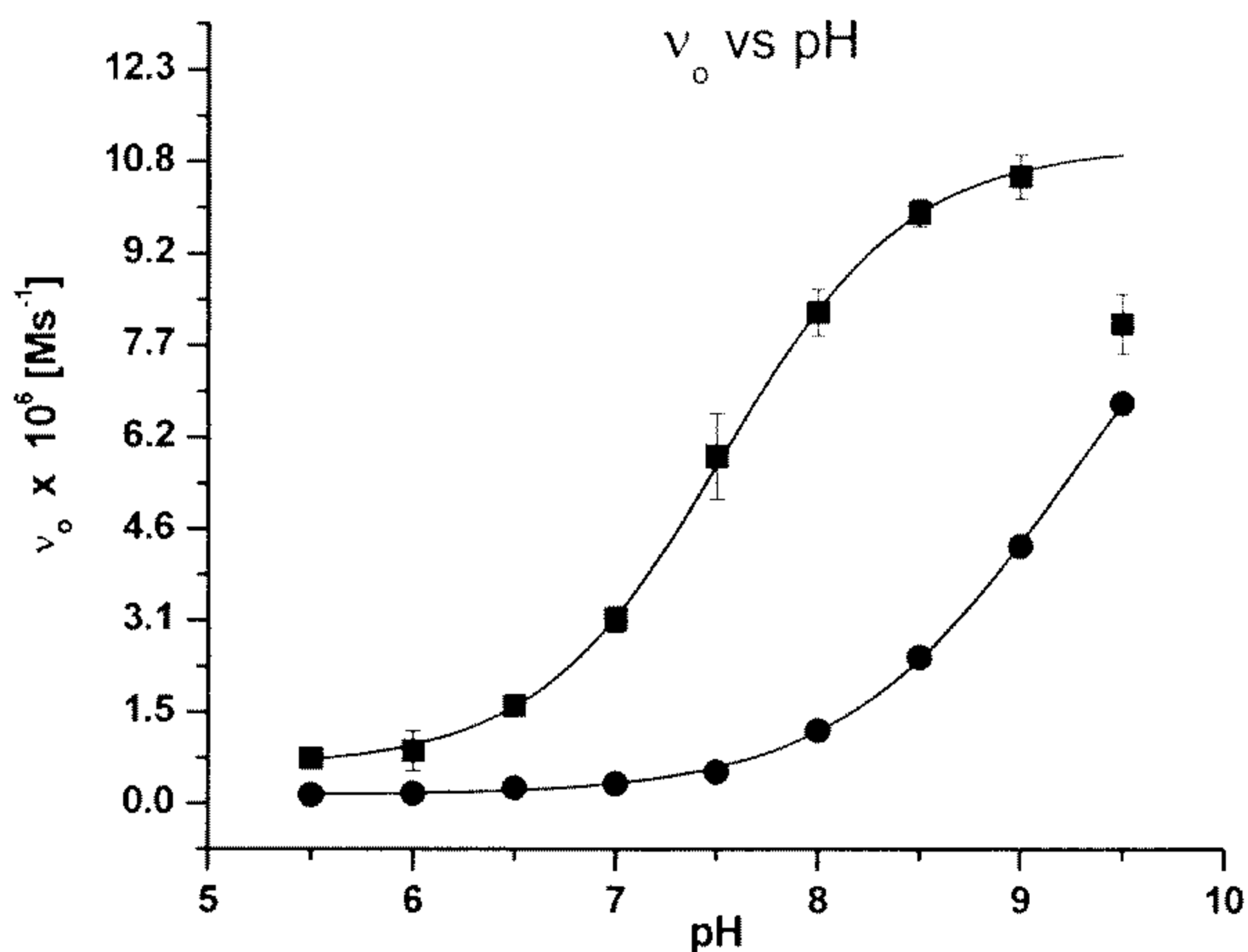


Figura 3.21 Velocidad inicial vs pH en MeCN:H₂O, 1:1. (●) Actividad presentada por el medio. (■) Actividad presentada por el complejo Cu₂Dimp

En esta gráfica se puede observar que aún sin la presencia del catalizador existe un efecto catalítico del medio, siendo este efecto más significativo en valores altos de pH. Esto indica que la oxidación del DTBC puede ocurrir mediante una catálisis básica.

También se puede ver que el pH óptimo en la actividad catecolasa es de 8.5, si tomamos en cuenta la diferencia en las velocidades obtenidas a este pH con y sin catalizador. En este valor de pH ya se encuentran formados los hidroxocomplejos (ver figura 3.18) lo cual coincide con Neves⁴³ quien propone que el responsable de el aumento de la actividad catalítica es la especie hidroxilo, que es la especie activa.

3.4.1.2 Efecto de la concentración del catalizador a pHs 7.5 y 8.5

La dependencia de la velocidad de la reacción (v_0) con la concentración del catalizador se determinó manteniendo constante y en mayor proporción la concentración del sustrato [DTBC] mientras se variaba la concentración del catalizador [Cu_2Dimp]. En estas condiciones puede garantizarse que la formación de cualquier intermediario no altera la concentración del sustrato permitiendo que en los cálculos, ésta pueda considerarse constante.

Los pHs en los cuales se trabajó fueron 7.5 y 8.5 siendo este último el pH óptimo. Las concentraciones usadas son las siguientes: [DTBC] = 20mM y [amortiguador]= 0.1M, HEPES para establecer el pH=7.5 y TRIS para pH=8.5.

Las concentraciones de catalizador utilizadas fueron: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM.

En las siguientes gráficas se muestra la dependencia de la concentración de catalizador con respecto a la velocidad inicial.

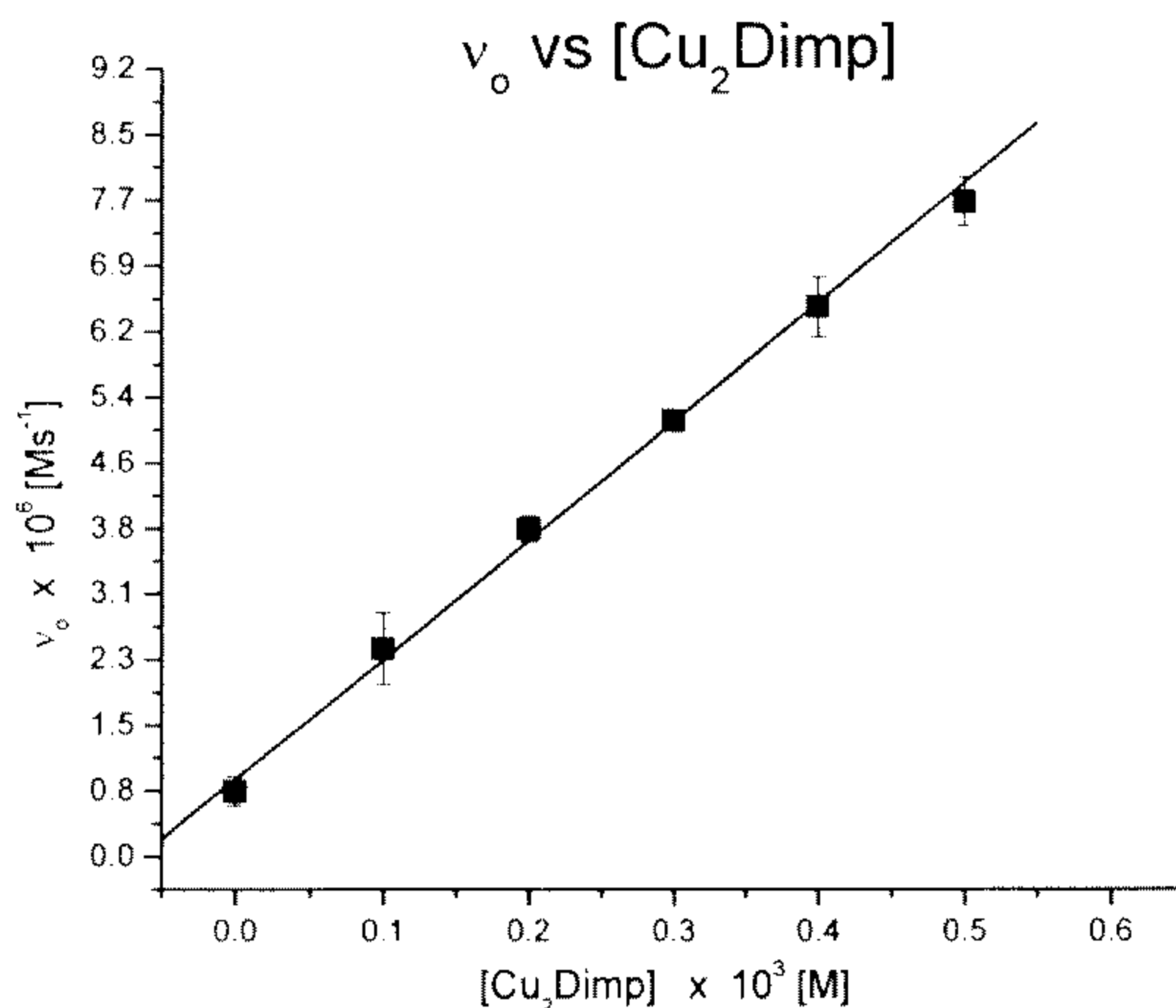


Figura 3.22 Gráfica velocidad inicial vs [Cu_2Dimp] en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ a $\text{pH} = 7.5$

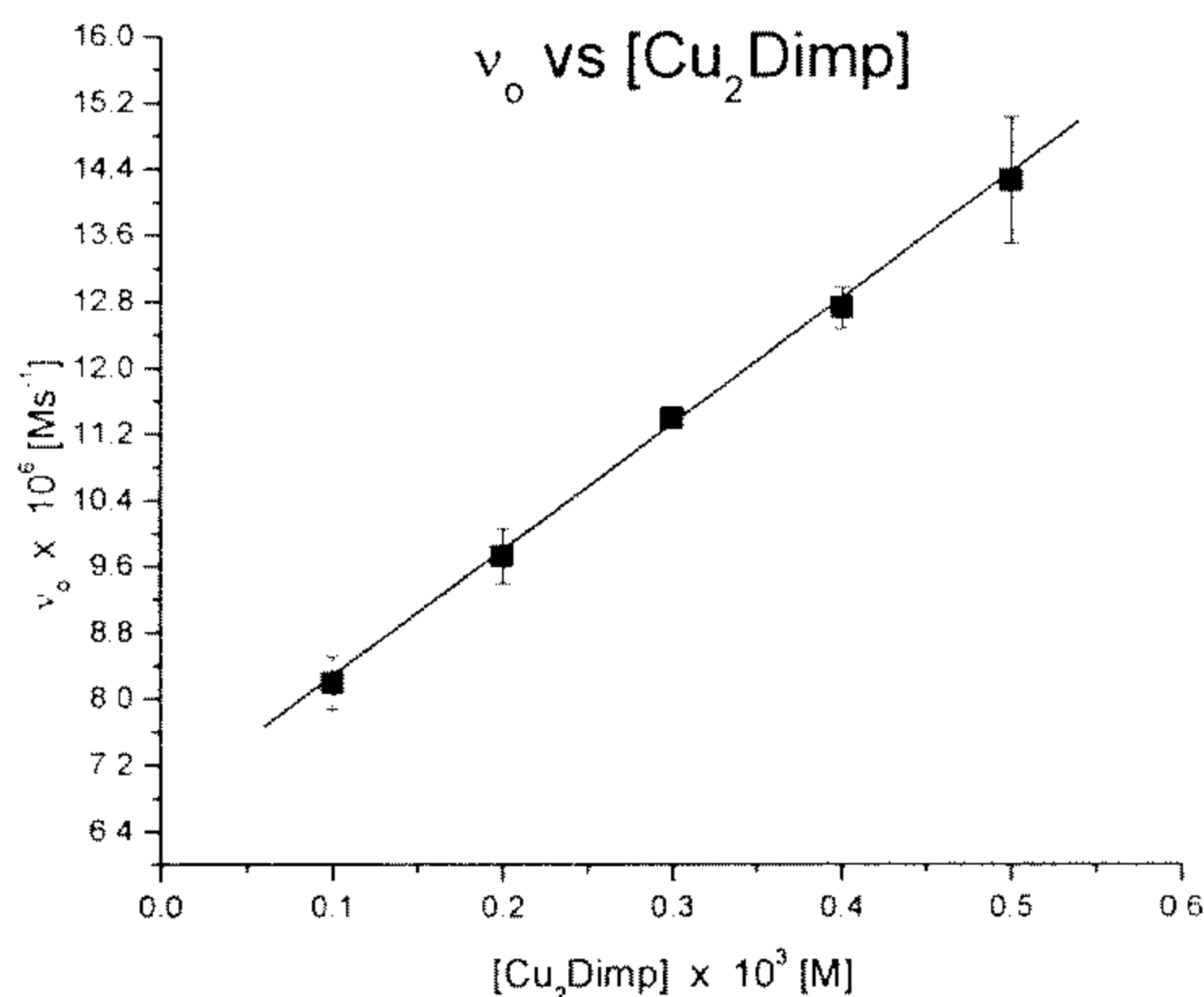


Figura 3.23 Gráfica velocidad inicial vs [Cu₂Dimp] en MeCN:H₂O a pH = 8.5

En los gráficos v_0 vs [Catalizador] se puede ver que las gráficas son unas rectas con coeficiente de correlación mayor de 0.99, lo cual indica que el orden de reacción respecto al catalizador es de pseudo-primer orden. En este caso la ley de velocidad es $V=k_{obs}[\text{catalizador}]$, donde la pendiente sería la k_{obs} y la ordenada al origen cero.

Al verificarse las condiciones de pseudo-primer orden; obteniendo rectas en la variación de catalizador se puede utilizar el modelo enzimático de Michaelis-Menten.

3.4.1.3 Efecto de la concentración de sustrato a pHs 7.5 y 8.5

El estudio del efecto de la concentración de sustrato [S_0] se realizó en condiciones de saturación variando la concentración del DTBC mientras se mantuvo constante y en mucho menor proporción la concentración del catalizador.

Las concentraciones utilizadas fueron: Cu₂Dimp 0.3mM, amortiguador 0.1M. Las concentraciones de [DTBC] fueron: 6, 7, 8, 9, 11, 14 y 20 mM.

A continuación se presentan las gráficas obtenidas para v_0 vs [DTBC]

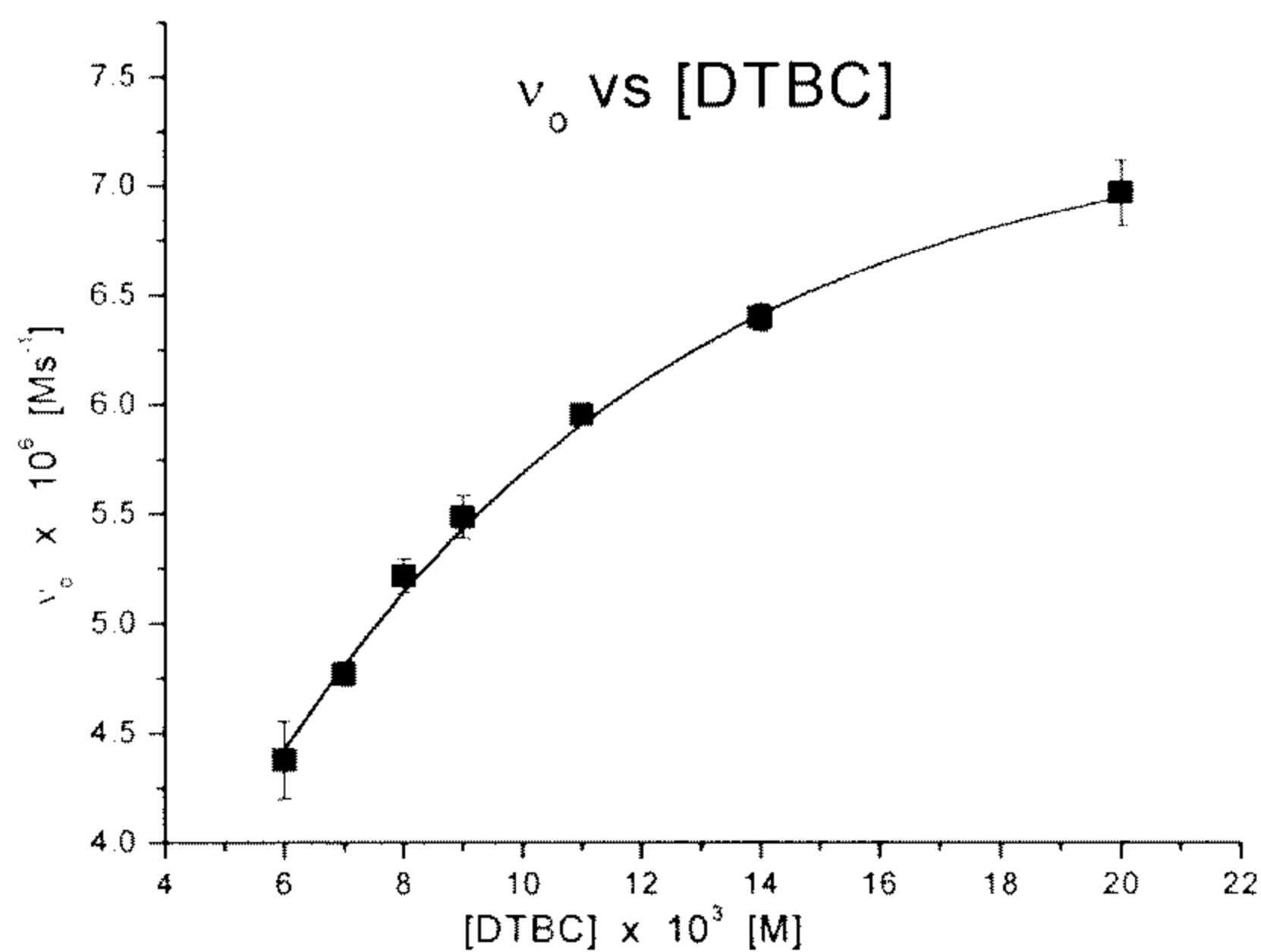


Figura 3.24 Gráfica velocidad inicial vs [DTBC] en MeCN:H₂O a pH = 7.5

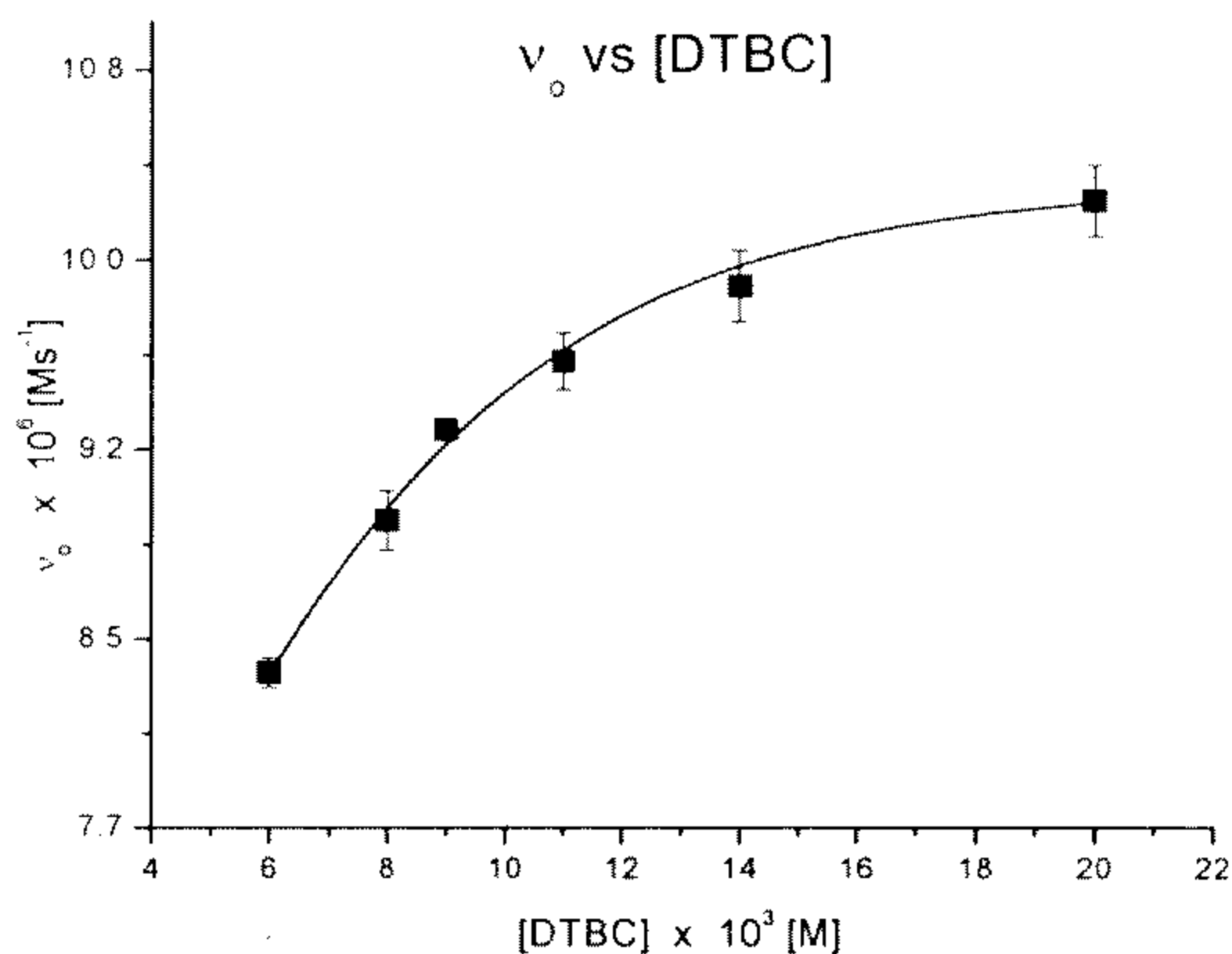


Figura 3.25 Gráfica velocidad inicial vs [DTBC] en MeCN:H₂O a pH = 8.5

Las gráficas v_0 vs [DTBC] que se obtuvieron para el complejo Cu₂Dimp son típicas del comportamiento cinético de Michaelis-Menten; a concentraciones bajas de sustrato la velocidad inicial de la reacción depende linealmente de la

concentración del sustrato, pero conforme se aumenta ésta, la velocidad de la reacción se vuelve independiente de la cantidad añadida de DTBC.

También se presentan los gráficos de Lineweaver-Burk $1/v_0$ vs $1/[DTBC]$, de los cuales se determinaron los parámetros cinéticos, que se muestran más adelante (Tabla 3.14)

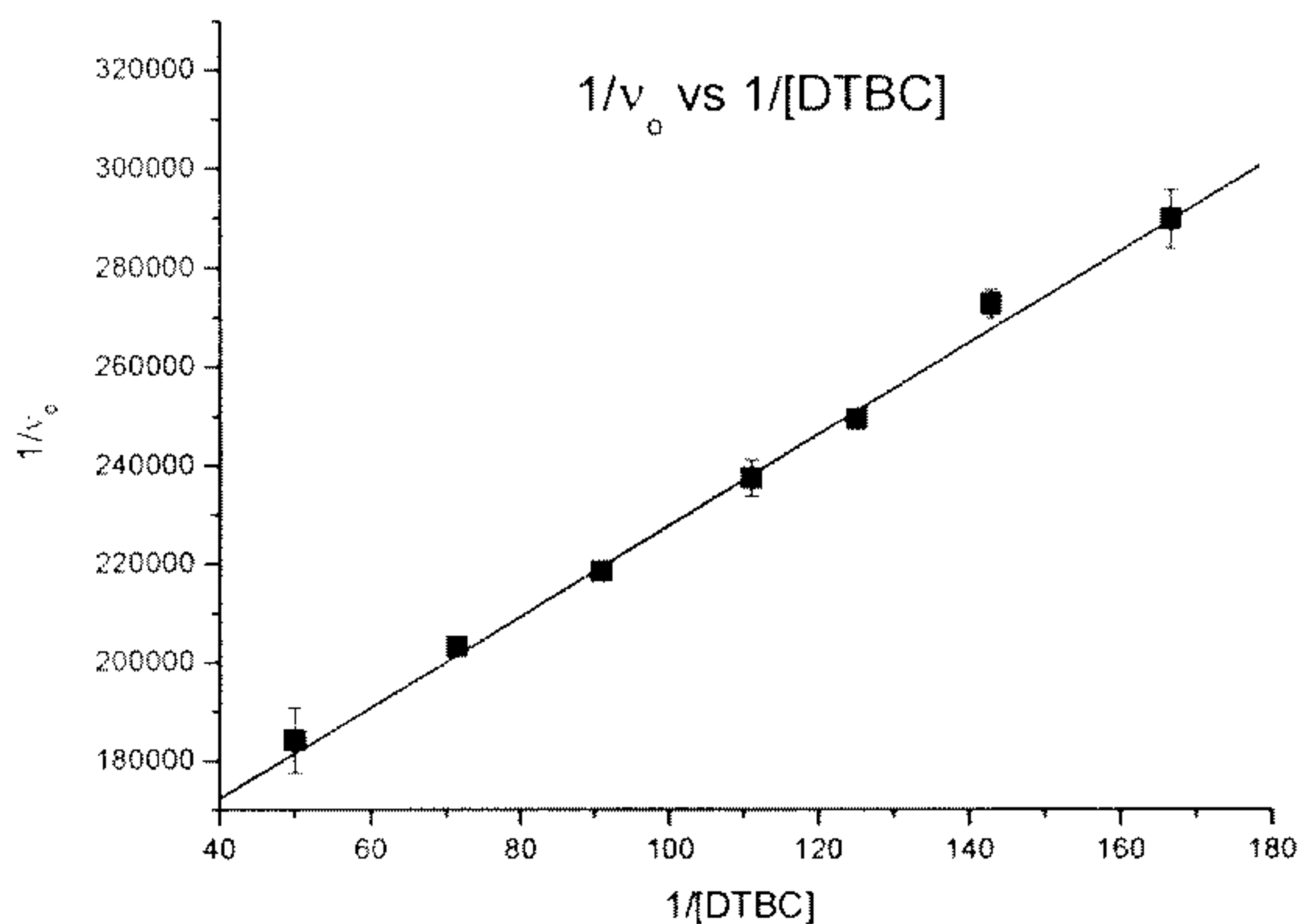


Figura 3.26 Gráfica $1/\text{velocidad inicial vs } 1/[\text{DTBC}]$ en MeCN:H₂O a pH = 7.5

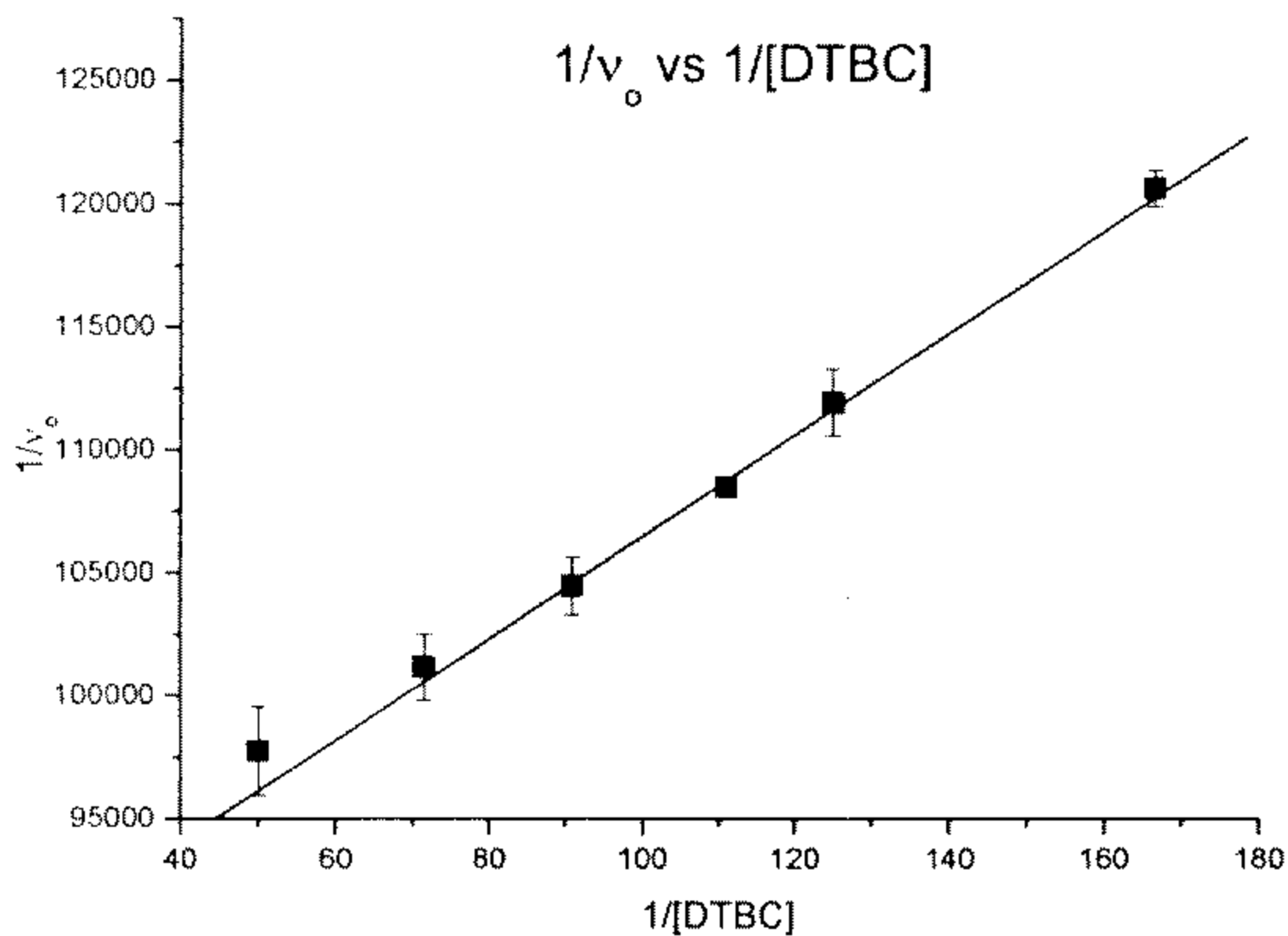


Figura 3.27 Gráfica $1/\text{velocidad inicial vs } 1/[\text{DTBC}]$ en MeCN:H₂O a pH = 8.5

3.4.2 Estudios en mezcla MeOH:H₂O, 1:1

El estudio en MeOH:H₂O utilizando las mismas concentraciones que en el medio anterior no fue posible, debido a que se forma un precipitado en la celda al mezclar el buffer, el catalizador y el sustrato, por lo tanto los estudios en este medio se hicieron en una concentración 10 veces menor.

3.4.2.1 Efecto del pH

Las concentraciones utilizadas en la variación del pH fueron DTBC 2mM, Cu₂Dimp 0.03mM y amortiguador 0.1M.

Los pHs establecidos con cada uno de los amortiguadores se muestran en la tabla 3.13.

En la figura 3.28. Se muestra la grafica v_o vs pH, para la reacción en presencia de catalizador y para la reacción sin catalizador, sólo con los amortiguadores en MeOH:H₂O.

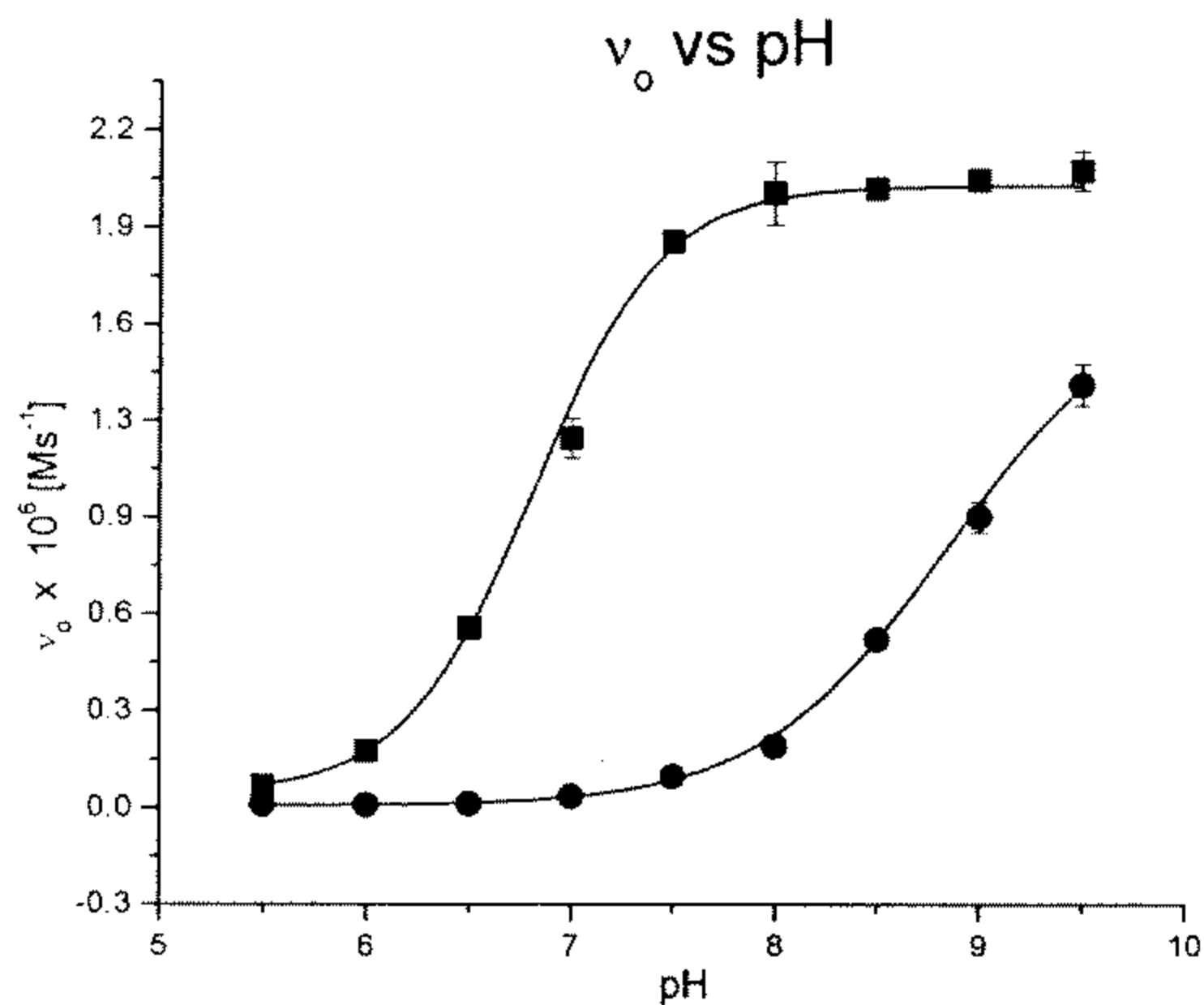


Figura 3.28 Velocidad inicial vs pH en MeOH:H₂O, 1:1. (●) Actividad presentada por el medio. (■) Actividad presentada por el complejo Cu₂Dimp

En esta gráfica, también se observa un efecto catalítico del medio sin la presencia del catalizador al igual que en MeCN:H₂O, al aumentar el pH del medio la velocidad de la reacción aumenta.

El pH en el cual se observa una mayor actividad catecolasa en este medio es 7.5.

3.4.2.2 Efecto de la concentración del catalizador a pH = 7.5

La variación de la concentración de catalizador se hizo con las concentraciones de sustrato 2mM y amortiguador 0.1M.

Las concentraciones de catalizador empleadas fueron: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 y 0.06 mM.

En la figura 3.29 se muestra el grafico obtenido de v_o vs [Catalizador].

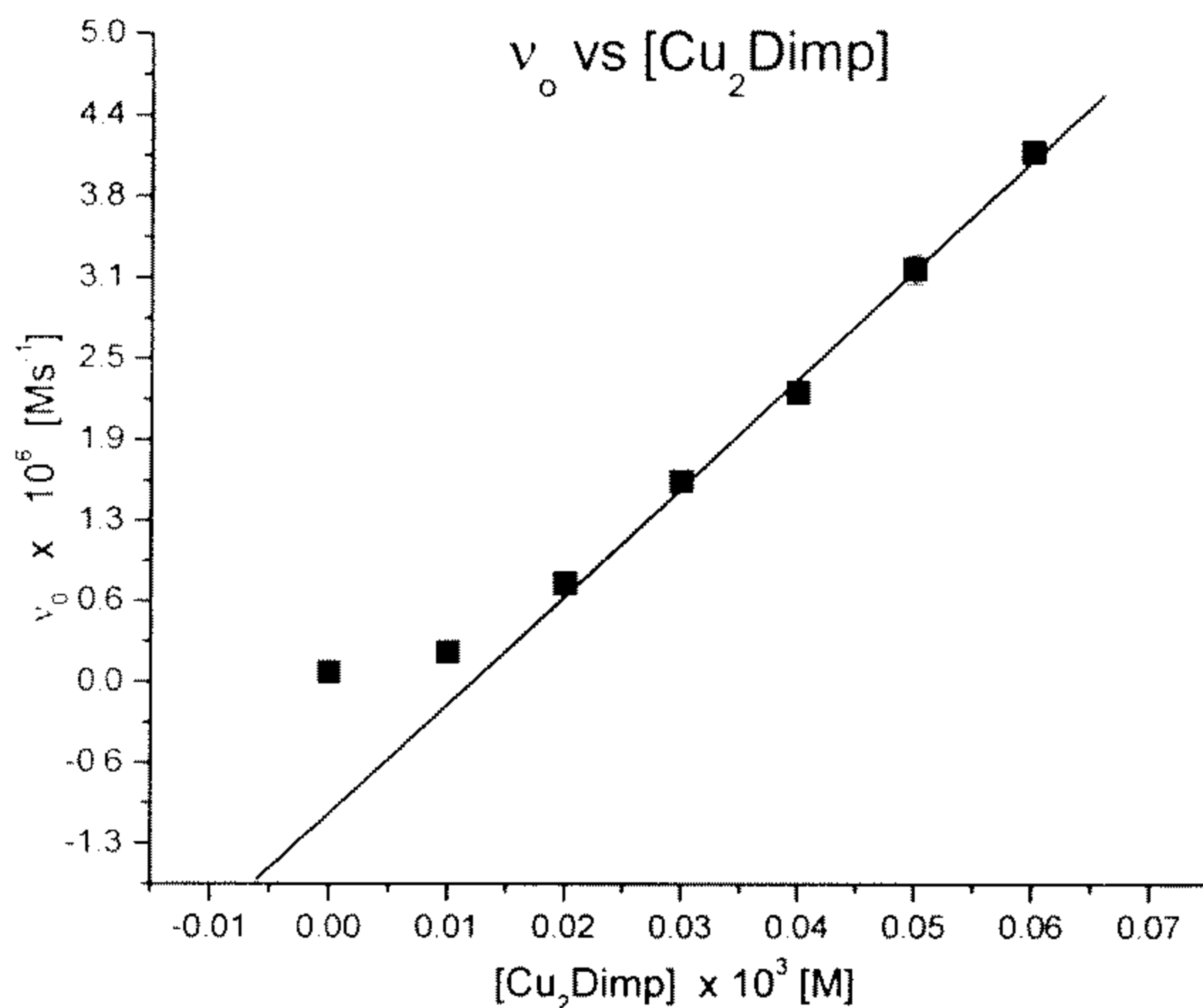
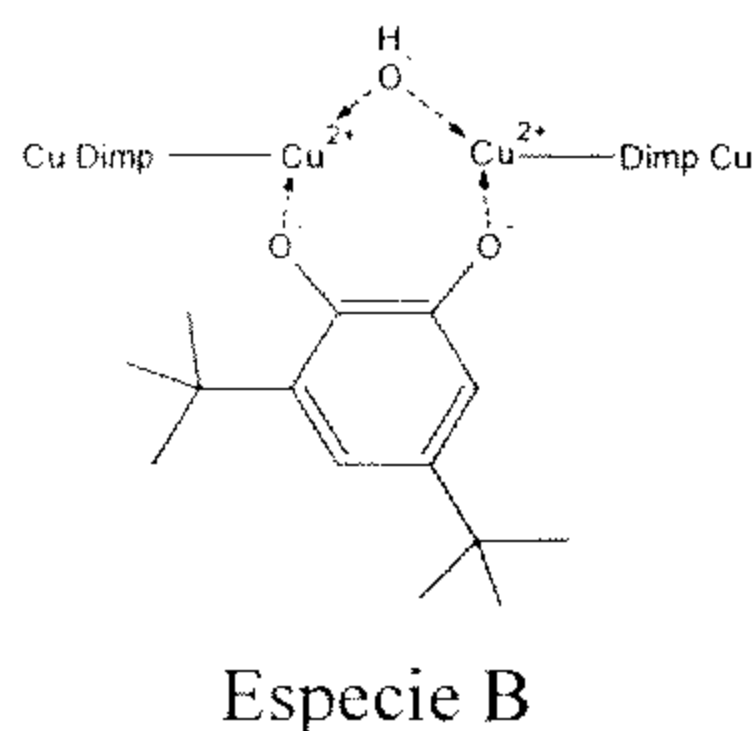


Figura 3.29 Gráfica velocidad inicial vs $[Cu_2Dimp]$ en MeOH:H₂O a pH = 7.5

En esta gráfica se observa una línea recta a concentraciones por encima de 0.02mM.

En la Figura 1.2 se muestra el ciclo catalítico propuesto para la actividad catecolasa, en donde dos átomos de cobre se encuentran unidos por un puente OH, en el estado *met* en la enzima (Tirosinasa) donde se inicia el ciclo catalítico.

Dada la estructura de nuestro catalizador, la especie iniciadora del ciclo catalítico no se encuentra dentro de la misma estructura del Cu_2Dimp , por lo que se forma cuando se acercan dos moléculas de catalizador para dar la especie $\text{Cu}-\text{OH}-\text{Cu}$, con la cual se forma el complejo catalizador-sustrato generando la especie B. El paso subsecuente es la oxidación del sustrato a quinona y la reducción del complejo, el cual es oxidado por el O_2 , obteniéndose nuevamente la especie con Cu(II) para continuar con el ciclo catalítico.



En la gráfica obtenida v_o vs [Catalizador] (figura 3.29) se puede observar que a bajas concentraciones de catalizador, la dependencia con respecto a éste no es lineal.

El comportamiento de la gráfica, muestra que es necesario un mínimo en la concentración de catalizador para obtener una dependencia lineal, ya que al trabajar con concentraciones de éste por arriba del mínimo necesario, la reacción catalítica está determinada por la formación del complejo Cat-S (paso lento), y no

por la formación de la especie Cu–OH–Cu, esto es debido a que la formación de la especie Cu–OH–Cu se lleva a cabo muy rápido, obteniendo así una reacción de pseudorden 1 con respecto al catalizador.

En cambio, al tener concentraciones muy bajas de catalizador, no se alcanza la concentración mínima requerida para presentar actividad catalítica con un comportamiento lineal con respecto al catalizador, debido a que la reacción está determinada por la formación de la especie Cu–OH–Cu (paso lento), y no por la formación del complejo Cat-S, observándose que bajo estas condiciones el orden de reacción con respecto al catalizador sería 2, ya que para la formación de la especie Cu–OH–Cu es necesaria la presencia de dos moléculas de Cu₂Dimp.

De acuerdo a lo dicho anteriormente, es posible proponer reacciones basadas en el comportamiento observado en la figura 3.29. A continuación se muestran las reacciones propuestas para los intervalos $0 < [\text{Cat.}] < 0.01\text{mM}$ y $0.02\text{mM} < [\text{Cat}] < 0.06\text{mM}$.

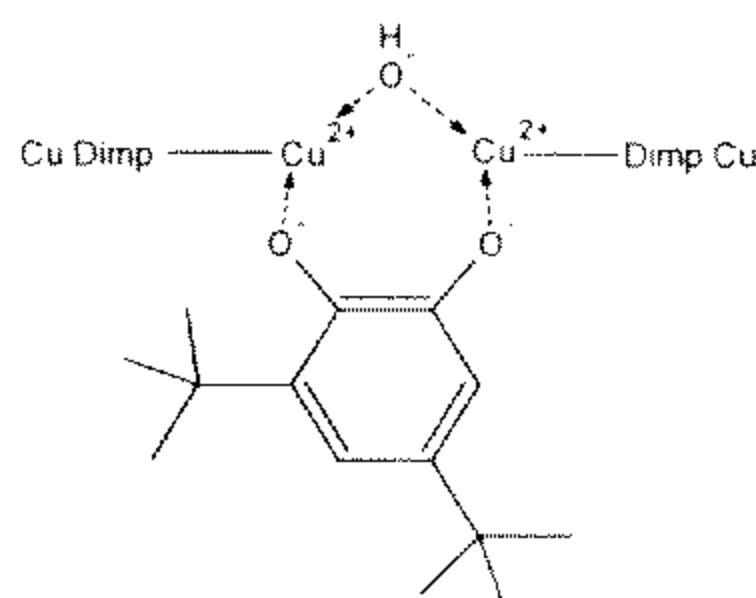
Reacción 1

En el intervalo de $0 < [\text{Cat.}] < 0.01\text{mM}$, la reacción está determinada por:



Reacción 2

En el intervalo de $0.02\text{mM} < [\text{Cat.}] < 0.06\text{mM}$, la reacción está determinada por:



pseudoorden 1

Esta reacción es de pseudoorden 1, ya que el sustrato está en exceso 1:67

3.4.2.3 Efecto de la concentración de sustrato a pH= 7.5

El estudio del efecto de la concentración de sustrato se hizo utilizando las siguientes concentraciones: Cu₂Dimp 0.03mM y amortiguador 0.1M. La variación de la concentración de sustrato se realizó a pH = 7.5 (HEPES).

Las concentraciones de DTBC fueron: 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.1, 1.4 y 2.0mM.

La concentración de catalizador utilizada para la determinación del efecto del pH y la concentración de sustrato fue de 0.03 mM, la cual cae dentro del intervalo en la cual la dependencia de la v_o con la concentración del catalizador es de pseudo-primer orden, por lo que se puede emplear el modelo enzimático de Michaelis-Menten.

A continuación se presenta la gráfica v_o vs [Sustrato] (figura 3.30) y la gráfica $1/v_o$ vs $1/[sustrato]$ (figura 3.31), de la cual se determinaran los parámetros cinéticos.

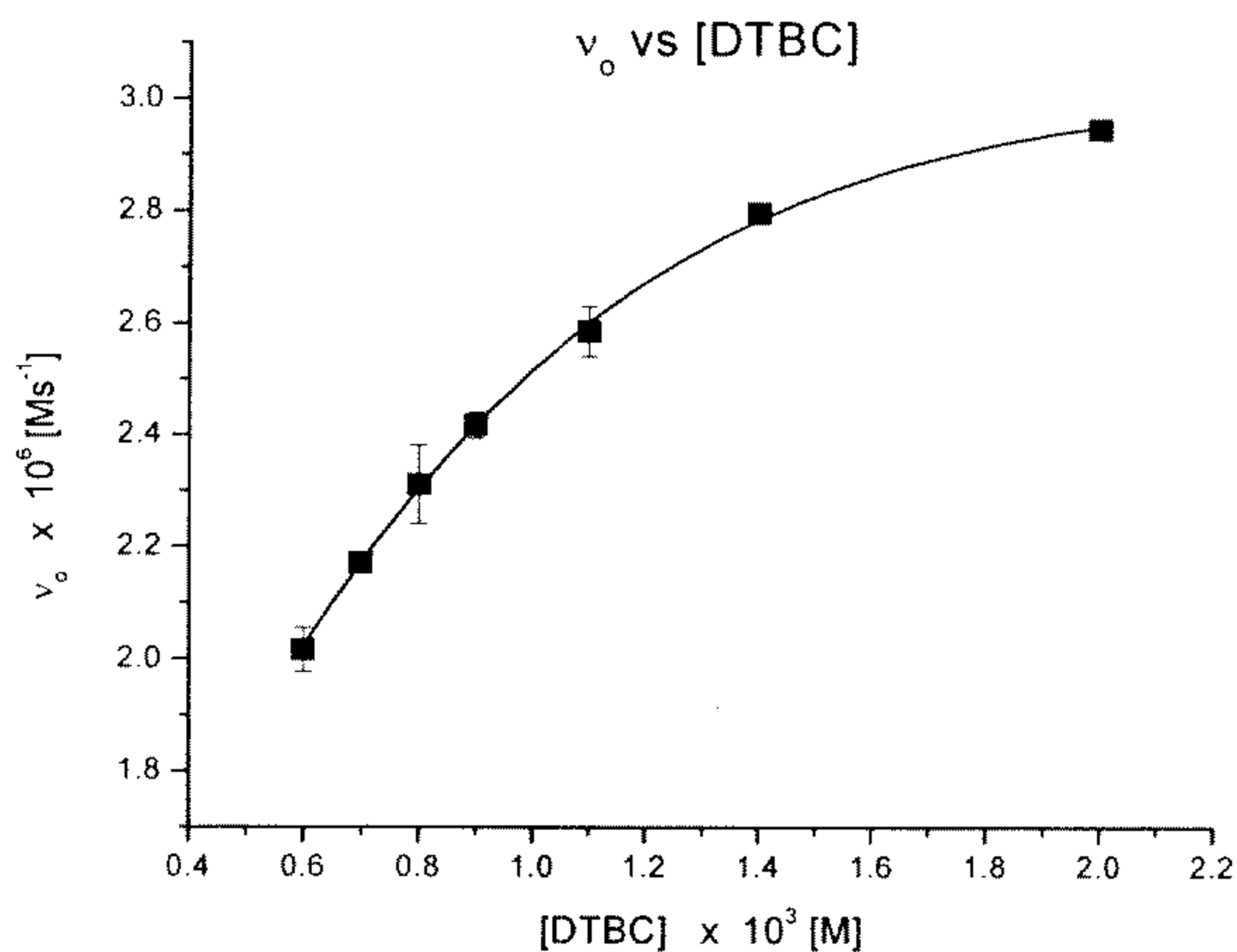


Figura 3.30 Gráfica velocidad inicial vs [DTBC] en MeOH:H₂O a pH = 7.5

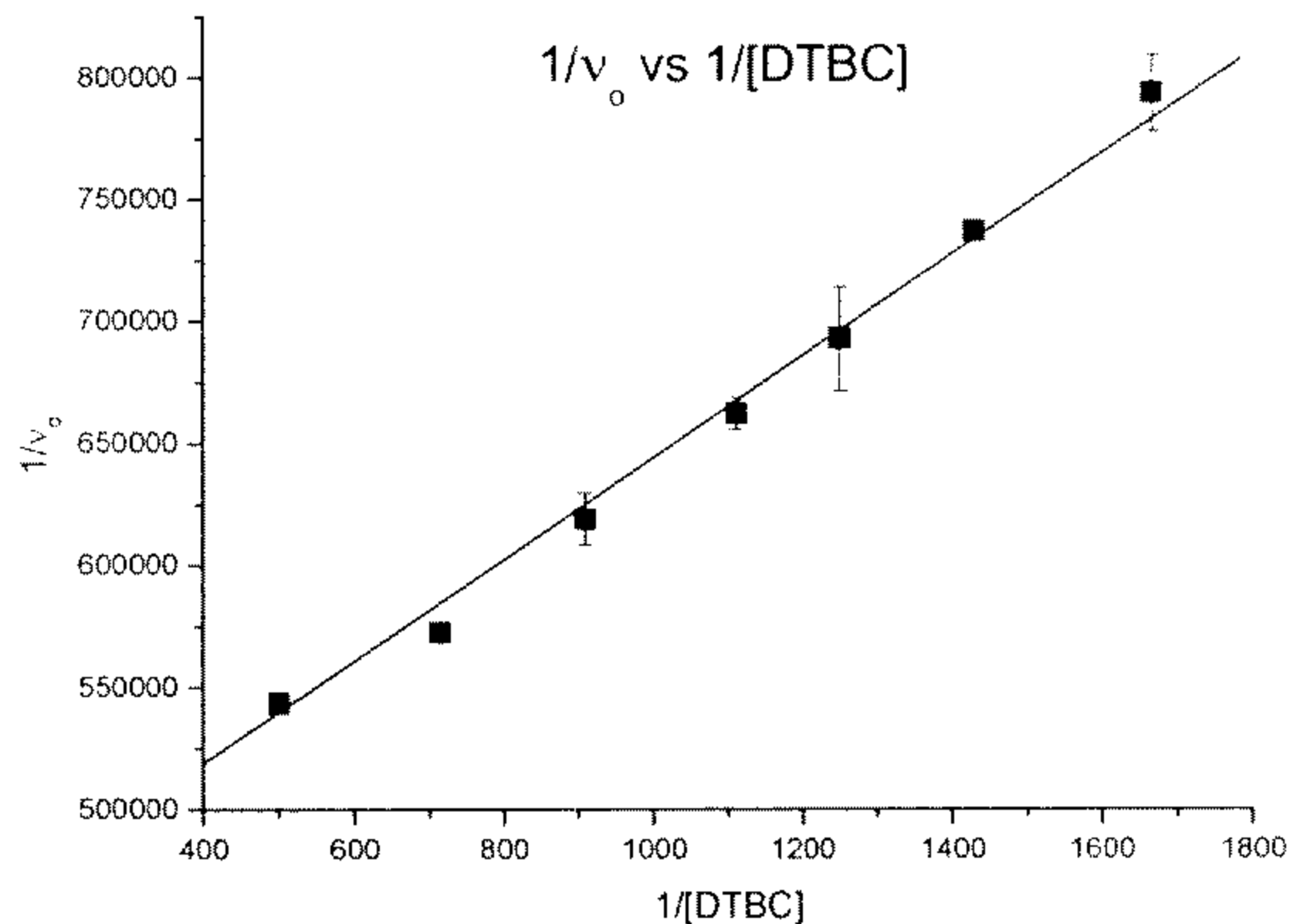


Figura 3.31 Gráfica 1/velocidad inicial vs 1/[DTBC] en MeOH:H₂O a pH = 7.5

Las gráficas v_0 vs [sustrato] mostradas en las figuras 3.24, 3.25 y 3.30 son características de una cinética tipo Michaelis-Menten porque aunque se aumente la concentración de sustrato la velocidad no aumenta linealmente, aparece un efecto de saturación. La saturación se debe a que todos los centros activos están ocupados, lo que provoca que la velocidad de reacción llegue a un máximo y se mantenga constante.

3.4.3 Determinación de los parámetros cinéticos: V_{max} , K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M

La determinación de los parámetros cinéticos se hizo en base al modelo enzimático de Michaelis-Menten.

De las ecuaciones de las rectas obtenidas de las graficas $(1/v_0)$ vs $(1/[S])$ (figuras 3.26, 3.27, 3.31), se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos que se presentan a continuación (tabla 3.14).

Catalizador	pH	Disolvente	V_{max} [Ms ⁻¹]	K_M [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
[Cu ₂ Dimp] ⁴⁺	7.5	MeCN:H ₂ O	7.527E-6	7.2604E-3	0.0251	3.44
	8.5	MeCN:H ₂ O	11.47E-6	2.225E-3	0.0382	34.37
	7.5	MeOH:H ₂ O	2.363E-6	0.516E-3	0.0788	152.61

Tabla 3.14 Parámetros cinéticos obtenidos para el complejo Cu₂Dimp

Los valores de los parámetros mostrados en la tabla anterior pueden ser comparados en función de : la afinidad de la enzima por el sustrato, la transformación del sustrato a producto, la velocidad de reacción y la eficacia del catalizador.

Como las concentraciones de sustrato y catalizador empleadas no fueron iguales en las dos mezclas de disolventes estudiadas, es necesario hacer una corrección para poder comparar los parámetros cinéticos obtenidos en ambos medios.

Como en MeOH:H₂O las concentraciones empleadas fueron diez veces menores que en CH₃CN/H₂O, el valor de V_{max} obtenido, se debe multiplicar por 10, para poder ser empleado en la comparación. Si se hace de esta manera, el valor de V_{max} en MeOH:H₂O es mayor, y por lo tanto en estas condiciones se transforma más rápido el sustrato a producto.

A pH=7.5 en MeOH:H₂O se obtiene la K_M más pequeña, por lo tanto, a este pH y en este medio, la afinidad del catalizador por el sustrato es más alta que en las otras condiciones en las cuales se realizó la reacción catalítica. En MeCN:H₂O a pH =7.5 se observa la K_M más grande, lo que quiere decir que en estas condiciones hay una baja afinidad del catalizador por el sustrato.

Al analizar los valores de la k_{cat} podemos decir que en MeOH:H₂O se tiene una mayor capacidad del catalizador para llevar a cabo la transformación del complejo Cat-S a producto más catalizador.

En todos los casos se obtiene como producto la 3,5-di-*ter*-butil-*o*-quinona.

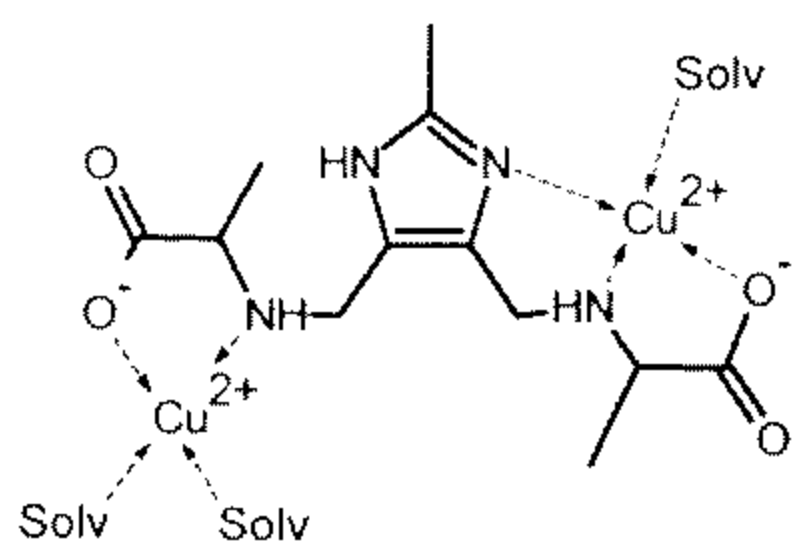
Finalmente, el medio en el cual se obtiene una mayor eficiencia catalítica del complejo (k_{cat}/K_M) es en MeOH:H₂O a pH= 7.5, lo que significa que es en estas condiciones en las que la reacción es más rápida.

Estos resultados muestran que la eficiencia catalítica del sistema modelo depende en gran parte de las condiciones de trabajo en las cuales se lleve a cabo la catálisis.

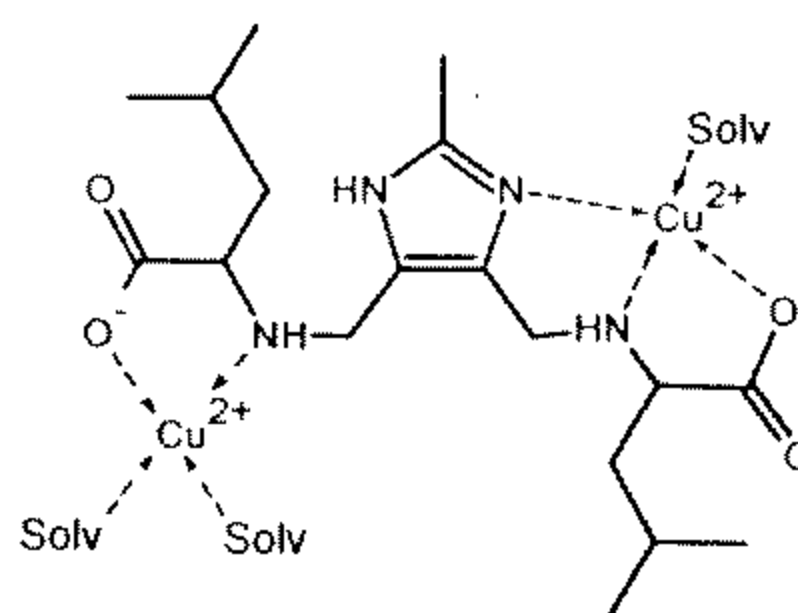
Al comprar el valor de k_{cat}/K_M obtenido para nuestro complejo con otros sistemas modelo derivados de imidazol se puede observar que la eficiencia catalítica del Cu₂Dimp se encuentra entre las más altas.

A continuación se presentan algunos de los complejos obtenidos derivados de imidazol.

Ligantes tipo I "abiertos"

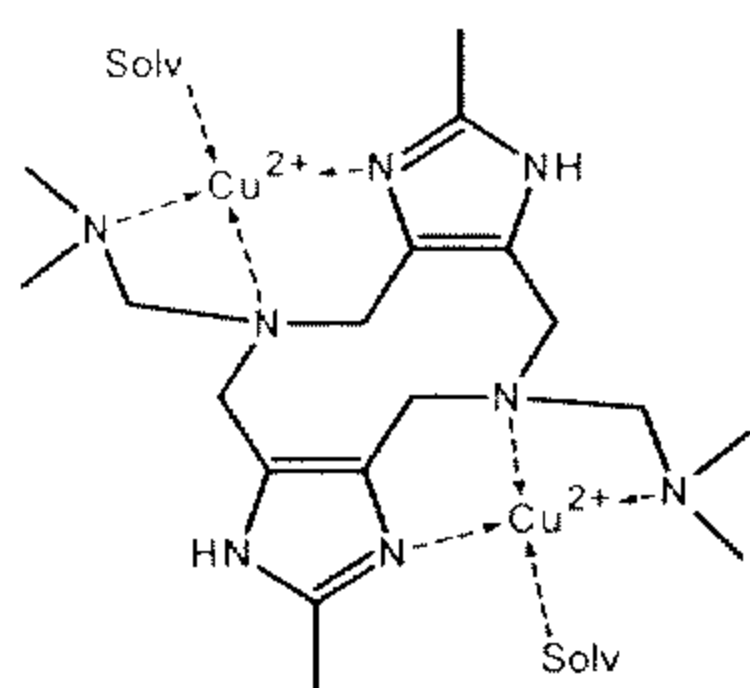


Cu₂Alameim

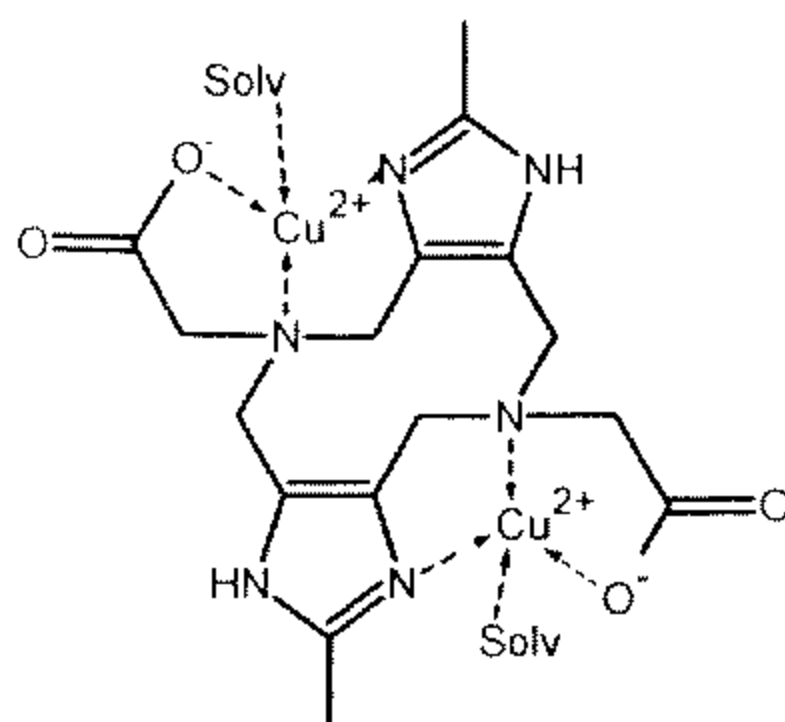


Cu₂Leumeim

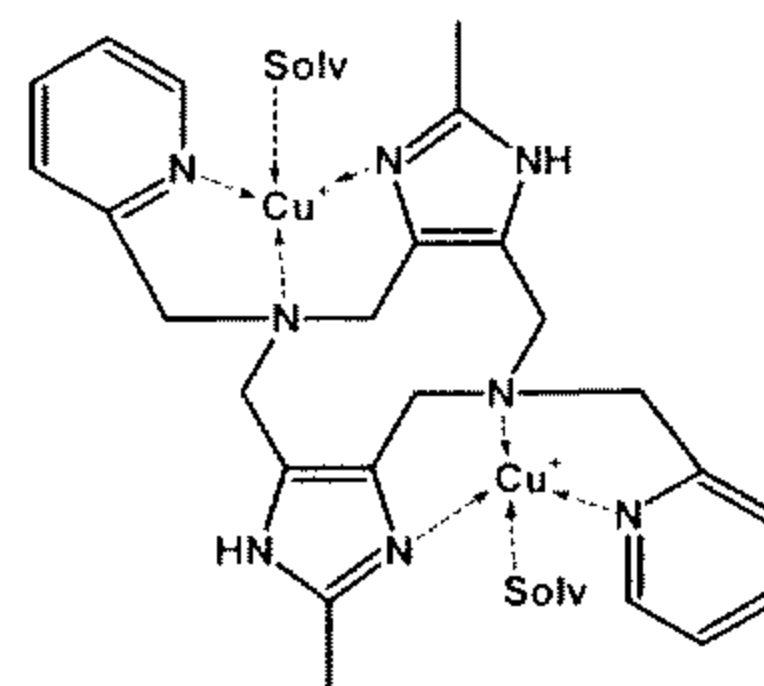
Ligantes tipo II "cerrados"



Cu₂Dimeim



Cu₂Glimeim



Cu₂Dimp

En la siguiente tabla se presentan los valores de k_{cat}/K_M para los sistemas estudiados en nuestro grupo de trabajo y se hace una comparación con el Cu₂Dimp.

Compuesto	Tipo	$k_{cat}/K_M [M^{-1}s^{-1}]$
Cu ₂ leumeim	abierto	1.905
Cu ₂ alameim	abierto	0.92
Cu ₂ glimeim	cerrado	29.62
Cu ₂ dimeim	cerrado	15.53
Cu ₂ Dimp	cerrado	34.37

Tabla 3.15. Valores de k_{cat}/K_M obtenidos en la actividad catecolasa en MeCN:H₂O para distintos compuestos a pH = 7.5.

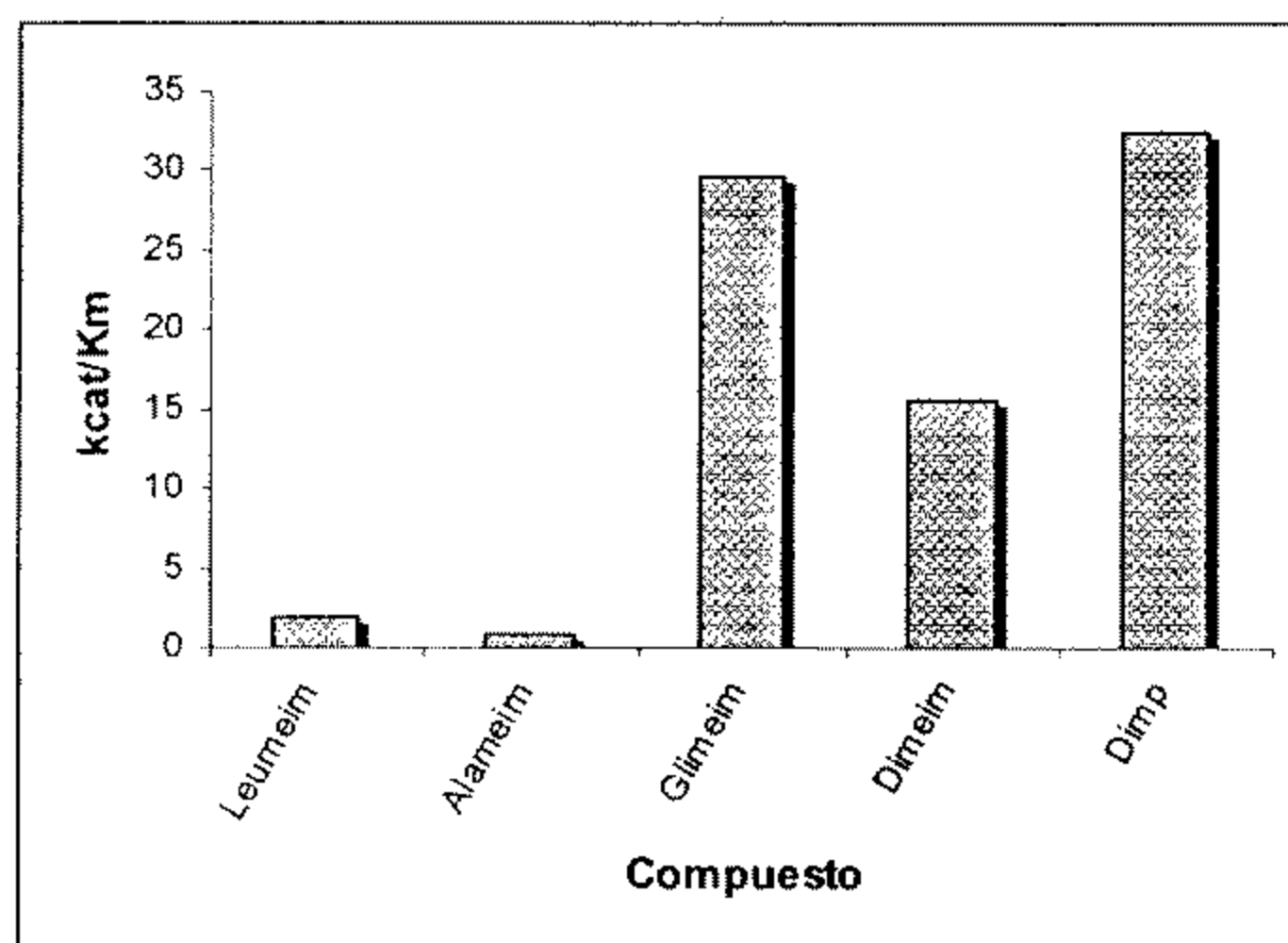


Figura 3.31 Valores de k_{cat}/K_M obtenidos en la actividad catecolasa para distintos compuestos derivados de imidazol en MeCN:H₂O a pH=7.5

Como se puede observar, los valores obtenidos de k_{cat}/K_M para los ligantes de tipo abierto son mucho menores que para los de tipo cerrado, esto quiere decir, que en general, la estabilidad del intermediario complejo-DTBC es menor para los complejos abiertos que para los cerrados, Esto puede relacionarse con la presencia de uno o dos sitios Cu-imidazol, en estos dos tipos de complejos. Es bien conocida la gran afinidad hacia ligantes donadores por oxígeno del cobre coordinado a ligantes heteroaromáticos con marcado carácter de aceptor π , como el imidazol⁴⁴.

Por otra parte, en los sistemas cerrados el Cu₂Dimp es el que presenta, en estas condiciones, la mayor eficiencia catalítica.

En la siguiente tabla se presentan los valores de k_{cat}/K_M para los sistemas cerrados en las mezclas MeCN:H₂O y MeOH:H₂O⁴⁵.

Compuesto	Disolvente	$k_{cat}/K_M[M^{-1}s^{-1}]$
Cu ₂ Glimeim	MeCN:H ₂ O	29.62
Cu ₂ Glimeim	MeOH:H ₂ O	152.41
Cu ₂ Dimeim	MeCN:H ₂ O	15.53
Cu ₂ Dimeim	MeOH:H ₂ O	67.83
Cu ₂ Dimp	MeCN:H ₂ O	34.37
Cu ₂ Dimp	MeOH:H ₂ O	152.61

Tabla 3.16. Valores de k_{cat}/K_M obtenidos en la actividad catecolasa para los ligantes de tipo II "cerrados" en las mezclas MeCN:H₂O y MeOH:H₂O

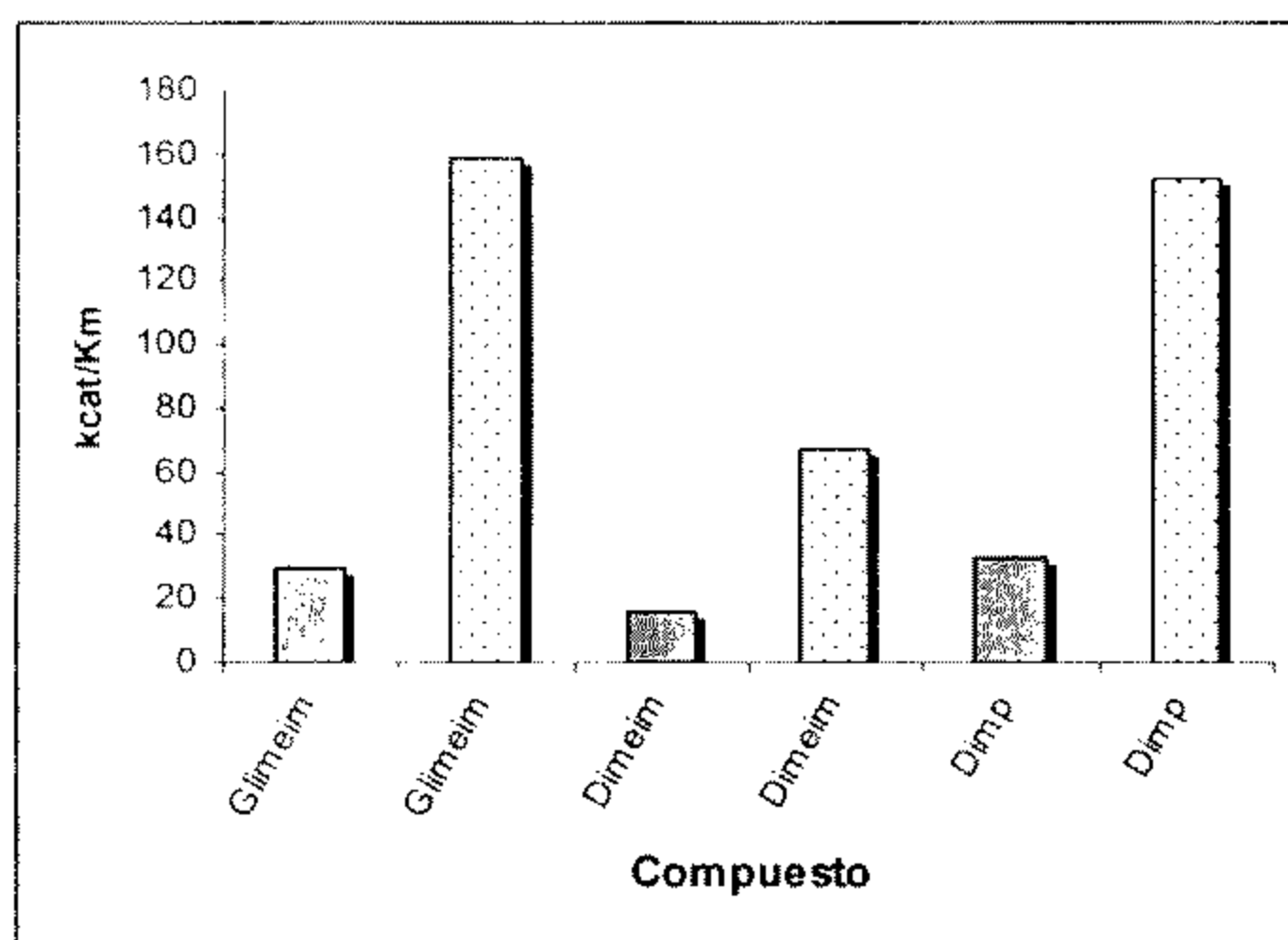


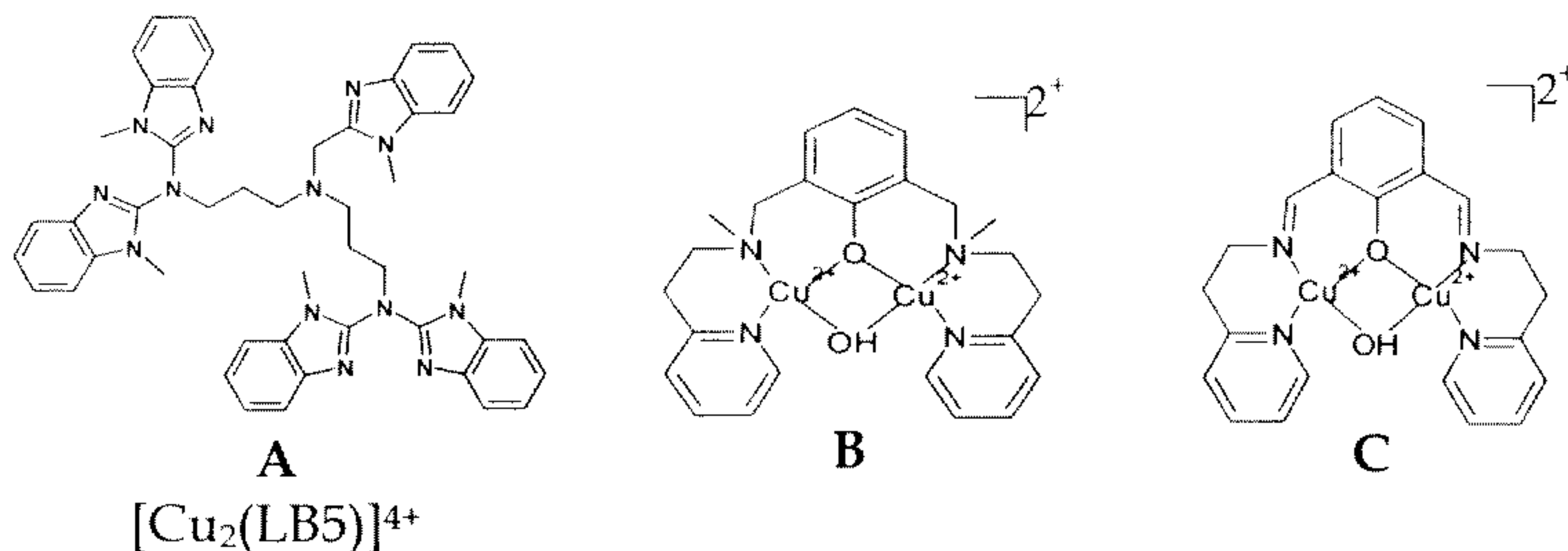
Figura 3.32 Valores de k_{cat}/K_M para distintos compuestos derivados de imidazol. En gris se muestran los valores en MeCN:H₂O y en blanco en MeOH:H₂O

En general se puede ver que los estudios catalíticos realizados en MeOH:H₂O muestran una eficacia catalítica mucho mayor que en MeCN:H₂O, por lo que el disolvente es un factor determinante en una reacción catalítica.

Los ligantes Glimeim y Dimp presentan casi los mismos valores de actividad catalítica, siendo éstos los más altos. Al analizar las estructuras de los ligantes, el Glimeim contiene un grupo carboxilo en el "brazo" del ligante, y el Dimp un grupo aromático que de alguna manera influye en la estabilidad del complejo que se forma.

Por otro lado el Dimeim que también es un ligante tridentado, tiene grupos alifáticos como parte de la estructura del "brazo", obteniéndose una actividad catalítica de aproximadamente la mitad del valor comparado con los dos compuestos anteriores. Aunque aún no se sabe con claridad el mecanismo de la actividad catecolasa, es evidente que los grupos que forman parte de la esfera de coordinación del cobre influyen de manera significativa en el proceso de la oxidación de catecoles.

Al comparar la K_{cat}/K_M para el Cu₂Dimp con otros sistemas modelo para la tirosinasa reportados en la literatura, se puede observar que el complejo con el ligante Dimp presenta una actividad catecolasa intermedia, con respecto a los compuestos que se muestran a continuación **A**⁴⁶, **B**, **C**⁴⁰ y **D**, **E**⁴³:



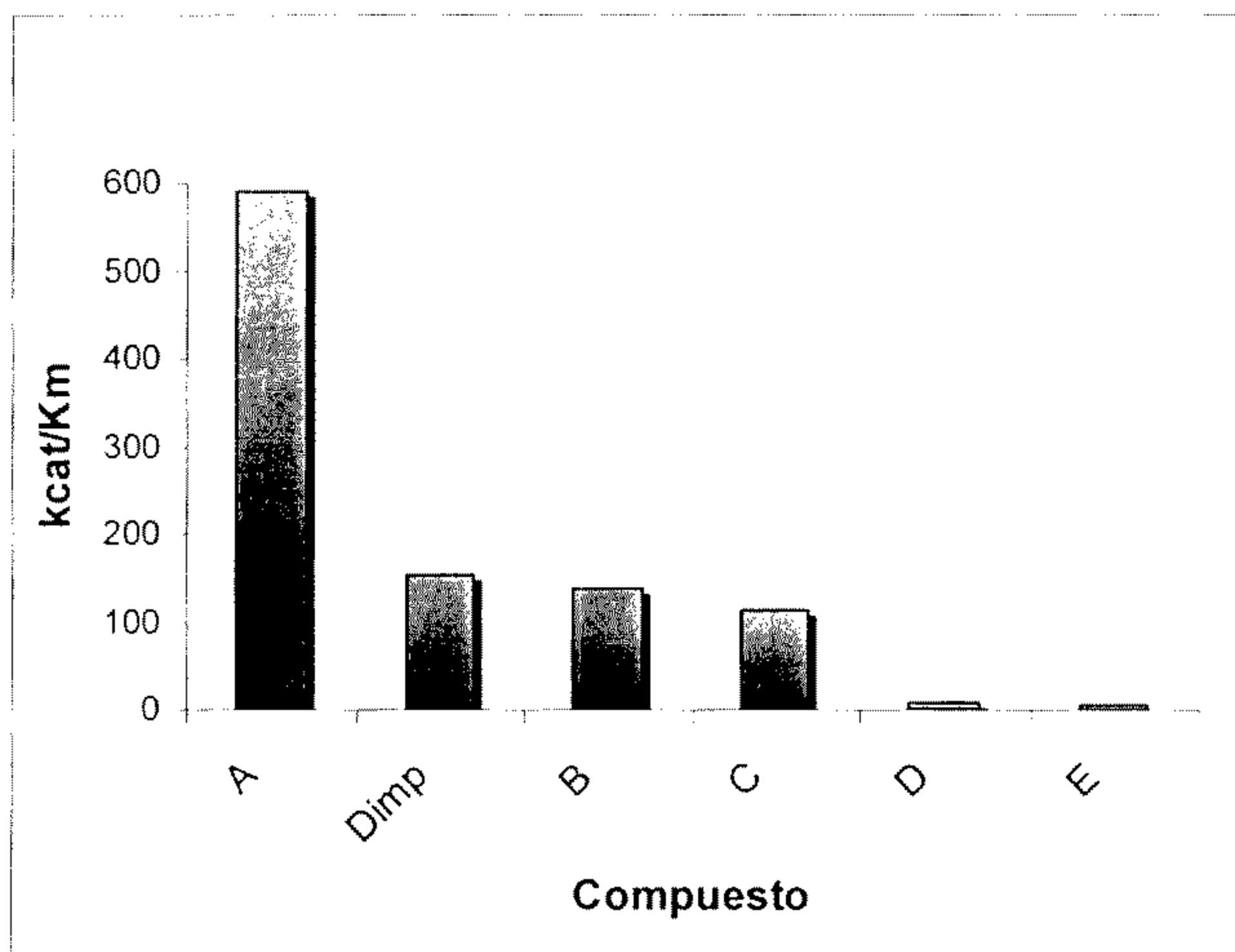
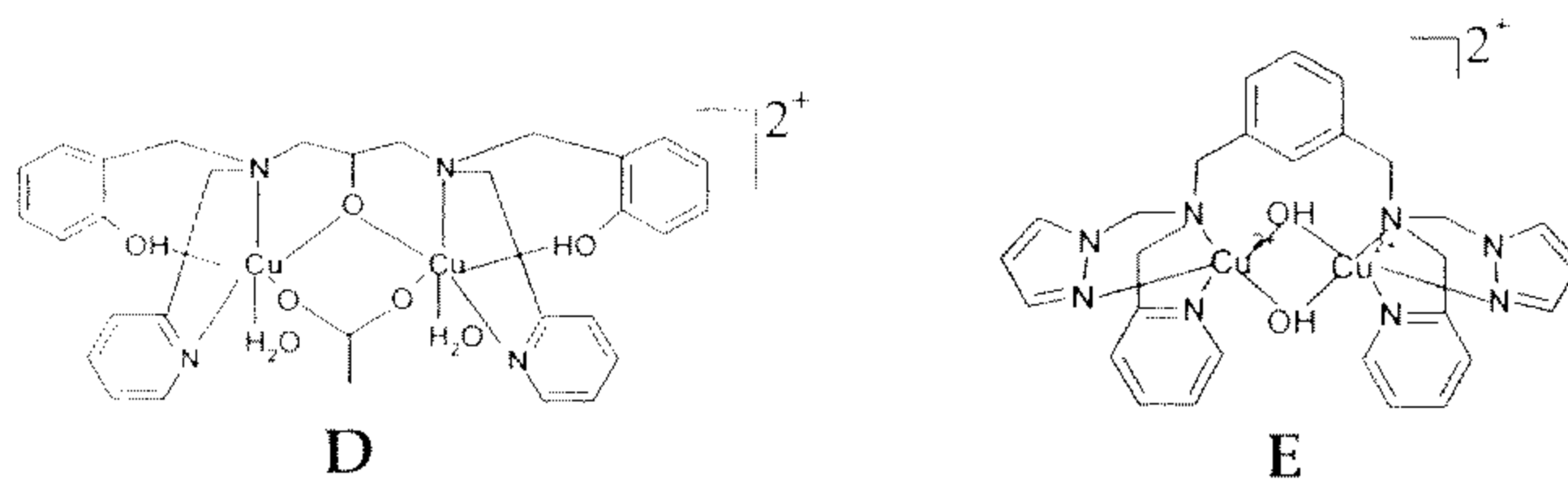


Figura 3.33 Valores de k_{cat}/K_M para distintos sistemas modelo de la tirosinasa reportados en la literatura

Es importante notar que la eficiencia catalítica del complejo Cu_2Dimp es mayor que la de muchos complejos en los que el sitio Cu-OH-Cu se encuentra formado en una misma molécula.

Los valores de k_{cat}/K_M reportados para los sistemas modelo A, B, C, D y E muestran que la actividad presentada en la reacción de oxidación de catecoles, depende de diversos factores como son: pH, disolvente, el potencial redox y consideraciones estéricas, así como la capacidad del metal para adoptar diversas geometrías, y la capacidad de cambiar su número de coordinación ⁴⁷.

5.- *Parte experimental*

5.1 Reactivos

En la síntesis, estudio y caracterización de los compuestos obtenidos se utilizaron los siguiente reactivos:

2-metilimidazol, 99%, Aldrich

2-aminometilpiridina, 99%, Aldrich

Formaldehído al 37%, Mallinckrodt

Hidróxido de sodio, 98.6% J.T. Baker

Hidróxido de potasio, 85%, Aldrich

Ácido clorhídrico, 36.5-38.0% J.T. Baker

Ácido nítrico, 62.5% J.T. Baker

Etanol, 99.9%, J.T. Baker

Metanol grado espectroscópico, 99.9%, Aldrich

Acetonitrilo grado espectroscópico, 99.5%, Aldrich

Nitrato de cobre, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma

Perclorato de cobre, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%, Aldrich

Agua deuterada, 99.9% Aldrich

Nitrato de potasio, KNO_3 , 99% Aldrich

MES, ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico), Sigma

HEPES, ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfónico], Sigma

TRIS, (Tris(hidroximetil)aminometano, Sigma

Agua destilada

5.2 Equipos

Análisis elemental

Los análisis elementales del Dimp y del Cu₂Dimp, que se presentan en esta tesis se obtuvieron en un analizador elemental Fisions EA modelo 1108 de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo para los compuestos Dimp y Cu₂Dimp se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer FTIR 1600 de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

Resonancia magnética nuclear

Todos los espectros presentados en este trabajo se obtuvieron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear de alta resolución Varian Unity Inova operado a 300.2 MHz para H¹ y a 75.3 MHz para ¹³C, en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

Espectrometría de masas

El espectro de masas para el ligante Dimp se obtuvo por la técnica de FAB⁺, utilizándose el espectrómetro de masas de alta resolución Jeol JMS-5X 102 A acoplado a un cromatógrafo de gases en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

Susceptibilidad magnética

Se determinó la susceptibilidad magnética de los compuestos de cobre por medio del método de Gouy, en una balanza magnética Jonson Matthey-Auto para muestra sólida.

Conductividad

La conductividad del complejo Cu_2Dimp se determinó con un conductímetro YSI modelo 3100, la celda utilizada tiene una constante de celda de 1cm^{-1} .

Titulaciones potenciométricas

Las titulaciones para obtener los valores de las constantes de acidez y las constantes de formación se realizaron en un titulador automático 702 SM Titrino.

Difracción de rayos X

La difracción de rayos X del cristal, se realizó en un equipo Siemens P4, en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, con los siguientes parámetros :

Datos del cristal	
Fórmula empírica	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{Cl}_4\text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_{18}$
Color	Prisma azul rey
Tamaño del cristal	0.6 x 0.3 x 0.3 mm
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	$p-1$
Dimensión de la celda Unitaria	$a = 7.3350(10)\text{ \AA}$ $\alpha = 85.160(10)$ $b = 11.4580(10)\text{ \AA}$ $\beta = 77.120(10)$ $c = 14.0490(10)\text{ \AA}$ $\gamma = 81.230(10)$
Volumen	$1136.0(2)\text{ \AA}^3$
Z, Z'	1, 1.446 Mg/m^3
Peso molecular	989.46g/mol
Coefficiente de Absorción	1.242 mm^{-1}

F(000)	502
Recolección de los datos	
Difractómetro usado	Siemens P4
Radiación	Mo-K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$)
Temperatura	293(2) K
Reflexiones colectadas	6745 / 5481 [R(int) = 0.0459]
Coeficiente de extinción	0.004(3)
Intervalos en los índices	-1 $\leq h \leq 9$, -15 $\leq k \leq 15$, -18 $\leq l \leq 18$
Solución y Refinamiento	
Sistema usado	SHELXTL 5.10 y SHELX 97-2
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F ²
Índices finales R	R1 = 0.0815, wR2 = 0.2346
Índices finales R [todos los datos]	R1 = 0.1152, wR2 = 0.2590

5.3 Síntesis

5.3.1 Síntesis del Ligante Dimp

Para la obtención del ligante Dimp se disolvieron 40mmol (3.284g) de 2-metilimidazol, en aproximadamente 70mL de agua, se agitó hasta disolver por completo, a esta disolución se le agregaron 40mmol (4.088mL) de 2-aminometil piridina gota a gota manteniendo una agitación constante, posteriormente se adicionó formaldehído 120mmol(9.0mL) y se llevó a un pH de 11.2 con una disolución de KOH, se adicionó agua destilada hasta obtener un volumen final de aproximadamente 100mL. Esta mezcla se traspasó a matraz bola con tapón y se dejó en un baño de aceite a 65°C con agitación por 4 días, transcurrido ese tiempo se obtuvo el ligante Dimp como un sólido blanco, el cual se filtró y se lavó varias veces con agua destilada. Este compuesto se obtuvo puro.

5.3.2 Síntesis del complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$

La síntesis del complejo $[\text{Cu}_2\text{Dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$ se realizó disolviendo (0.1729g) 2eq. de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 5 mL de mezcla MeCN:H₂O, 1:1, posteriormente a esta disolución se le agregó gota a gota y en agitación constante (0.1g) 1eq. del compuesto Dimp suspendido en la misma mezcla de disolventes, llegando a un volumen final de aproximadamente 10mL. La disolución cambia de un color azul cielo a un color azul intenso conforme se agrega el ligante, esta disolución se filtró para quitar las impurezas y se dejó a temperatura ambiente para evaporar el disolvente, después de unos días se observó un sólido cristalino. Es importante mencionar que estos cristales se deshidratan por lo que siempre deben de estar en el disolvente o una sustancia en la cual no sean solubles.

5.4 Titulaciones potenciométricas.

Para la obtención de las constantes de acidez del ligante y las constantes de formación del Cu_2Dimp , se emplearon disoluciones de NaOH (con una concentración de CO_3^{2-} menor al 2%) y HNO_3 valoradas.

5.4.1 Normalización de la disolución NaOH

La disolución de NaOH se hizo de la siguiente manera: se preparó una disolución de hidróxido de sodio saturada, para la cual se pesaron 5g de NaOH y se disolvieron en agua, obteniendo un volumen final de 5mL, de esta disolución se tomaron 2.5 mL y se colocaron en un matraz de 500mL, el cual se llevó al aforo con H₂O destilada y hervida, para asegurar la mínima cantidad de carbonatos presentes en la disolución de hidróxido de sodio. Es importante que la concentración de carbonatos sea menor al 2% para que no interfiera en los

experimentos y que al momento de determinar los equilibrios no se declare al CO_3^{2-} como una especie presente.

La disolución de NaOH se preparó para obtener una concentración aproximada de 0.1M.

Para la normalización del hidróxido de sodio se utilizó biftalato de potasio como patrón primario, éste se preparó de la siguiente manera: se pesaron 0.4089g de biftalato de potasio y se colocaron en un matraz aforado de 100mL, el cual se llevó al aforo con una disolución de KNO_3 0.1M, para mantener la fuerza iónica constante. De esta disolución se tomaron 25mL con una pipeta volumétrica y se colocaron en la celda del titulador, a la cual se le burbujeo N_2 por 10 minutos antes de empezar con la valoración, manteniendo en agitación constante la disolución hasta el término de la titulación.

El biftalato de potasio se tituló con la disolución de NaOH.

La concentración de la disolución de hidróxido de sodio se determinó de la siguiente manera: 1) se copiaron los datos de la titulación Vol. agregado y pH de la computadora del equipo 702 SM Titrino, y se pegaron en una hoja de calculo, 2) se graficaron los datos Vol. vs pH y se calculó la segunda derivada, cuando ésta es igual a cero, se obtiene el volumen al punto de equivalencia, 3) una vez que se determinó el volumen al punto de equivalencia y sabiendo la concentración exacta del biftalato de potasio, se calculó la concentración de la disolución de hidróxido de sodio, siendo esta de 0.09356N.

5.4.2 Normalización del HNO_3 y determinación del % de CO_3^{2-} en el NaOH

La normalización del HNO_3 se llevó a cabo de la siguiente forma: se preparó una disolución con una concentración aproximadamente de 0.1M, para esto se

tomaron 3.5mL de HNO₃ concentrado (14.5M) y se colocaron en un matraz aforado de 500mL, el cual se llevó al aforo con agua destilada.

De esta disolución se tomaron 25mL con una pipeta volumétrica y se colocaron en la celda del titulador, a la cual se le burbujeo N₂ por 10 minutos, antes de empezar con la valoración, manteniendo en agitación constante la disolución hasta el término de la titulación.

Para la valoración del HNO₃ se utilizó como agente titulante la disolución de NaOH normalizada. La concentración del ácido se obtuvo de manera similar a la del NaOH, obteniendo una concentración de 0.09635N para el ácido nítrico.

La determinación del porcentaje de CO₃²⁻ se realizó utilizando los datos de esta titulación y el método de Gran.

El método de Gran^{48,49} ha probado ser excelente para la determinación de los puntos de equivalencia. En una titulación ideal los puntos anteriores al punto de equivalencia, al aplicárseles la función $\phi = (V+v) \times 10^{-pH}$ deben dar una recta, así como los posteriores al punto de equivalencia al aplicarse la función $\phi = (V+v) \times 10^{pH}$. Las rectas se intersectarán en $\phi = 0$ en el volumen de equilibrio. Sin embargo, si hay carbonato contaminando al hidróxido, los puntos posteriores al punto de equivalencia presentarán una curvatura para finalmente seguir un comportamiento lineal.

Para hacer la determinación del % de CO₃²⁻ se copian los datos de la titulación del ácido Vol._{agregado} (mL) y pH en una hoja de calculo y se añaden dos columnas más en esta hoja, en la primera columna añadida se declaran los valores con la función de Gran $(25+\text{col}(\text{Vol. agregado (mL)})) \times 10^{-(\text{col}(\text{pH}))}$, sólo para los datos antes del punto de equivalencia, y en la segunda columna se declaran los valores de la columna como $(25+\text{col}(\text{V.ml})) \times 10^{(\text{col}(\text{pH}))}$, sólo para los datos después del punto de equivalencia.

Posteriormente se grafica la columna Vol. agregado y la columna con la valores obtenidos al aplicar la función $(25+\text{col}(\text{Vol. agregado (mL)})) \times 10^{-(\text{col}(\text{pH}))}$ de los cuales se obtiene una recta con una ecuación del tipo $y_1 = A + Bx_1$, por otro lado se

hace otra gráfica entre el Vol. agregado y la columna con la valores obtenidos al aplicar la función $(25 + \text{col}(\text{Vol. agregado (mL)})) \cdot 10^{\text{col}(\text{pH})}$, de la cual también se debe obtener una recta con una ecuación $y_2 = A + Bx_2$.

Con ayuda de los datos obtenidos en las regresiones lineales de cada serie de puntos, se calcula el porcentaje de CO_3^{2-} en el NaOH como se muestra a continuación:

Se tiene las dos ecuaciones $y_1 = A + Bx_1$ y $y_2 = A + Bx_2$, entonces, cuando y_1 y y_2 se igualan a cero se obtiene valores de x_1 y x_2 , los cuales alimentan la siguiente ecuación.

$$\frac{x_2 - x_1}{2x_2} = \% \text{CO}_3^{2-}$$

El porcentaje de carbonatos calculado para la disolución de hidróxido de sodio que se utilizó para las titulaciones del Dimp y Cu_2Dimp fue de 1.16 %.

Es importante mencionar que el valor del punto de equivalencia, utilizado para calcular la concentración del HNO_3 y la de la NaOH, es el promedio del valor de los puntos de equivalencia de tres titulaciones, de igual manera el 1.16% de carbonatos es el promedio de los porcentajes calculados de CO_3^{2-} para cada una de las 3 titulaciones.

5.4.3 Titulaciones potenciométricas para la obtención de los pK_a s del ligante.

Para determinar las constantes de acidez del ligante se prepararon 100 ml de una disolución 0.1 M de KNO_3 , posteriormente se pesaron 0.05g de $\text{Dimp} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se colocaron en un matraz aforado de 100 ml, a éste se le agregaron 7.3 ml de ácido HNO_3 normal y se agitó hasta disolver completamente el ligante, una vez disuelto, se llevó al aforo con la disolución de KNO_3 0.1M, para mantener la fuerza iónica constante. Las concentraciones finales fueron: Dimp 1mM y HNO_3 7mM.

De la disolución anterior se tomaron 25ml y se colocaron en la celda del titulador, a la cual se le burbujeo N_2 por diez minutos antes de iniciar con la titulación. Como titulante se utilizó una disolución de hidróxido de sodio con un porcentaje de carbonatos menor del 2%.

La titulación se hizo por duplicado, una vez terminadas las titulaciones, se copiaron los datos de pH y volumen agregado, los cuales son generados por el equipo 702 SM Titrino, y con estos datos el programa hyperquad se obtuvieron los valores de los pK_{as} .

5.4.4 Titulaciones potenciométricas para la obtención de las constantes de formación (β) del Cu_2Dimp .

Para la obtención de las constantes de formación (β) se pesaron 0.05g del ligante Dimp, y se colocaron en un matraz aforado de 100mL, al cual se le agregaron 7.3mL de HNO_3 valorado y 1.0 mL de una disolución de $Cu(NO_3)_2$ estandarizado por absorción atómica 0.1906M, se agitó hasta disolver por completo el ligante y se llevó al aforo con KNO_3 0.1M, para mantener la fuerza ionica constante.

De la disolución anterior se tomaron 25ml y se colocaron en la celda del titulador, a la cual se le burbujeo N_2 por diez minutos antes de iniciar la titulación. Como titulante se utilizó una disolución de hidróxido de sodio normalizada con una concentración 1.16% de carbonatos.

La titulación se hizo por triplicado, una vez terminadas las titulaciones, se copiaron los datos de pH en función del volumen agregado, con estos datos y el programa Hyperquad 2003 se obtuvieron los valores de $\log \beta$.

5.5 Estudio cinético del complejo Cu₂Dimp

El estudio cinético se realizó midiendo la concentración de la 3,5-di-*ter*-butil-*o*-quinona que se producía al avanzar la reacción de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol, por espectroscopía Uv-Vis, en un espectrofotómetro HP Agilent modelo 8453 de arreglo de diodos. En todos los experimentos se utilizaron celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico.

El blanco para cada uno de los estudios estaba constituido por la mezcla y el amortiguador con los cuales se estuviera trabajando.

5.5.1 Estudios en MeCN:H₂O, 1:1

5.5.1.1 En función del pH

El estudio a diferentes pHs se realizó con el fin de obtener el pH óptimo de reacción, para este experimento se prepararon disoluciones amortiguadoras de MES, HEPES y TRIS 0.3M en agua, una disolución de DTBC 60mM en MeCN y una disolución de Cu₂Dimp 0.9mM en MeCN:H₂O.

Las disoluciones amortiguadoras se prepararon de la siguiente manera:

Se prepararon 3 disoluciones 0.3 M de MES, para cada una de las disoluciones se pesaron 0.586g de MES y se colocaron en 3 vasos de precipitado, a cada vaso se le agregaron 7mL de agua y se agitaron constantemente hasta disolver por completo, posteriormente se ajustaron con NaOH y HNO₃ a los pHs 5.5, 6.0 y 6.5, los cuales se determinaron con un pHmetro estandarizado con disoluciones acuosas de buffer, cada disolución se colocó en un matraz de 10ml y se llevó al aforo con agua destilada, obteniendo así tres disoluciones 0.3M de MES a tres diferentes pHs.

De manera similar se prepararon 3 disoluciones de HEPES 0.3M, para cada una de estas disoluciones se pesaron 0.712g y se colocaron en 3 vasos de

precipitado, a cada vaso se le agregaron 7mL de agua y cada una se ajusto con NaOH y HNO₃ a los pHs 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente, cada una de estas disoluciones se colocó en un de matraz de 10ml y se llevó al aforo con agua destilada.

Para la preparación de las 3 disoluciones de TRIS se pesaron 0.364g para cada disolución y se ajustaron a los pHs 8.5, 9.0 y 9.5 con NaOH y HNO₃, posteriormente cada una de las disoluciones se colocó en un matraz de 10ml y se llevaron al aforo con agua.

De esta manera se obtuvieron 9 disoluciones amortiguadoras 0.3M a los pHs 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5.

La disolución de [DTBC]=60mM se preparó pesando 0.667g del DTBC los cuales se colocaron en un vaso de precipitado y se disolvieron en aproximadamente 20mL de MeCN, posteriormente esta disolución se coloca en un matraz aforado de 50ml y se lleva al aforo con MeCN.

Para la preparación de la disolución del [Cu₂Dimp]=0.9mM se pesaron 20.1mg (0.045mmol) del ligante Dimp y se colocaron en un matraz de 50mL, a éste se le agregaron 472.31µL (0.09mmol) de una disolución de Cu(NO₃)₂ 0.1906M de Cu²⁺ y se llevó al aforo con una mezcla de MECN/H₂O 1:1.

Una vez preparadas las disoluciones, se colocaron 1 mL de [Cu₂Dimp], 1mL del DTBC y 1mL de amortiguador en una celda de cuarzo obteniéndose las siguientes concentraciones en la celda:

[Cu₂Dimp]= 0.3mM, [DTBC]= 20mM y [Amortiguador]= 0.1M.

Posteriormente la celda se colocó en un espectrofotómetro y se midió la velocidad inicial de reacción, en este estudio se hicieron 4 mediciones para cada uno de los pHs.

5.5.1.2 En función de la concentración del catalizador a pHs 7.5 y 8.5

Para este experimento se utilizaron disoluciones amortiguadoras de HEPES y TRIS 0.3M, una disolución de [DTBC]= 60mM y disoluciones de [Cu₂Dimp] = 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 y 1.8 mM.

Estas disoluciones se prepararon de la siguiente manera: se pesaron 3.575g de HEPES y se colocaron en un vaso de precipitado, al cual se le agregaron 30mL de agua y se ajustó con HNO₃ y NaOH a pH = 7.5, esta disolución se colocó en una matraz de 50mL y se llevó al aforo con agua destilada. De forma similar se preparó la disolución amortiguadora de TRIS, para la cual se pesaron 1.818g de amortiguador y se ajustó a pH = 8.5, esta disolución se colocó en un matraz de 50 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

La disolución de [DTBC]=60mM se preparó pesando 0.667g del DTBC los cuales se colocaron en un vaso de precipitado, y se disolvieron en aproximadamente 20mL de MeCN, posteriormente esta disolución se coloca en un matraz aforado de 50ml y se lleva al aforo con MeCN.

Para la preparación de cada una de las disoluciones del Cu₂Dimp se hizo una disolución estándar de Cu₂Dimp 18mM, para la cual se pesaron 0.8042g (0.18mmol) de Dimp y se colocaron en un matraz aforado de 100mL, a éste se le agregaron 1.8mL de una disolución de Cu(NO₃)₂ 0.1906M y se llevó al aforo con una mezcla de MeCN:H₂O, 1:1. De esta disolución se tomaron alícuotas que se

diluyeron a 10mL en la mezcla MeCN:H₂O, para preparar disoluciones con diferentes concentraciones. En la tabla 5.1 se describe su preparación.

μL Tomados de la disolución estándar de $[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 18\text{mM}$	Concentración de la alícuota en 10ml [mM]	Concentración del Cu_2Dimp en la celda de reacción [mM]
170	0.3	0.1
335	0.6	0.2
500	0.9	0.3
670	1.2	0.4
835	1.5	0.5
1000	1.8	0.6

Tabla 5.1 Alícuotas de Cu_2Dimp usadas en la preparación de las disoluciones estudiadas.

Una vez preparadas las disoluciones se colocaron 1 mL de $[\text{Cu}_2\text{Dimp}]$, 1mL del DTBC y 1mL de amortiguador en una celda de cuarzo obteniéndose las siguientes concentraciones en la celda:

$[\text{DTBC}] = 20\text{mM}$ y $[\text{Amortiguador}] = 0.1\text{M}$, las concentraciones de cada una de las disoluciones de Cu_2Dimp se muestran en la tabla 5.1.

En este experimento se hicieron 4 mediciones de v_0 para cada una de las concentraciones de Cu_2Dimp a los dos diferentes pHs.

5.5.1.3 En función de la concentración de sustrato a pH = 7.5 y 8.5

Para este experimento se utilizaron disoluciones amortiguadoras de HEPES y TRIS 0.3M, una disolución de $[Cu_2Dimp] = 0.9mM$ y disoluciones de $[DTBC] = 6, 7, 8, 9, 11, 14$ y 20 mM.

Las disoluciones amortiguadoras se prepararon como se describe en la sección 5.5.1.2 y la disolución de $[Cu_2Dimp] = 0.9mM$ se preparó de igual forma que en la sección 5.5.1.1.

Para la preparación de cada una de las disoluciones del DTBC se hizo una disolución estándar de DTBC 100mM, para la cual se pesaron 555.83mg de DTBC y se disolvieron en 15ml de MeCN, esta disolución se colocó en un matraz aforado de 25mL y se llevó al aforo con MeCN. De esta disolución se tomaron alícuotas que se diluyeron a 10mL con MeCN, para preparar disoluciones con diferentes concentraciones. En la tabla 5.2 se describe su preparación.

μl tomados de la disolución estándar de $[DTBC] = 100$ mM	Concentración de la alícuota en 10ml [mM]	Concentración del DTBC en la celda de reacción [mM]
1.8	18	6
2.1	21	7
2.4	24	8
2.7	27	9
3.3	33	11
4.2	42	14
6	60	20

Tabla 5.2 Alícuotas de DTBC usadas en la preparación de las disoluciones estudiadas.

Una vez preparadas las disoluciones se colocaron 1 mL de [Cu₂Dimp], 1mL del DTBC y 1mL de amortiguador en una celda de cuarzo obteniéndose las siguientes concentraciones en la celda:

[Cu₂Dimp]= 0.3mM y [Amortiguador]= 0.1M, las concentraciones de cada una de las disoluciones de DTBC se muestran en la tabla 5.2.

En este experimento se hicieron 4 mediciones de v_0 para cada una de las concentraciones de DTBC a los dos diferentes pHs.

5.5.2 Estudios en la mezcla MeOH:H₂O 1:1

Las disoluciones utilizadas para este estudio fueron 10 veces menos concentradas que en el medio anterior.

NOTA: El estudio en MeOH:H₂O, utilizando las mismas concentraciones que en MeCN:H₂O no fue posible, debido a que se forma un precipitado en la celda al mezclar el buffer, catalizador y sustrato.

5.5.2.1 En función del pH

Para este estudio se prepararon disoluciones amortiguadoras de MES, HEPES y TRIS 0.3M en agua, una disolución de DTBC 6mM en MeOH y una disolución de Cu₂Dimp 0.09mM en MeOH:H₂O.

Las disoluciones amortiguadoras se prepararon de forma similar a las del estudio en la mezcla MeCN:H₂O, este procedimiento se describe en la sección 5.5.1.1. De esta manera se obtuvieron 9 disoluciones amortiguadoras 0.3M a los pHs 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5.

La disolución de [DTBC]=6mM se preparó pesando 0.0667g del DTBC los cuales se colocaron en un vaso de precipitado y se disolvieron en

aproximadamente 20mL de MeOH. Posteriormente esta disolución se coloca en un matraz aforado de 50ml y se lleva al aforo con MeOH.

Para la preparación de la disolución del $[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 0.09\text{mM}$ se pesaron 2mg (0.15mmol) del ligante Dimp y se colocaron en un matraz de 50mL, a éste se le agregaron 23.60 μL de una disolución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ estandarizado con una concentración de 0.1906M de Cu^{2+} y se llevó al aforo con una mezcla de MeOH:H₂O, 1:1.

Una vez preparadas las disoluciones se colocaron 1 mL de $[\text{Cu}_2\text{Dimp}]$, 1mL del DTBC y 1mL de amortiguador en una celda de cuarzo obteniéndose las siguientes concentraciones en la celda:

$$[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 0.03\text{mM}, [\text{DTBC}] = 2.0\text{mM} \text{ y } [\text{Amortiguador}] = 0.1\text{M}.$$

Posteriormente, la celda se colocó en un espectrofotómetro y se midió la velocidad inicial de reacción. En este estudio se hicieron 4 mediciones para cada uno de los pHs.

5.5.2.2 En función de la concentración del catalizador a pH= 7.5

Para este experimento se utilizó una disolución amortiguadora de HEPES 0.3M, una disolución de $[\text{DTBC}] = 6.0\text{mM}$ y disoluciones de $[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15$ y 0.18mM

La disolución amortiguadora se preparó pesando 3.574g de HEPES los cuales se colocaron en un vaso de precipitado y se agregaron 20mL de agua, se agitó hasta disolver y se ajustó con HNO_3 y NaOH a $\text{pH} = 7.5$, esta disolución se colocó en una matraz de 50mL y se llevó al aforo con agua destilada.

La disolución de $[\text{DTBC}] = 6.0\text{mM}$ se preparó pesando 0.0667g del DTBC los cuales se colocaron en un vaso de precipitado y se disolvieron en

aproximadamente 40mL de MeOH, posteriormente esta disolución se coloca en un matraz aforado de 50ml y se lleva al aforo con MeOH.

Para la preparación de cada una de las disoluciones del Cu₂Dimp se hizo una disolución estándar de Cu₂Dimp 1.8mM, para la cual se pesaron 0.0804g (0.18mmol) de Dimp y se colocaron en un matraz aforado de 100mL. A éste se le agregaron 1.89 mL (0.36mmol) de una disolución de Cu(NO₃)₂ estandarizado con una concentración de 0.1906M de Cu²⁺ y se llevó al aforo con una mezcla de MeOH:H₂O 1:1. De esta disolución se tomaron alícuotas que se diluyeron a 10mL en la mezcla MeOH:H₂O, para preparar disoluciones con diferentes concentraciones. En la tabla 5.3 se describe su preparación.

μL tomados de la disolución estándar de [Cu ₂ Dimp] = 1.8mM	Concentración de la alícuota en 10mL [mM]	Concentración del Cu ₂ Dimp en la celda de reacción [mM]
170	0.03	0.01
335	0.06	0.02
500	0.09	0.03
670	0.12	0.04
835	0.15	0.05
1000	0.18	0.06

Tabla 5.3 Alícuotas de Cu₂Dimp usadas en la preparación de las disoluciones estudiadas.

Una vez preparadas las disoluciones se colocaron 1 mL de [Cu₂Dimp], 1mL del DTBC y 1mL de amortiguador en una celda de cuarzo obteniéndose las siguientes concentraciones en la celda:

[DTBC]= 2.0mM y [Amortiguador]= 0.1M, las concentraciones de cada una de las disoluciones de Cu₂Dimp se muestran en la tabla 5.3.

En este experimento se hicieron 4 mediciones de v_o para cada una de las concentraciones de Cu₂Dimp.

5.5.2.3 En función de la concentración de sustrato

Para este experimento se utilizó una disolución amortiguadora de HEPES 0.3M, una disolución de $[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 0.09\text{mM}$ y disoluciones de $[\text{DTBC}] = 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.1, 1.4$ y 2.0 mM .

Las disolución amortiguadora se preparó como se describe en la sección 5.5.2.2 y la disolución de $[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 0.09\text{mM}$ se preparó de igual forma que en la sección 5.5.2.1.

Para la preparación de cada una de las disoluciones del DTBC se hizo una disolución estándar de DTBC 10mM, para la cual se pesaron 0.0556mg de DTBC y se disolvieron en 10mL de MeOH, esta disolución se colocó en un matraz aforado de 25mL y se llevó al aforo con el mismo disolvente. De esta disolución se tomaron alícuotas que se diluyeron a 10mL con MeOH, para preparar disoluciones con diferentes concentraciones. En la tabla 5.4 se describe su preparación.

μl tomados de la disolución estándar de $[\text{DTBC}] = 10 \text{ mM}$	Concentración de la alícuota en 10ml [mM]	Concentración del DTBC en la celda de reacción [mM]
1.8	1.8	0.6
2.1	2.1	0.7
2.4	2.4	0.8
2.7	2.7	0.9
3.3	3.3	1.1
4.2	4.2	1.4
6	6	2.0

Tabla 5.4 Alícuotas de DTBC usadas en la preparación de las disoluciones estudiadas.

Una vez preparadas las disoluciones se colocaron 1 mL de [Cu₂Dimp], 1mL del DTBC y 1mL de amortiguador en una celda de cuarzo obteniéndose las siguientes concentraciones en la celda:

$$[\text{Cu}_2\text{Dimp}] = 0.03\text{mM} \text{ y } [\text{Amortiguador}] = 0.1\text{M}.$$

Las concentraciones de cada una de las disoluciones de DTBC se muestran en la tabla 5.4.

En este experimento se hicieron 4 mediciones de v_0 para cada una de las concentraciones de DTBC.

4.- Conclusiones

➤ La reacción de Mannich de imidazoles en medio básico es adecuada para la síntesis del ligante Dimp, derivado del 2-metilimidazol, formaldehído y la 2-amino metil piridina.

➤ El ligante Dimp es capaz de formar compuestos dinucleares de cobre(II), obteniendo un compuesto de tipo II "cerrado". El complejo aislado con este ligante tiene simetría tetragonal.

➤ La esfera de coordinación tetracoordinada de los iones cobre se completa con ligantes lábiles como agua, permitiendo que este sitio pueda intervenir en catálisis oxidativas.

➤ La formación del complejo Cu_2Dimp , es cuantitativamente estable a pHs ácidos y a partir de $\text{pH}=7$ los equilibrios de hidrólisis empiezan a volverse importantes.

➤ En el intervalo de pH desde 7 hasta 11, coexisten los hidroxocomplejos, los cuales se cree son los responsables de la actividad catalítica.

➤ El valor del momento magnético efectivo que se determinó para el complejo dinuclear de cobre (II) en estado sólido, está por abajo del esperado para dos átomos de Cu (II), lo que significa que existe un acoplamiento antiferromagnético entre los átomos de cobre de tipo intermolecular o intramolecular. Por lo que se propone realizar estudios magnéticos como resonancia paramagnética electrónica (RPE) y estudios de susceptibilidad magnética en función de la temperatura.

- El complejo dinuclear de cobre sintetizado presenta actividad catecolasa.
- La actividad catalítica presentada por el complejo Cu_2Dimp en la oxidación de catecoles está determinada por el disolvente, el pH, y la esfera de coordinación del cobre, observándose una mayor eficiencia catalítica a pHs básicos y en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$.
- Al comparar la eficiencia catalítica de los complejos que forman los ligantes abiertos (un sitio bidentado y otro tridentado) y cerrados (dos sitios tridentados), se observa una mayor eficiencia catalítica en los sistemas cerrados, debido a la mayor estabilidad que presenta un sistema tridentado que incluye a un imidazol .
- El complejo de Cu(II) obtenido presenta una eficiencia catalítica intermedia, con respecto a otros sistemas modelo reportados en la literatura.

6.- Referencias

- 1.- S.J. Lippard, and J.M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry* University Science Books. USA **1994**.
- 2.- R.J.P Williams and J.J.R Fraústo da Silva *The Natural Selection of the Elements. Environment and Life'S Chemistry*, Clarendon Press, Oxford, **1996**.
- 3.- M.V. Linder, C.A Goode, *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, N.Y, **1991**.
- 4.- K. Thomas, E. Christoph and B. Krebs *Nature Structural Biology*. vol 5, No. 12, **1998**.
- 5.- E.I. Solomon, U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, *Chem. Rev.*, 96, 2563-2603, **1996**.
- 6.- A.J, Kirby, *Angew Chem. Int. Ed. Eng.*, 33, 551, **1994**.
- 7.- H.A Hill, *Chem. Brit.*, 12, 119, **1976**.
- 8.- J. Reedijk, P.J. Birker, J. Van Rijn, *J. Mol. Cat.*, 23, 369, **1984**.
- 9.- F. Mani, *Coord. Chem. Rev.*, 120, 325, **1992**.
- 10.- J. Reim, B. Krebs, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 1969, **1994**.
- 11.- N.N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Editorial Pergamon Press, p.p 1364-1392, **1984**.
- 12.- J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter, *Inorganic chemistry. Principles of structure and reactivity*. Oxford University Press-Harla, 4th ed., New York, **1993**.
- 13.- C. Gerdemann, E. Christoph and B. Krebs, *Acc. Chem. Res.*, 35, 183-191, **2002**.
- 14.- E.I. Solomon, M.J. Baldwin and M.D. Lowery, *Chem. Rev.* 92, 521, **1992**.
- 15.- R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, *Chem. Rev.*, 96, 2239, **1996**.
- 16.- M. Fontecave, J.L Pierre, *Coord. Chem. Rev.*, 170, 125-140, **1998**.
- 17.- W. Kain and J. Rall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 43, **1996**.

- 18.- R.A. Turner, C.F. Huebner and C.R. Schools, *J. Amer. Chem. Soc.*, 71, 2801, **1949**.
- 19.- G.B. Bachman and L.V. Heisey, *J. Amer. Chem. Soc.*, 68, 2496, **1946**.
- 20.- T. Kato, T. Morkawa, and Y. Suzuki. *J. Pharm. Soc. Jap.*, 72, 1177, **1952**.
- 21.- F.B. Stocker, J.L. Kurtz, B.L. Gilman, and D.A. Forsyth, *J. Org. Chem.* 35, 883, **1970**.
- 22.- E.E., Mijangos., *Interacción de Cu²⁺ con el ligante 2-metil-bis-4,5-(metil-N-alanil)-imidazol*, Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, **2001**.
- 23.- G. Mendoza-Díaz, D. Willem, J. Reedijk, S. Gorter, L. Gasque, K.R. Thompson. *Inorganica Chimica Acta.* 339, 51, **2002**.
- 24.- G. Mendoza-Díaz, W.L. Driessen, J. Reedijk. *Acta Cryst.* C52,960, **1996**.
- 25.- J.L., Olguin, *Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imizadol y aminas*, Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, **2003**.
- 26.- K.S.,Luna, *Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imizadol y aminoacidos*, Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, **2003**.
- 27.- A.M. Sosa, V.M. Ugalde, I. González, L. Gasque. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 579, 103-111, **2005**.
- 28.- Gasque, L., Mijangos, E., Bernés, S. *Acta Cryst.* E61, m673-m675. **2005**
- 29.- Gasque, L., Olguín, J., Bernés, S. *Acta Cryst.* E61, m274-m276. **2005**
- 30.- K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th ed, John Wiley and Sons, Canada, **1986**.
- 31.- R.J. Angelici. "*Synthesis and Techniques in inorganic chemistry*", University Science Book, California, **1986**.
- 32.- J.A. Chamizo-Guerrero, *Susceptibilidad magnética*, Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, **1976**.
- 33.- R.S. Drago, *Physical methods for chemists*. Saunders College Publishing. 2a edición,. México, **1992**.
- 34.- R.M. Smith, A.E. Martell, *Critical stability constants* Plenum Press, N.Y. USA, **1975**. Vol. 2.

- 35.- I. Polydomenech; *Medusa*, 1998
- 36.- A.L. Lehninger, *Bioquímica*, Segunda Edición, Editorial Omega, p.p. 195-207,
- 37.- W.P. Jeniks, *Catalysis in chemistry and Enzimology*, Brandeis University, New York.
- 38.- C. Fernandes, A. Neves, A.J. Bortoluzzi, A.S. Mangrich, E. Restschler, B. Szpoganicz, E. Schwingel. *Inorg. Chim. Acta*, 320, 12, 2001.
- 39.- E. Monzani, G. Battaini, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Santagostini, G. Nardin, L. Randaccio, S. Geremia, P. Zanello and G. Opromolla, *Inorg. Chem.*, 38, 5359-5369, 1999.
- 40.- J. Mukherjee and R. Mukherjee, *Inorg. Chim. Acta* 337, 429-438, 2002.
- 41.- S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J.L Pierre, E. Saint-Aman, J.M. Latour, L. Le Pape, and D. Luneau, *Inorg. Chem.*, 39, 3526-3536, 2000.
- 42.- C. Belle, C. Beguin, I. Gautier-Luneau, S. Hamman, C. Philouze, J.L. Pierre, F. Thomas, and S. Torelli, *Inorg. Chem.*, 41, 479-491, 2002.
- 43.- A. Neves, M. Liane. Rossi, A. J. Bortoluzzi, C. Wiezbicki, and E. Schwingel, *Inorg. Chem.*, 41, 1788-1794, 2002.
- 44.- a) R. Griesser and H.Sigel, *Inorg. Chem.* 9, 1238 - 1243; 1970.
b) H. Sigel, *Inorg. Chem.* 19, 1411-1413; 1980
- 45.- I. A., Membrillo, *Estudio de las propiedades electroquímicas y catalíticas de complejos dinucleares de Cu(II)*, en trámite.
- 46.- E. Monzani, L. QuintiG. Battaini, A. Perotti, L. Casella, *Inorg. Chem.*, 37, 553-562, 1999.
- 47.- M. Malachowski, H.B. Huyn, L. J. Tomlinson, R.S Kelly, J.W Furbee Jun. *J. Chem. Soc, Dalton Trans*, 31, 1995.
- 48.- F.J.C. Rossotti And H. Rossotti, *J. Chem. Ed.*, Vol. 42, Number 7, 1965.
- 49.- R. Ferrari, *Interacción de Ca²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺ con aminoácidos y péptidos del sitio metálico de la Calbindina*. México 2002, Tesis doctoral, Facultad de Química, UNAM.