



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

**Síntesis de complejos ciclometalados de rutenio(II) y aplicaciones en
bioelectrocatalisis**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Hebert Jesús Estévez Rivera.



TUTOR: Dr. Ronan Le Lagadec

AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Dr. Juan Manuel Fernández González.

VOCAL

Dra. Silvia Elena Castillo Blum.

SECRETARIO

Dr. José Francisco Delgado Reyes.

PRIMER SUPLENTE

Dra. Larissa Alexandrova.

SEGUNDO SUPLENTE

Dra. Erika Martin Arrieta.

Asesor

Dr. Ronan Le Lagadec

Sustentante

Q. Hebert Jesús Estévez Rivera

AGRADECIMIENTOS.

Al **Dr. Ronan Le Lagadec** por el apoyo, tiempo dedicado y conocimientos compartidos.

A los **miembros del jurado** por la revisión del manuscrito y los comentarios.

A **Olga Taran Iourova** por la discusión general del trabajo.

A **Cecilia Franco Rodríguez** por la colaboración realizada en la parte electroquímica.

A la **UNAM**

Al **DGEP** y a **CONACYT** por el apoyo financiero durante mis estudios de Maestría.

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Inorgánica 2 en el Instituto de Química,
UNAM

A mi padre, a mi madre, a mi hermano, a mi
Olga y a los amigos.

INDICE

Contenido	Página
Indice	4
Símbolos y abreviaturas.	7
1. Introducción.	9
2. Antecedentes.	14
2.1. <i>Generalidades del rutenio.</i>	15
2.2. <i>Biosensores.</i>	15
2.2.1. Biosensores enzimáticos.	16
2.2.2. Aplicaciones biomédicas de biosensores.	20
2.2.3. Biosensores de glucosa.	21
2.2.4. Glucosa oxidasa de <i>Aspergillus niger</i> (GO).	23
2.2.5. Mediadores en la transferencia de electrón con glucosa oxidasa.	24
2.3. <i>Complejos de rutenio como mediadores en la transferencia asistida del electrón con glucosa oxidasa.</i>	26
2.4. <i>Complejos (η^6-areno)rutenio.</i>	29
2.5. <i>Reacciones de ciclometalación vía activación del enlace C-H.</i>	29
2.6. <i>Adición de ligantes bidentados nitrogenados a los metalociclos de rutenio(II).</i>	31
2.7. <i>Complejos de hierro como mediadores en la transferencia asistida de electrón con glucosa oxidasa.</i>	33
2.7.1. Síntesis de precursores de hierro.	33
3. Objetivos del trabajo.	35
4. Parte experimental.	37
4.1. <i>Equipo.</i>	38

4.2. Reactivos y disolventes.	38
4.3. Síntesis del complejo ciclometalado $[Ru(Bzq)(NCMe)_4]PF_6$.	42
4.4. Síntesis de los complejo $[Ru(Bzq)(bpy)(NCMe)_2]PF_6$.	45
4.5 Síntesis del complejo $[Ru(Bzq)(phen)(NCMe)_2]PF_6$.	46
4.6 Síntesis de los rutenaciclos $[Ru(Bzq)(N\cap N)_2]PF_6$.	48
4.7. Determinaciones cinéticas.	49
5. Complejos ciclometalados de rutenio(II).	53
5.1. Rutenacilo $[Ru(Bzq)(NCMe)_4]PF_6$.	54
5.1.1. Espectrometría de masas FAB ⁺ .	55
5.1.2. Espectroscopia en el infrarrojo.	56
5.1.3. Resonancia magnética nuclear.	57
5.1.4. Caracterización electroquímica.	58
5.2. Rutenacilo $[Ru(Bzq)(bpy)(NCMe)_2]PF_6$.	62
5.2.1. Espectrometría de masas FAB ⁺ .	62
5.2.2. Espectroscopia en el infrarrojo.	64
5.2.3. Resonancia magnética nuclear.	64
5.2.4. Difracción de rayos X.	65
5.2.5. Caracterización electroquímica.	68
5.3. Rutenacilo $[Ru(Bzq)(Phen)(NCMe)_2]PF_6$.	70
5.3.1. Espectrometría de masas FAB ⁺ .	71
5.3.2. Espectroscopia en el infrarrojo.	73
5.3.3. Resonancia magnética nuclear.	73
5.3.4. Caracterización electroquímica.	74
5.4. Rutenaciclos tipo $[Ru(Bzq)(N\cap N)_2]PF_6$.	76
5.4.1. Espectrometría de masas FAB ⁺ .	77
5.4.2. Espectroscopia en el infrarrojo.	79

5.4.3. Resonancia Magnética Nuclear.	79
5.4.4. Difracción de rayos X.	80
5.4.5. Caracterización electroquímica.	82
5.5. <i>Estudio electroquímico comparativo de los complejos de rutenio(II).</i>	85
5.6 <i>Rutenaciclos solubles en agua.</i>	86
6. Complejos ciclometalados de hierro(II).	92
7. Mediadores.	96
7.1. <i>Rutenaciclo [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆.</i>	98
7.2. <i>Rutenaciclos tipo [Ru(Bzq)(N∩N)(NCMe)₂]PF₆.</i>	99
7.3. <i>Rutenaciclos tipo [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆.</i>	102
8. Conclusiones.	108
9. Perspectivas.	110
10. Bibliografía.	112
11. Anexo.	116

Símbolos y abreviaturas.

Bzq	Benzoquinolina
Bpy	2,2'-bipiridina
Phen	1,10-fenantrolina
44dcbpy	Ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico
55dcbpy	Ácido 2,2'-bipiridina-5,5'-dicarboxílico
4cphen	Ácido 1,10-fenantrolina-4-carboxílico
47dcphen	Ácido 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxílico
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ³¹ P	Resonancia magnética nuclear de fósforo
ATRP	Polimerización controlada por radicales
GO	Glucosa oxidasa
HRP	Peroxidasa de rábano
vs	Con respecto (<i>versus</i>)
ECS	Electrodo de calomel saturado
k_2	Constante de velocidad de intercambio electrónico entre la forma reducida de la enzima y el mediador
FAD	Flavina adenina dinucleótido
DMO-bpy	4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina
DA-bpy	4,4'-diamino-2,2'-bipiridina
DMA-bpy	4,4'-dimetilamino-2,2'-bipiridina
Dmba	N,N-dimetilbencilamina
Phpy	2-fenil-piridina
EM	Espectroscopia de masas
FAB ⁺	Rápido bombardeo atómico
IR	Espectroscopia en el infrarrojo
m/z	Cociente masa y carga
$I_{p_{cat}}$	Corriente de pico catalítico
$I_{p_{ox}}$	Corriente de pico anódico
I_{p_c}	Corriente de pico catódico
δ	Desplazamiento químico
F	Constante de Faraday

s	Señal simple en RMN
d	Señal doble en RMN
t	Señal triple en RMN
hep	Señal héptuple en RMN
m	Múltiples señales en RMN
dd	Señal doble de doble en RMN
td	Señal triple de doble en RMN
ddd	Señal doble de doble de doble en RMN
med	Señal de mediana intensidad en espectroscopia en el infrarrojo
f	Señal de gran intensidad en espectroscopia en el infrarrojo



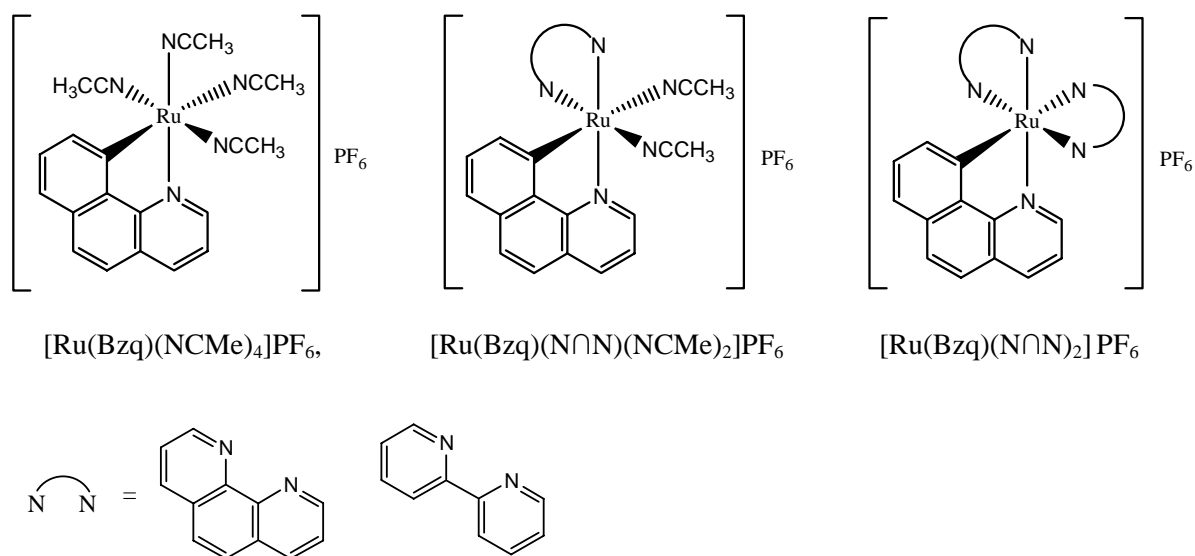
1. Introducción.

1. Introducción.

Los complejos de rutenio(II) han sido empleados en diversas áreas de catálisis: en síntesis orgánica, como catalizadores en la activación asimétrica⁽¹⁻³⁾, en el área de materiales se ha informado la presencia de estos complejos en la polimerización controlada por radicales (proceso ATRP).^(4, 7) En la química bioinorgánica, siendo esta el área de interés del presente trabajo, en el desarrollo de biosensores amperométricos altamente sensibles.^(8, 9)

Recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que algunos complejos ciclometalados de rutenio(II) poseen una elevada actividad en la transferencia asistida de electrones en oxido-reductasas,⁽⁸⁾ lo que permite el desarrollo de biosensores amperométricos altamente sensibles. Una de las características relevantes para que estos metalociclos sean considerados posibles candidatos como agentes redox en la transferencia de electrones con enzimas redox, es la alta estabilidad que presentan las formas oxidada y reducida de la especie catalíticamente activa del rutenociclo con la oxido-reductasa. Es por ello que se lleva a cabo la síntesis de nuevos complejos ciclometalados de rutenio(II) tipo $[\text{Ru}(\text{C}\wedge\text{N})(\text{N}\wedge\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ y tipo $[\text{Ru}(\text{C}\wedge\text{N})(\text{N}\wedge\text{N})_2]\text{PF}_6$ (Esquema 1), en los cuales se ve incrementado el efecto electroceptor π por la presencia de los ligandos nitrogenados aromáticos, favoreciendo en cierta medida, la transferencia asistida del electrón entre el complejo de rutenio(II) y la glucosa oxidasa. Por otro lado, este tipo de compuestos presentan una alta estabilidad entre las formas redox del complejo organometálico como mediador en enzimas redox (presentan reversibilidad en la transición electroquímica de $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$). Para llegar a tener estas características en el complejo se planteó realizar una ciclometalación, debido a que este fragmento ciclometalado le confiere al complejo metálico una alta estabilidad en las formas redox presentes del metalociclo de rutenio(II). Efectuada la ciclometalación se procedió a adicionar ligandos bidentados nitrogenados aromáticos a la esfera de coordinación del centro metálico, estos ligandos han demostrado experimentalmente,⁽⁹⁾ tener un efecto positivo en el desarrollo de mediadores en la transferencia electrónica con oxido-reductasas, debido al carácter electroceptor π de los ligandos sobre el centro metálico.

En el presente trabajo se sintetizaron y caracterizaron 5 nuevos complejos ciclometalados de rutenio(II). A partir del dímero $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$, vía activación del enlace C-H de la posición *orto* a la amina correspondiente (Bzq), se efectuó la ciclometalación, teniendo como complejo resultante al metalociclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$. Posteriormente se efectuó el proceso de adición del ligante bidentado nitrogenado aromático (Bpy y Phen) sobre el rutenaciclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$, para producir los complejos $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ y $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$ respectivamente (Esquema 1).

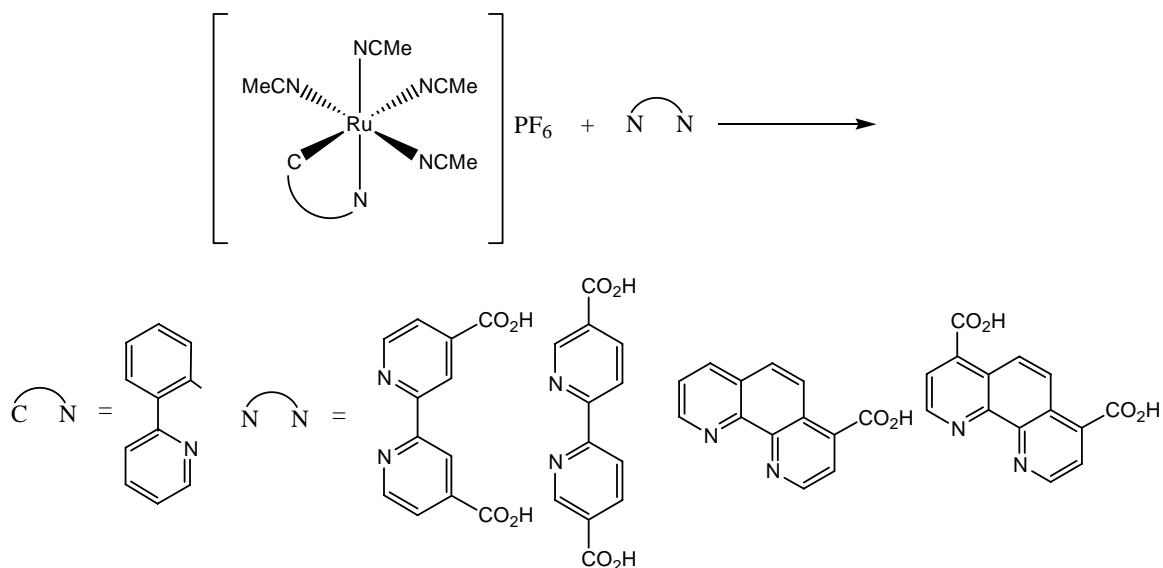


Esquema 1. Estructura generalizada de los metalociclos de rutenio(II) sintetizados en el presente trabajo.

Adicionalmente se realizó un estudio electroquímico de los metalociclos preparados, determinando sus potenciales redox, la estabilidad y reversibilidad que presentaban sus formas oxidada y reducida. Dentro de esta parte electroquímica, se evaluó el comportamiento de mediador que presentaron los complejos ciclometalados de rutenio(II) con la glucosa oxidasa. Para ello fue necesario determinar la velocidad con la que se regenera la forma oxidada de la glucosa oxidasa mediante la reacción de transferencia electrónica efectuada por el complejo organometálico, siendo éste, el paso determinante para que se lleve a cabo el ciclo catalítico del proceso oxidante de la glucosa.

De acuerdo a los altos valores en la constante de intercambio electrónico entre la enzima redox (GO) y los rutenaciclos sintetizados en este trabajo ($k > 10^6$), se intentó aumentar la solubilidad de los complejos ciclometalados de rutenio(II) en agua, para su futura utilización en bioelectrocatalisis en sistemas *in vivo*. Para ello se trató de adicionar

derivados carboxílicos de la 2,2-bipiridina y 1,10-fenantrolina sobre precursores de rutenio(II) (Esquema 2).



Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de metalociclos de rutenio(II) solubles en agua

Bajo otra línea de investigación, se propuso la síntesis de metalociclos de hierro(II), análogos estructuralmente a los rutenociclos preparados en el presente trabajo, para su aplicación en el área de la bioelectrocatalisis.

En el capítulo 2 se dan algunos antecedentes sobre la síntesis de complejos ciclometalados de rutenio y hierro. En este mismo apartado se da una información concerniente a los biosensores enzimáticos, así como la participación que presenta el complejo de rutenio(II) en el proceso catalítico oxidante de la glucosa y la importancia que conlleva el determinar eficientemente este metabolito en el organismo.

En el capítulo 3 se plantean los objetivos del presente trabajo y en el capítulo 4 se plantea el procedimiento experimental.

En el capítulo 5 se discute sobre la síntesis y caracterización de los complejos ciclometalados de rutenio(II) sintetizados en el presente trabajo, mientras que en el capítulo 6 se plantea la discusión para la síntesis de metalociclos de hierro(II).

En el capítulo 7 se determina la constante de transferencia electrónica entre los rutenociclos sintetizados y la glucosa oxidasa, con ello se evalúa el carácter de mediador de los metalociclos. Finalmente se plantean las conclusiones y las perspectivas del trabajo.

Una información adicional consistió en añadir un anexo, el cual contiene información concerniente con la caracterización de los metalociclos de rutenio(II) sintetizados en el presente trabajo.

2. Antecedentes.

2.1 Generalidades del rutenio.⁽¹⁰⁾

El rutenio pertenece a la segunda serie de transición, se encuentra en el grupo VIIIA de la tabla periódica y posee una configuración electrónica basal $[\text{Kr}]4d^75s^1$.

Uno de los compuestos comercialmente disponible es $\text{RuCl}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_n$, el cual será empleado como materia prima para la formación de los metalociclos de rutenio(II) presentados en este trabajo.

Los estados de oxidación más representativos para este elemento son el 0, +2 y +3, mientras que las geometrías presentadas por los complejos de rutenio son diversas. En el caso de complejos de rutenio(II), presentan por lo general una geometría octaédrica y propiedades diamagnéticas. Por otro lado, los complejos de rutenio(III) son paramagnéticos y generalmente tienen geometrías octaédricas.

2.2 Biosensores.

El mejoramiento de la calidad de vida es uno de los objetivos más relevantes de los esfuerzos globales en investigación. Naturalmente la calidad de vida está relacionada con el control de los decesos, la calidad en los alimentos y la del medio ambiente. Es por ello que es necesario una continua, rápida y sensible determinación de los parámetros que afectan la calidad de las áreas anteriormente señaladas. Los biosensores cubren las necesidades planteadas con anterioridad, por el hecho de que están constituidos por un compuesto (reconocedor biológico) que reacciona de manera específica con el analito de interés, además de que el biosensor, a través de un transductor, ofrece una sensible y rápida respuesta para la determinación de los parámetros que afectan a la calidad de vida.

El reconocimiento biológico que efectúa el compuesto que se encuentra contenido en un biosensor consiste en interactuar de forma específica con el analito, asegurando con ello, la selectividad del sensor. Estos elementos se pueden clasificar de la manera siguiente: Los biocatalizadores, dentro de los cuales se encuentran las enzimas, microorganismos y ciertos tejidos vivos, la segunda clase está conformada por los

bioligantes, que vienen siendo los anticuerpos, ácidos nucleicos y las lectinas. La aplicación de los bioligantes llega a ser limitada, debido a la existencia y a los métodos eficientes para la preparación (separación, purificación, viabilidad de microorganismos o de células vivas) de estos compuestos. Los transductores convierten la respuesta biológica resultante de la interacción del analito con el biocatalizador o bioligante en una señal cuantificable. Los transductores tradicionales llegan a ser de tipo electroquímico, óptico y térmico. La última generación de biosensores combina los principios de medición clásicos con fenómenos piezoeléctricos y transductores magnéticos.⁽¹¹⁾ La selectividad de un biosensor con el analito está determinada por el reconocedor biológico, mientras que la sensibilidad del biosensor está influenciada por el transductor.

Existen pocos casos informados en los cuales se tiene la presencia de una comunicación directa entre el reconocedor biológico y el transductor, por ejemplo la peroxidasa o pirroloquinolina quinona deshidrogenasa (reconocedores biológicos enzimáticos) con un transductor amperométrico.⁽¹²⁾ Es por ello que en los sistemas actuales, los reconocedores biológicos, enzimas^(13, 14) o células vivas⁽¹⁵⁾, y los transductores amperométricos están comunicados mediante un compuesto intermediario, denominado mediador, el cual cumple la función de intercambiar electrones entre el reconocedor biológico y el transductor amperométrico. Por otro lado, el mediador incrementa la selectividad y sensibilidad del biosensor. Esta es una de las razones por las cuales recientemente los biosensores emplean un sistema: reconocedor biológico, mediador y un transductor de naturaleza amperométrica (reconocedor biológico-mediador-transductor).

2.2.1 Biosensores enzimáticos.

Los biosensores más empleados son los que manejan un sistema enzimas-mediador-transductor amperométricos.⁽¹²⁾ Estos biosensores dependen en gran medida de la naturaleza del mediador, así como del método de inmovilización utilizado. De acuerdo con este contexto, los biosensores pueden clasificarse en primera, segunda y tercera generación, respectivamente (Figura 1).

Los biosensores de primera generación incluyen solamente la entidad de reconocimiento biológico y el transductor amperométrico. Uno de los reconocedores biológicos enzimáticos con mayor aplicación tecnológica en biosensores es la glucosa oxidasa. También se conoce que el co-sustrato natural para esta enzima es el oxígeno, el cual es transformado a peróxido de hidrógeno durante la reacción con el sustrato (glucosa). En relación al caso señalado anteriormente, la entidad de reconocimiento biológico y el transductor deben ser polarizados hacia un potencial apropiado, para no reducir el oxígeno molecular o el peróxido de hidrógeno generado durante el proceso catalítico. De tal manera que la corriente registrada es proporcional a la concentración del sustrato. El principal inconveniente de esta propuesta consiste en que la selectividad del elemento de reconocimiento biológico se encuentra vinculada con la baja selectividad de la detección electroquímica provocada por el voltaje aplicado. También hay que considerar que pequeñas concentraciones de oxígeno en muestras reales pueden ser el factor limitante en la realización de estas mediciones.

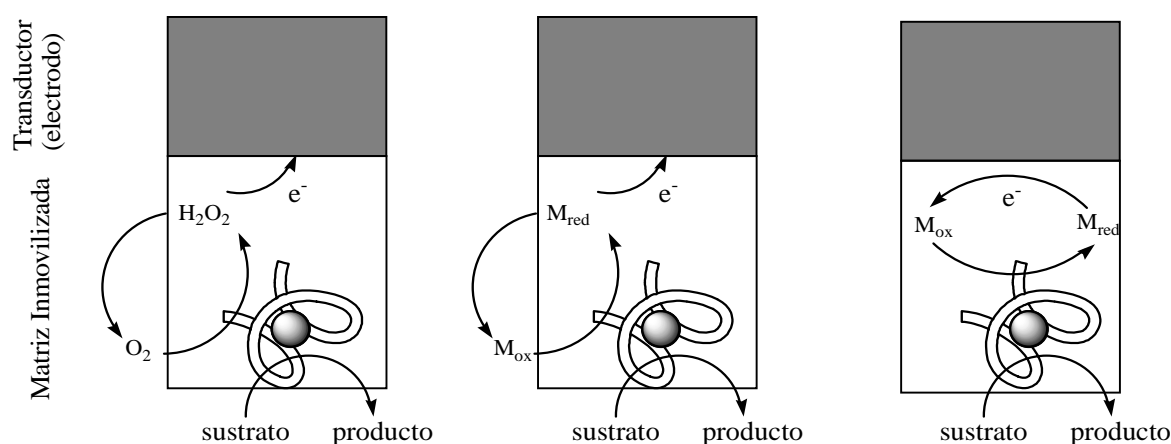


Figura 1. Principio de trabajo de diferentes generaciones de biosensores amperométricos enzimáticos.

Para minimizar las fuentes de error y la complejidad en el diseño de un biosensor amperométrico de glucosa fundamentado en el ejemplo anteriormente señalado (biosensor de primera generación), se reemplaza el co-sustrato natural (oxígeno molecular), por un mediador artificial de naturaleza redox, el cual posee una afinidad por la enzima (GO), así como un adecuado potencial redox para regenerar la forma catalítica de la glucosa oxidasa, esta es la idea que está detrás de los biosensores de segunda generación. Estos biosensores emplean mediadores libremente difusos en el medio (no se encuentran inmovilizados sobre una superficie transductora) para la determinación cuantitativa del analito, que en el caso señalado es la glucosa. Estos mediadores, en su mayoría, poseen un potencial redox

superior a los -100 mV vs ECS, donde el oxígeno molecular no presenta un comportamiento electroactivo.

Un mediador redox ideal tiene que presentar una forma oxidada y reducida estable, una rápida velocidad de intercambio del electrón con la enzima, así como una rápida respuesta con la superficie del electrodo. En la Tabla 1 se muestran algunos de los mediadores comúnmente empleados, sus respectivos potenciales redox y sus constantes cinéticas para glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (GO) y peroxidasa de rábano (HRP), un complemento de la Tabla 1 es la Tabla 3 (página 21), en la cual se muestran compuestos de rutenio que tienen un comportamiento de mediador con óxido-reductasas. Los mediadores más empleados llegan a ser compuestos inorgánicos, orgánicos u organometálicos. Dentro de estos últimos se encuentran los derivados del ferroceno, los cuales fueron los primeros mediadores que contenían un metal de transición en su estructura.⁽¹⁶⁾ Posteriormente los compuestos de osmio(II)^(17, 18) y recientemente los de rutenio(II)⁽⁸⁾ han mostrado una óptima actividad como mediadores en la transferencia asistida de electrones con las enzimas redox.⁽⁸⁾ Una de las características que favorece a los compuestos organometálicos como mediadores, es su alta velocidad de auto-intercambio de electrones.⁽¹⁹⁻²¹⁾ Experimentalmente se ha observado que la velocidad en la transferencia de electrón con la oxido-reductasa es una consecuencia de la rigidez en la esfera de coordinación del centro metálico.⁽²²⁾

En general se tienen algunos problemas con los biosensores de segunda generación cuando los análisis son desarrollados en sistemas complejos (en la industria de alimentos o para aplicaciones médicas), en donde es posible tener una contaminación de la muestra con un agente que también pueda intercambiar electrones con la enzima, interfiriendo con la respuesta amperométrica, esto último debe ser estrictamente evitado. Es por ello que se tienen los biosensores de tercera generación, en donde el mediador está integrado junto con la enzima y el electrodo en una matriz dentro del electrodo. Existen diversos métodos para fijar los mediadores redox, así como los reconocedores biológicos enzimáticos a la matriz del electrodo: mediante procesos de adsorción, mezcla con pasta de carbón o mediante una red polimérica.⁽¹⁶⁾ En todos los procesos anteriormente mencionados se corre el riesgo de desnaturalizar a la enzima, conllevando en algunos de los casos a la pérdida de especificidad, así como de la sensibilidad dentro del proceso analítico desarrollado. Es por ello que implementar biosensores de tercera generación llega a ser una tarea difícil.

Tabla 1. Ejemplos de algunos de los mediadores redox más utilizados, sus potenciales redox y sus constantes de intercambio de electrón con las oxido-reductasas correspondientes.

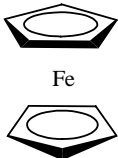
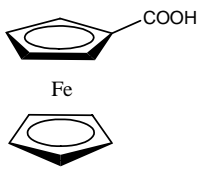
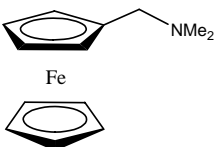
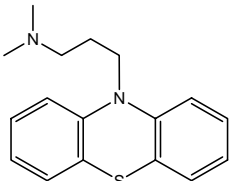
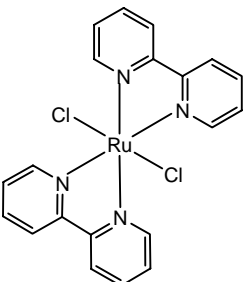
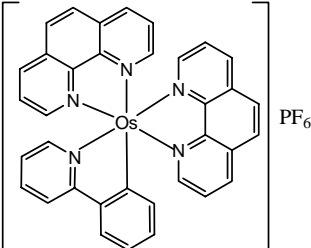
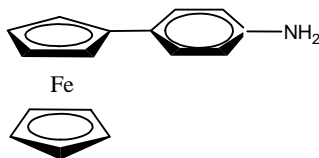
Mediador		Potencial redox (mV vs ECS)	k_2 para GO oxidación ($M^{-1}s^{-1}$) ^{ref}	k para HRP reducción ($M^{-1}s^{-1}$) ^{ref}
Ferroceno		210	$5 * 10^5$ ⁽²²⁾	$2 * 10^5$ ⁽²³⁾
Ácido carboxil ferroceno		290	$1.5 * 10^5$ ⁽²⁴⁾	$1.1 * 10^4$ ⁽²⁵⁾
Dimetilamino metil ferroceno		370	$5.25 * 10^5$ ⁽²⁴⁾	$2.5 * 10^3$ ⁽²⁵⁾
Promazina		530	$2.8 * 10^6$ ⁽²⁴⁾	
[Ru(bpy) ₂ Cl ₂]		300	$1.8 * 10^5$ ⁽²⁶⁾	
[Os(phpy)(phen) ₂] ⁺ PF ₆ ⁻		100 (vs Ag/AgCl)	$1.1 * 10^7$ ⁽²⁷⁾	
<i>p</i> - Ferrocenilnilina		245		$2.4 * 10^7$ ⁽²⁸⁾

Tabla 1 (continua).

Mediador	Potencial redox (mV vs ECS)	k_2 para GO oxidación ($M^{-1}s^{-1}$) ^{ref}	k para HRP reducción ($M^{-1}s^{-1}$) ^{ref}
[Os(Me ₂ bpy) ₂ Cl ₂]	150	$1.2 * 10^5$ ⁽²⁶⁾	
Tetratiafulvaleno	150	$1.28 * 10^7$ ⁽⁹⁾	
Azul de metileno	30	$1.86 * 10^4$ ⁽⁹⁾	
1,4-Bis(<i>N,N</i> -dimetilamino)benceno	450	$1.2 * 10^6$ ⁽⁹⁾	
1,4-Benzoquinona	275	$1.97 * 10^5$ ⁽²⁹⁾	
4,4'-Dihidroxibifenilo	320	$3 * 10^5$ ⁽³⁰⁾	

2.2.2 Aplicaciones biomédicas de biosensores.

Existe una variedad de sustratos que funcionan como reconocedores biológicos y transductores en el área de la medicina, donde los biosensores amperométricos exhiben un óptimo comportamiento. Sus aplicaciones involucran monitoreo continuo *in-vivo* de concentraciones de glucosa en humanos,⁽³¹⁾ así como el monitoreo de reacciones bioquímicas a nivel celular,⁽³²⁾ dos áreas en las que se mostraba una notable dificultad para alcanzar estos objetivos unos años atrás. En este mismo contexto, los biosensores poseen cuatro grandes ventajas sobre otros métodos analíticos tradicionales:

-
- Son propensos a la miniaturización. Esto es de gran importancia porque las muestras biológicas están disponibles en pequeñas cantidades, además de que si se desea monitorear *in-vivo*, debe ser mínimo el daño hecho al tejido para introducir el biosensor.
 - La detección del analito se realiza sin preparar la muestra a determinar.
 - Los biosensores se caracterizan por breves tiempos de respuesta.
 - La facilidad de emplear este tipo de dispositivos.

En comparación con otros métodos analíticos los biosensores exhiben pocos inconvenientes en relación a las aplicaciones biomédicas.

- Poseen reducida estabilidad, ya que las enzimas son removidas de su medio natural y tienden rápidamente a perder su actividad, limitando la vida útil del biosensor.
- La existencia de interferencias electroquímicas debido a la complejidad de las muestras biológicas trabajadas. Por lo que es necesario modificar la interfase de los electrodos, para favorecer exclusivamente el proceso redox de interés.
- La posibilidad al rechazo biológico para la realización de las mediciones *in-vivo*.

2.2.3 Biosensores de glucosa.

La *diabetes mellitus* afecta a 150 millones de personas en el mundo y de acuerdo a lo reportado por la Organización Mundial de la Salud se calcula que para el 2025 habrá 300 000 000 de personas que padezcan *diabetes mellitus* en el orbe.⁽³³⁾ Teniendo esto en cuenta, los biosensores de glucosa llegan a ser los primeros en dejar la etapa de interés científico y empiezan a tener un enfoque comercial, ya que permiten conocer en un breve tiempo la concentración de glucosa en el organismo, de tal forma que sea posible controlar, de manera oportuna, su nivel en la sangre. Hoy en día se espera desarrollar biosensores redox de bajo costo, que sean utilizables en más de una ocasión y que exista la posibilidad de una autoevaluación casera. En la Tabla 2 se muestran algunos biosensores comerciales.

Tabla 2. Compañías que producen biosensores comerciales para aplicaciones biomédicas.

Compañía	Analitos	Observaciones	Disponibilidad de productos
LifeScan Inc.	Glucosa, colesterol	Tiras portátiles. El resultado lo muestra en 5 segundos, se combina con una dosis de insulina.	http://www.lifescan.com/products/te-strips/onetouch/
DuPont	Glucosa, colesterol, lactato	Comercializa materiales para biosensores.	http://www.dupont.com/mcm/product/biosensors.html
Cygnus	Glucosa	A través de la piel (iontoforesis) determina en 10 minutos la concentración del analito	http://www.glucowatch.com
MediSense (Abbott Laboratorios)	Glucosa	Tiras, exhibe el resultados después de 10 minutos	http://www.medisense.com
MiniMed	Glucosa	Portátil, Comunicación inalámbrica con una bomba de insulina	Paradigm; http://www.minimed.com
Nova Biomedical Corp.	Glucosa, lactato, glutamina, glutamato	Estación de trabajo	http://www.novabio.com
I-Stat Corp.	Glucosa	Estación automatizada, trabaja 475 pruebas por hora, portátil y de cartuchos que incluyen soluciones estandar.	i-Stat; http://www.istat.com
Yellows Springs Inst.	Glucosa, lactato, glutamato, glutamina	Uno de los primeros biosensores que se comercializaron por YSI	Clinical Analyser; Sport lactate Analyser; http://www.ysi.com
Bayer	Glucosa	Tiras	http://www.bayerdiagnostics.com
BST	Glucosa, lactato, ácido úrico, ácido ascórbico.	Comercializa biosensores (Electrodos enzimáticos)	http://www.bst-biosensor.de
Home Diagnostics Inc.	Glucosa	Portátil	TrueTrack Smart; Prestige Smart; http://www.prestigesmartssystem.com

2.2.4. Glucosa Oxidasa de *Aspergillus niger* (GO).

La glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* pertenece al grupo de las oxido-reductasas. Estructuralmente es un homodímero con peso molecular de 160 kDa y se encuentra altamente glicosilada (16% peso/peso).⁽³⁴⁾ La molécula monomérica es una esfera compacta con dimensiones aproximadas de 60 Å x 52 Å x 37 Å. La GO contiene dos grupos prostéticos de FAD (flavina adenina dinucleótido), los cuales están fuertemente unidos de manera no covalente (Figura 2). El sitio FAD es el que participa en la reacción de oxidación-reducción que lleva a cabo la enzima. La glucosa oxidasa es una enzima que presenta una alta resistencia a la desnaturalización, se sabe que la inactivación térmica de la enzima se debe principalmente a la liberación del grupo FAD.⁽³⁵⁾

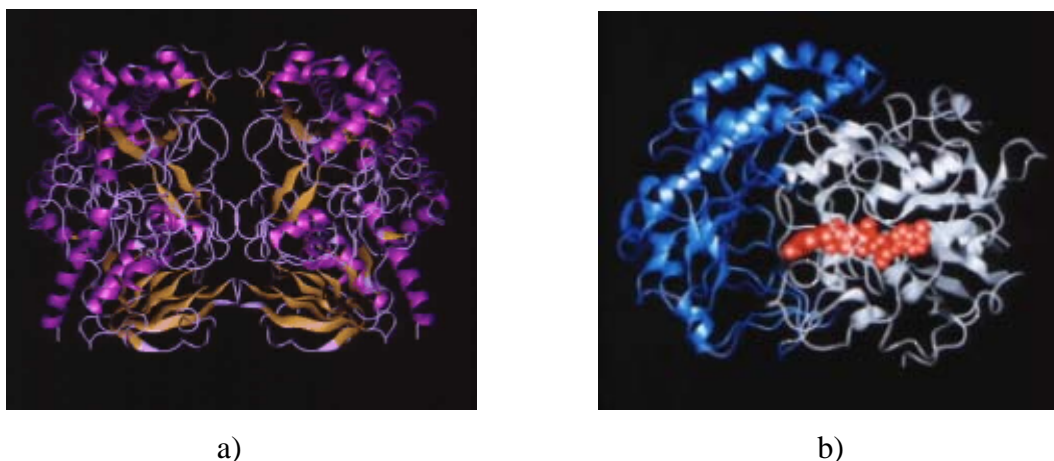
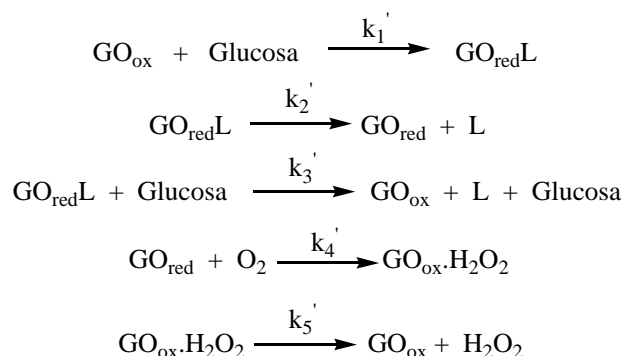


Figura 2. a) Holoenzima mostrando las dos subunidades que la conforman. b) Estructura de una de las subunidades de GO, siendo el grupo prostético FAD el sitio de color rojo.

La glucosa oxidasa cataliza la reacción entre β -D-glucosa y oxígeno para producir peróxido de hidrógeno y δ -gluconolactona. El mecanismo ha sido estudiado por Nakamura y Ogura,⁽³⁶⁾ y de forma mas descriptiva por Gibson y colaboradores,⁽³⁷⁾ así como por Duke y colaboradores.⁽³⁸⁾ El mecanismo de reacción de la enzima y glucosa en presencia de un medio aerobio involucra 5 pasos (Esquema 3).

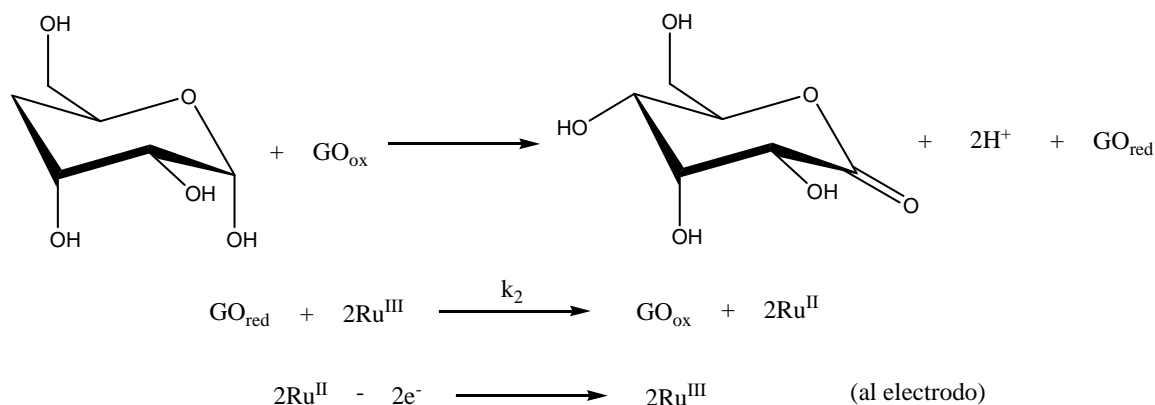


Esquema 3. Mecanismo de reacción que efectúa la glucosa oxidasa en presencia de glucosa y un medio aerobio. L = gluconolactona.

En el Esquema 3, GO_{ox} corresponde a la forma oxidada de la enzima, GO_{red} a la forma reducida de la enzima, L es la gluconolactona y $\text{GO}_{\text{red}}\text{L}$ y $\text{GO}_{\text{ox}}\text{H}_2\text{O}_2$ son aductos entre enzima y productos, gluconolactona y peróxido de hidrógeno. La propuesta mecanística se lleva a cabo en presencia de oxígeno (mediador), el oxígeno permite regenerar la forma oxidada de la enzima (GO_{ox}), siendo esta especie enzimática redox capaz de oxidar glucosa.

2.2.5. Mediadores en la transferencia de electrón con glucosa oxidasa.

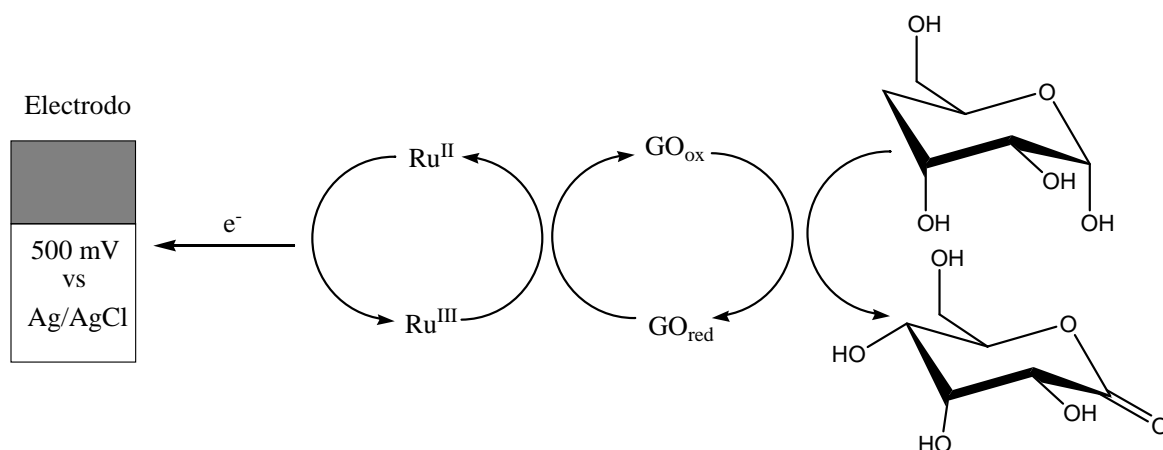
En el presente trabajo se evaluó el comportamiento de complejos ciclometalados de rutenio(II) como mediadores en la transferencia electrónica con glucosa oxidasa de *Aspergillus Níger*. El sustrato cuya oxidación se cataliza es la glucosa (Esquema 4).



Esquema 4. Proceso oxidante de la glucosa con glucosa oxidasa en presencia de una especie de rutenio como un mediador de un electrón.

En la primera reacción se efectúa la oxidación de la glucosa a gluconolactona, reduciendo el sitio activo de la glucosa oxidasa. La enzima en presencia del mediador (Ru^{III}) pasa a su forma oxidada (GO_{ox}). En el presente trabajo se tiene una especie de

rutenio(II), es por ello que es necesario realizar previamente una electrólisis de esta especie, para generar al electrodo el mediador en su forma oxidada. Como se muestra en el Esquema 5, el proceso es catalítico y es por ello que es posible determinar amperométricamente la cantidad de sustrato que se tiene en disolución, para lograr la determinación cuantitativa es necesario registrar la cantidad de corriente que se requirió para generar a la especie Ru^{III} , ya que esta especie es la que permite que se efectuó el ciclo catalítico en el proceso oxidante de la glucosa.

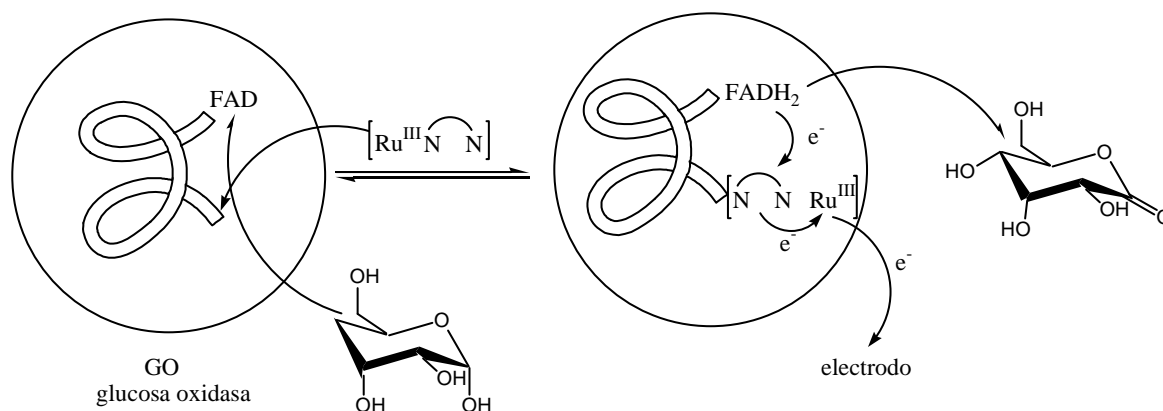


Esquema 5. Mecanismo de operación de un biosensor de glucosa empleando como mediador a una especie de Ru^{III} .

Para que un compuesto sea considerado mediador debe cumplir las siguientes características.

- Debe reaccionar rápidamente con la enzima, eso quiere decir que la velocidad de intercambio del electrón con la enzima redox debe ser alta ($k_2 > 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).
- Debe mostrar reversibilidad en la cinética de transferencia de electrón.
- La regeneración del mediador tiene que ser rápida y este debe de presentar una alta estabilidad en sus formas reducida y oxidada. En voltamperometría cíclica se debe tener un comportamiento reversible a diferentes velocidades de barrido (25-4000mV/s).
- No debe reaccionar con el oxígeno ni desnaturalizar a la enzima u oxidar al sustrato de manera independiente al sistema enzimático.

La forma en que interactúa el mediador con la enzima se esquematiza de la manera siguiente (Esquema 6).^(26, 39) En esta propuesta los ligandos insaturados, los cuales se encuentran coordinados al centro metálico, actúan como una antena que encuentra al grupo prostético FAD (forma oxidada de la glucosa oxidasa). FAD al oxidar glucosa se reduce y forma FADH₂. Debido a la cercanía de este grupo a la superficie interna de la enzima, 13 Å,⁽⁴⁰⁾ y al estar lo suficientemente próximo el mediador al grupo FADH₂, los ligandos del mediador reciben los electrones del grupo prostético y los transfieren al centro metálico. Posteriormente a la especie de rutenio(II) se le aplica una electrólisis, con la finalidad de producir la forma oxidada del mediador, la cual es capaz de regenerar la forma oxidada de la enzima. Un factor que debe tomarse a consideración en la propuesta consiste en que el mediador debe de encontrarse en las cercanías de la superficie interna de la enzima, para que sea posible transferir los electrones del grupo prostético FADH₂ de la enzima, al mediador y seguidamente al electrodo, de igual forma se tiene que llevar a cabo el proceso inverso.



Esquema 6. Propuesta del funcionamiento del complejo de rutenio en la enzima durante el proceso de transferencia asistida de electrones en el interior de la proteína.

2.3. Complejos de rutenio como mediadores en la transferencia asistida del electrón con glucosa oxidasa.

Un factor que necesariamente tiene que tomarse en cuenta es la velocidad de oxidación de la GO_{red} por el mediador. Al tener en la esfera de coordinación del mediador ligandos donadores σ fuertes y aceptores π , se incrementa la velocidad de oxidación de la forma reducida de la enzima redox, esto es debido al “efecto antena” del mediador sobre la enzima. Los complejos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{CN})_6]^{4-}$ fueron los primeros que exhibieron

un comportamiento de mediador con oxido-reductasas.⁽⁴¹⁾ A continuación se muestra una tabla con los potenciales redox, así como de las constantes de velocidad para la oxidación de la forma reducida de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* por diversos complejos de rutenio.

Tabla 3. Potenciales redox de varios complejos de rutenio, así como sus constantes de segundo orden para la oxidación de la forma reducida de glucosa oxidasa de *Aspergillus Níger*

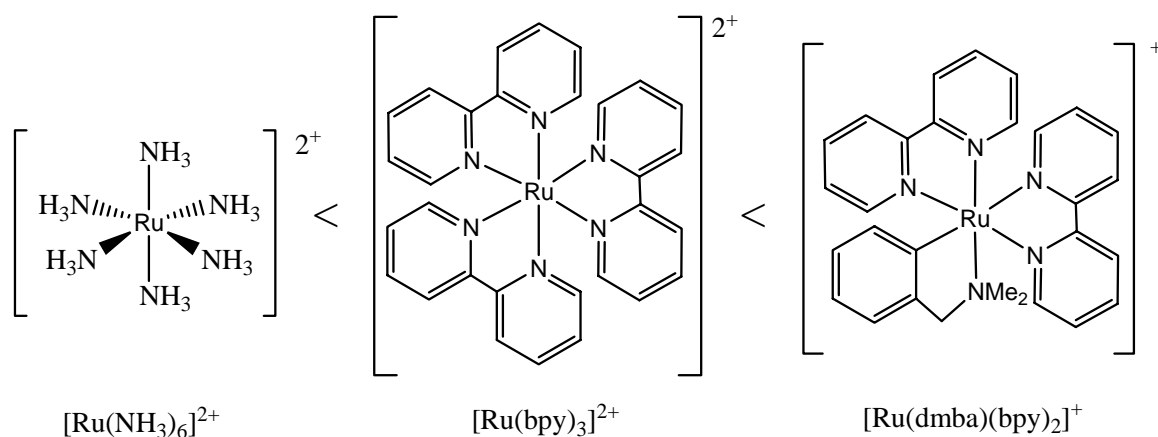
Complejos de rutenio	Potencial mV (vs ECS)	$k_2 * 10^5$ ($M^{-1}s^{-1}$)	Referencia.
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bpy) ₂]	300	0.54	(42)
[RuCl(py)(bpy) ₂] ⁺	490	4.1	(42)
[RuCl(imidazol)(bpy) ₂] ⁺	415	4.4	(42)
[Ru(CN) ₆] ⁴⁻	685	0.1	(41)
[Ru(NH ₃) ₆] ²⁺	-200	0.001	(43)
[Ru(Py)(NH ₃) ₅] ²⁺	500	1.0	(41)
[Ru(Pirazina)(NH ₃) ₅] ²⁺	200	1.9	(44)
[Ru(DMO-bpy) ₃] ²⁺	700	5.5	(45)
DMO-bpy= 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina			
[Ru(DA-bpy) ₃] ²⁺	275	16	(45)
DA-bpy= 4,4'-diamino-2,2'-bipiridina			
[Ru(DMA-bpy) ₃] ²⁺			
DMA-bpy= 4,4'-dimetilamino-2,2'- bipiridina	260	2.2	(46)
[Ru(bpy) ₃] ²⁺	1044	2.1	(47)
[Ru(phen) ₃] ²⁺	1110	1.1	(47)
[Ru(dmmba)(bpy) ₂] ²⁺	190	35 ^a	(48)

a. El estudio cinético se realizó con glucosa deshidrogenasa.

Como se observa en la Tabla 3, los complejos que tienen un potencial que se encuentre en el intervalo de los 400 a los 600 mV suelen poseer una alta velocidad en la transferencia del electrón con la glucosa oxidasa, además de que llega a ser factible la generación electroquímica de la especie de rutenio(III) sin que exista una intervención importante del oxígeno o alguna reacción redox colateral entre el sistema sustrato-enzima-mediador. En cuestión de la estructura molecular, los complejos que poseen ligantes bidentados nitrogenados aromáticos favorecen la transferencia electrónica a la enzima, esto de acuerdo con el “fenómeno antena”, ya que estos ligantes aromáticos facilitan el transporte

de electrones entre la enzima y el mediador. Por otro lado, recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado experimentalmente, que el fragmento ciclometalado organometálico, también favorece la velocidad en el intercambio de electrón con oxidoreductasas (Tabla 3),^(8, 27, 48) llegando a tener valores para k_2 mayores que a las determinadas por el mediador tetratiafulvaleno.⁽⁹⁾ Si se hace un estudio comparativo entre estructura del complejo y actividad como mediador se observa que al sustituir un enlace N-Ru por uno C-Ru, se tiene un aumento del orden de 10 veces en la constante de velocidad de segundo orden para la transferencia electrónica (k_2) entre la forma reducida de la oxidoreductasa y el mediador. Esto se puede deber a la rigidez que brinda el enlace C-Ru al complejo, lo cual tiene como una consecuencia la alta estabilidad entre la forma oxidada y reducida del mediador, permitiendo el intercambio rápido del electrón entre la especie activa del mediador (forma oxidada) y la enzima.

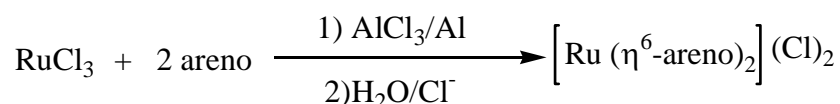
En relación con el planteamiento anteriormente mencionado, se espera que un complejo con ligantes bidentados nitrogenados aromáticos dentro de su estructura molecular, así como el fragmento ciclometalado organometálico que aumente la rigidez en la molécula, tendría como resultado en la oxidación catalítica de glucosa, una alta velocidad en el intercambio electrónico entre el mediador y la oxido-reductasa. También se observa que al aumentar el número de ligantes bidentados nitrogenados aromáticos en la esfera de coordinación se tiene como consecuencia un aumento en la constante de velocidad del intercambio electrónico entre el mediador y la enzima redox (Esquema 7). Otro factor que debe de tomarse a consideración consiste en preparar mediadores que presenten una alta solubilidad en agua, ya que todos los estudios enzimáticos se deben de llevar a cabo en agua, con el objeto de llevar a cabo aplicaciones *in-vivo*.



Esquema 7. Estructuras moleculares de tres complejos de rutenio(II) están acomodados en relación a la velocidad en la transferencia electrónica que llegan a presentar como mediadores frente a la glucosa oxidasa.

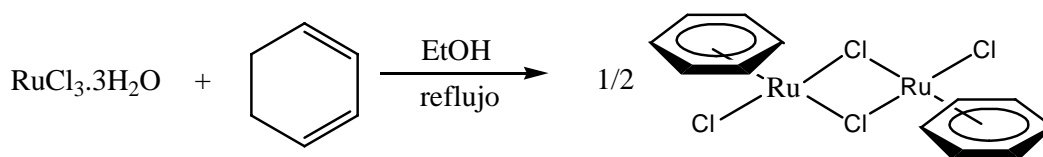
2.4. Complejos (η^6 -areno)rutenio.

Los complejos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})\text{Cl}_2]_2$ son empleados en la química organometálica como precursores para la preparación posterior de diversos complejos de rutenio.⁽⁴⁹⁾ En el presente trabajo, el complejo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ se empleó como materia prima para la obtención de los rutenacilos requeridos. La vía sintética para la obtención de este complejo ha sido desarrollada por Fischer y colaboradores (Ecuación 1).⁽⁵⁰⁾



Ecuación 1. Obtención de complejos de rutenio(II) mediante el proceso desarrollado por Fischer y colaboradores.

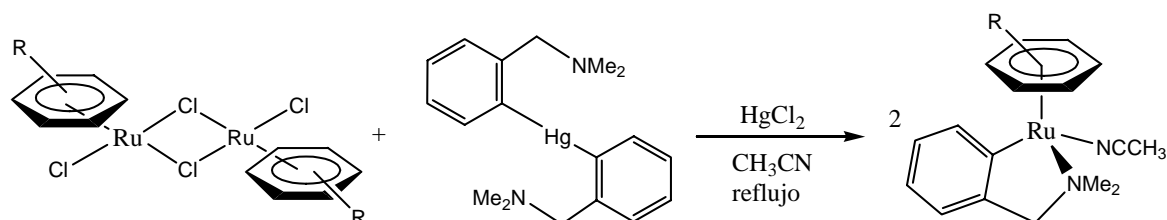
Otro método que permite la obtención de complejos de tipo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})\text{Cl}_2]_2$, consiste en la deshidrogenación de derivados del ciclohexadieno en medio etanólico y en presencia del tricloruro de rutenio hidratado.⁽⁵¹⁾



Ecuación 2. Obtención de complejos de rutenio (II) mediante el proceso desarrollado por Bennett y colaboradores.

2.5. Reacciones de ciclometalación vía activación del enlace C-H.

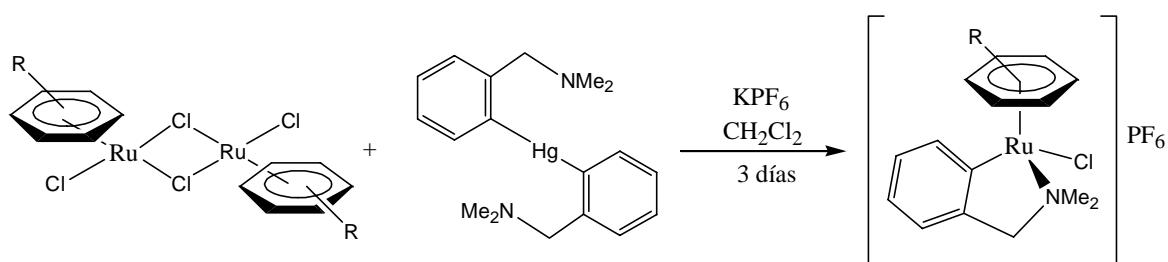
El proceso de ciclometalación ha sido estudiado por varios grupos de trabajo, por ejemplo Pfeffer y colaboradores,⁽⁵²⁾ que realizan la ciclometalación vía transmetalación (Ecuación 3). Se hace reaccionar un complejo organomercurado con el $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$, para generar posteriormente el rutenacilo correspondiente, el rendimiento de la reacción llega a ser del 20 %.



Ecuación 3. Reacción de transmetalación para la obtención de rutenacilos.

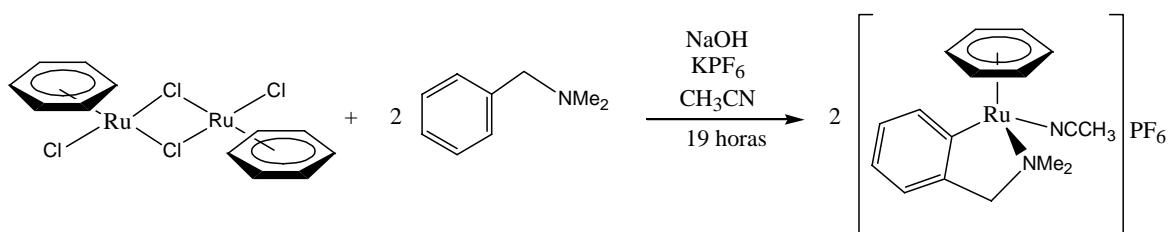
Como se observa en el metalociclo resultante de la transmetalación, este posee un estado de oxidación del rutenio de +1, además de que la estructura del complejo metálico es de 17 electrones, esto último se hace mención, ya que en otros procesos de ciclometalación se generan complejos de rutenio(II) con una estructura acorde con la regla de los 18 electrones, que podría decirse, son las más estables. La desventaja de este método radica principalmente en el bajo rendimiento obtenido de la reacción.

Recientemente Pfeffer y colaboradores⁽⁵³⁾ (Ecuación 4), han desarrollado nuevos métodos para efectuar la ciclometalación, como el proceso donde se realizaron algunas modificaciones con respecto al método anteriormente descrito, ya que en este caso se hace uso de CH_2Cl_2 como disolvente y KPF_6 , con el objeto de generar el contraión en el rutenociclo y así tener una especie de rutenio(II), la transmetalación se lleva a cabo a temperatura ambiente.



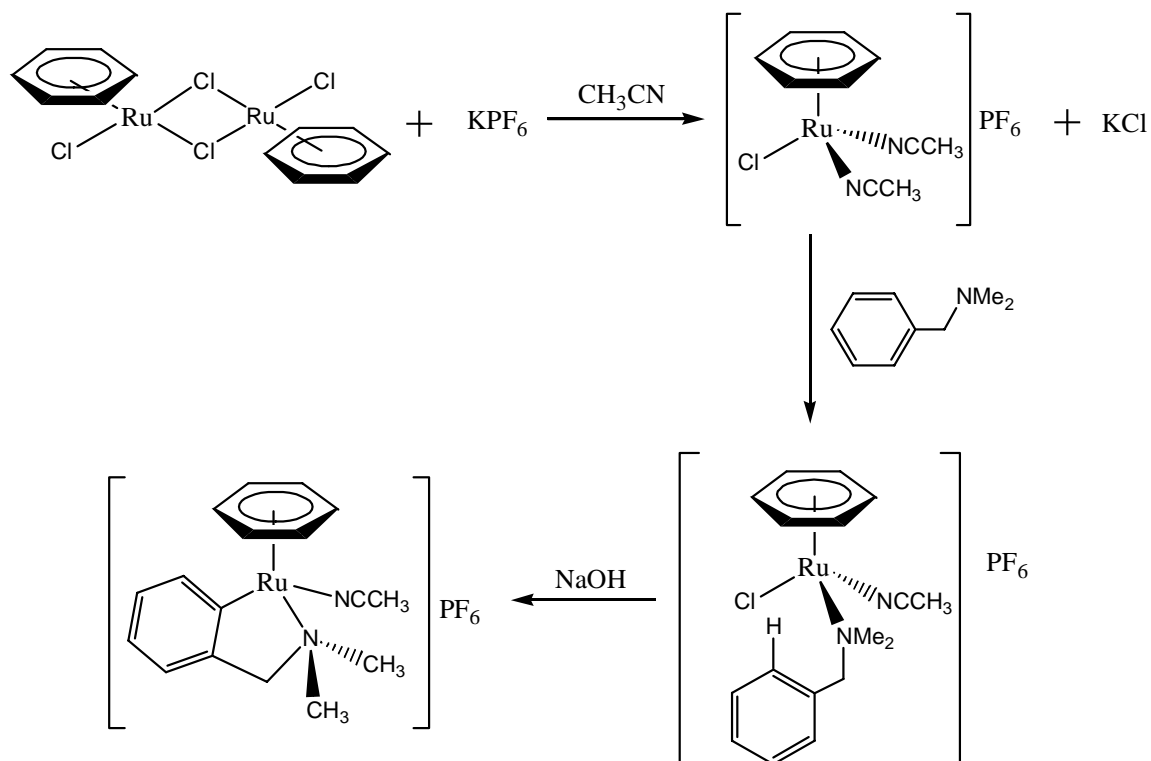
Ecuación 4. Modificación a la transmetalación para la obtención de rutenociclos.

La desventaja de este proceso radica en el largo tiempo de reacción, ya que consiste de 3 días, además de que el rendimiento que presenta el proceso sigue relativamente bajo, del 38-45%. Últimamente este grupo de trabajo desarrolló otra ruta sintética para la obtención de complejos ciclometalados de rutenio(II),⁽⁵⁴⁾ en la cual no se emplea un compuesto organomercurado, ya que se emplea la amina directamente, las condiciones de reacción son relativamente suaves y el tiempo de reacción es de 19 horas, todo ello se lleva a cabo en un medio básico (Ecuación 5). El complejo resultante presenta un estado de oxidación del rutenio de +2 y es de 18 electrones.



Ecuación 5. Reacción desarrollada por Pfeffer para la obtención de metalociclos de rutenio(II).

Una propuesta mecanística para este proceso consiste en suponer que el enlace C-H se activa posterior a una sustitución electrofílica, en donde el rutenio se manifiesta como centro electrofílico y la amina actúa como nucleófilo, el medio básico efectúa la activación intramolecular del enlace C-H (Esquema 8).



Esquema 8. Propuesta mecanística de la ciclometalación vía activación del enlace C-H por una sustitución electrofílica aromática.

Como se ha mencionado con anterioridad, la formación de un enlace C-Ru suele favorecer la transferencia asistida del electrón con oxido-reductasas, debido a que este fragmento proporciona una rigidez a la molécula y como consecuencia, le brinda una estabilidad a las formas oxidada y reducida que llegase a presentar el complejo metálico.

2.6. Adición de ligantes bidentados nitrogenados a los metalociclos de rutenio(II).

Como se ha hecho mención en este trabajo, la esfera de coordinación del rutenio influye en las propiedades del complejo resultante, en específico, la actividad en la transferencia asistida de electrones con oxido-reductasas. Es por ello que se planteó sintetizar complejos ciclometalados de rutenio(II) con ligantes bidentados nitrogenados aromáticos donadores σ fuertes y π aceptores sobre el centro metálico. Se ha observado

experimentalmente que este tipo de ligantes pueden brindar al complejo metálico una estabilidad redox en el equilibrio electroquímico de sus formas oxidada y reducida.

Los estudios electroquímicos realizados para evaluar la actividad del complejo metálico como posible mediador en la transferencia electrónica con la glucosa oxidasa se realizan en medio acuoso. Por otro lado, si se desea elaborar un biosensor, es necesario que el complejo metálico sea parcialmente soluble en agua, es por ello que se busca aumentar en gran medida la solubilidad del complejo organometálico en este disolvente, para ello se piensa emplear derivados de ácidos carboxílicos de la 2,2'-bipiridina y la 1,10-fenantrolina (Figura 3). Se espera que al adicionar este tipo de ligantes al complejo ciclometalado organometálico, aumentará la solubilidad de los complejos resultantes en agua, sin que la modificación de estos ligantes por los grupos carboxílicos afecten demasiado las propiedades electrónicas del metalociclo de rutenio(II), las cuales se han planteado de suma importancia en la transferencia electrónica con oxido-reductasas. Se espera que la coordinación de estos ligantes nitrogenados al complejo organometálico favorezcan solamente la solubilidad de los compuestos en agua y que no inhiban en gran medida el comportamiento de mediador que posean los complejos ciclometalados de rutenio(II) resultantes de la adición con glucosa oxidasa.

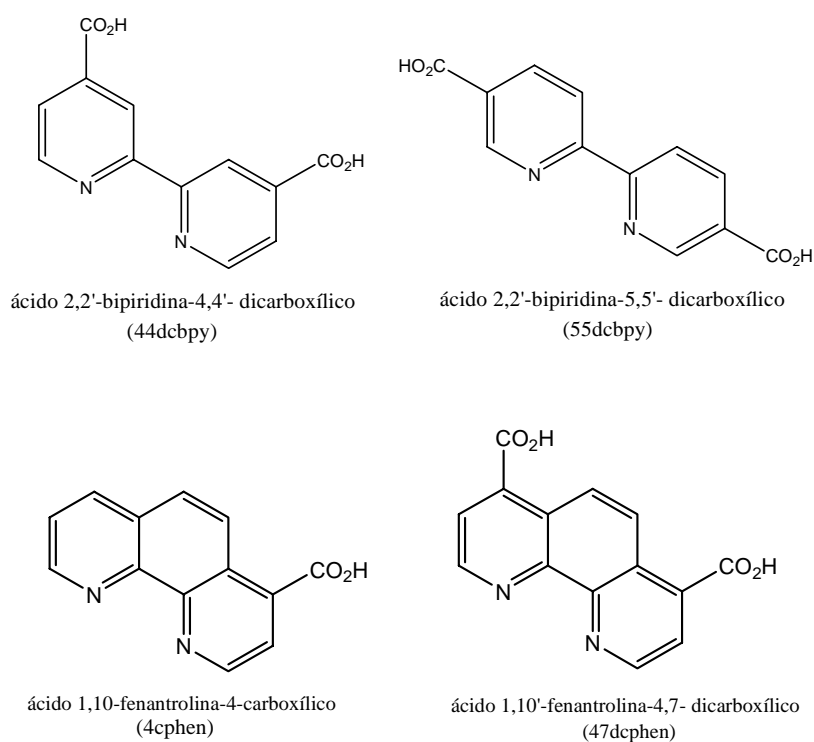


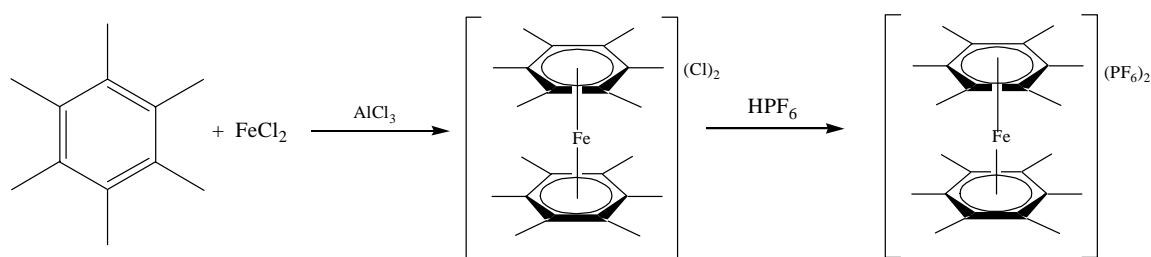
Figura 3. Ligantes bidentados nitrogenados que pueden aumentar la solubilidad de los metalociclos de rutenio en agua.

2.7. Complejos de hierro como mediadores en la transferencia asistida de electrón con glucosa oxidasa.

Como se ha mencionado con anterioridad los derivados del ferroceno fueron los primeros complejos organometálicos que presentaron una actividad como mediadores en la transferencia asistida de electrón en oxido-reductasas.⁽²³⁾ Una de las ventajas que poseen este tipo de complejos, consiste en la posibilidad de mostrar una mayor biocompatibilidad con respecto a la que pudieran presentar los compuestos de rutenio en sistemas *in-vivo*. Es por ello que se deseó obtener compuestos ciclometalados de hierro(II) análogos estructuralmente, a los complejos ciclometalados de rutenio(II) sintetizados en el presente trabajo, con la finalidad de no afectar la afinidad del complejo resultante con la enzima redox, así como la actividad que presente el complejo de hierro(II) en la transferencia asistida del electrón con las oxido-reductasas no se vea afectada, en relación al cambio del metal de transición. Dentro de esta línea de investigación se intentó ciclometalar un precursor de hierro, con la finalidad de aumentar la rigidez y la estabilidad entre su forma reducida y oxidada en el compuesto. Posteriormente se trató de adicionar ligandos bidentados nitrogenados aromáticos (2,2'-bipiridina y la 1,10-fenantrolina) a la esfera de coordinación del centro metálico.

2.7.1. Síntesis de precursores de hierro.

Dado que no es posible tener el mismo precursor que para el rutenio, para posteriormente llevar a cabo la ciclometalación, mediante un proceso análogo a lo presentado por el rutenio, es necesario plantear un precursor semejante al $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$, con la finalidad de proceder más adelante a la ciclometalación de este compuesto. Es por esta razón que se sintetizó el hexafluorofosfato de *bis*(η^6 -hexametilbenceno)hierro(II).⁽⁵⁵⁾



Ecuación 6. Síntesis de un precursor de hierro (II).

Obtenido este precursor de hierro(II) se intentó ciclometalar este complejo mediante reacciones con compuestos organolitiados y procesos análogos a los empleados para la síntesis de metalociclos de rutenio(II).

3. Objetivos del trabajo.

3. Objetivos del trabajo.

Objetivo general:

Proponer y llevar a cabo rutas de síntesis para la obtención de nuevos complejos ciclometalados de rutenio(II) y hierro(II) para su aplicación como mediadores y evaluar electroquímicamente su eficiencia en la transferencia asistida de electrón con glucosa oxidasa.

Objetivos particulares:

1. Obtener el rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$ a través de una reacción de ciclometalación entre la benzoquinolina y el dímero $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}_2]_2$, mediante la activación del enlace C-H de la posición *orto* de la amina correspondiente.
2. Generar los rutenacilos tipo $[\text{Ru}(\text{C}\text{N}\text{N})(\text{N}\text{N}\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ y tipo $[\text{Ru}(\text{C}\text{N}\text{N})(\text{N}\text{N}\text{N})_2]\text{PF}_6$, vía adición de un ligante bidentado nitrogenado aromático sobre el complejo resultante de la ciclometalación.
3. Sintetizar los complejos ciclometalados de hierro(II), análogos a los rutenacilos preparados anteriormente.
4. Caracterizar los complejos metálicos sintetizados, mediante las técnicas de EM, IR, RMN (^1H y ^{31}P) y en algunos casos difracción de rayos X.
5. Determinar el comportamiento electroquímico que presentan los metalociclos de rutenio y hierro, como lo es su correspondiente potencial redox, el grado de reversibilidad y la estabilidad que presenten sus formas oxidada y reducida.
6. Evaluar electroquímicamente el carácter de mediador de los complejos metálicos preparados en este trabajo para la transferencia asistida de electrones con glucosa oxidasa en el proceso oxidante de glucosa que presenten.

4. Parte experimental.

4. Parte experimental.

4.1 Equipo.

La espectroscopia vibracional en el infrarrojo se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nicolet FTIR modelo MAGNA 750 en pastilla de KBr, las unidades en que se encuentran las absorciones son cm^{-1} . La espectroscopia de resonancia magnética nuclear fue llevada a cabo en un equipo JEOL GX 300 (300.5311 MHz para ^1H y 121.6565 para ^{31}P) empleando como disolventes CD_3CN , D_2O y CD_3OD , la referencia para cada espectro fue el mismo disolvente deuterado. Las unidades del desplazamiento son ppm. La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro JEOL de alta resolución modelo JMS-SX102A mediante el método de FAB^+ (Fast Atom Bombardement en forma de ión positivo). La difracción de rayos X se llevó a cabo en un aparato Bruker Smart Apex CCD.

Los estudios electroquímicos se realizaron en un galvanostato potenciostato de AUTOLAB modelo PGSTAT12. El electro auxiliar empleado fue de platino, el electrodo de referencia fue de Ag/AgCl saturado y el electrodo de trabajo fue de carbón vítreo. El electrodo de trabajo fue cuidadosamente pulido con 3 disoluciones de diamante de 1, 3 y 15 μm y antes de realizar cada medición con alúmina de 0.05 μm . Para cualquier medición voltamperométrica siempre fue necesario determinar la caída óhmica del sistema. Todos los experimentos electroquímicos con enzimas fueron llevados a cabo en agua desionizada, la cual fue purificada con el equipo Nanopure Barnstead.

4.2 Reactivos y disolventes.

La benzoquinolina, la 2-fenil-piridina, el 1,3-ciclohexadieno, el hexafluorofosfato de potasio, el hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, la 2,2'-bipiridina, la 1,10-fenantrolina, el tricloruro de rutenio(III) hidratado, el dicloruro de hierro(II) anhidro, el heptano, el magnesio, la disolución en hexano de *n*-butilitio, el ácido nítrico fumante, el dióxido de selenio, el tricloruro de aluminio, el fosfato monoácido de sodio, el fosfato diácido de sodio, el hexametilbenceno, el ácido hexafluorofosfórico, el ácido 2,2'-bipiridina-4-dicarboxílico, el ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico, la 4,4'-dimetil-1,10-fenantrolina, la 4-metil-1,10-fenantrolina, el nitrito de sodio, así como la glucosa oxidasa de *Aspergillus*

niger fueron obtenidos comercialmente en Aldrich Chemical Co y se emplearon tal y como se recibieron.

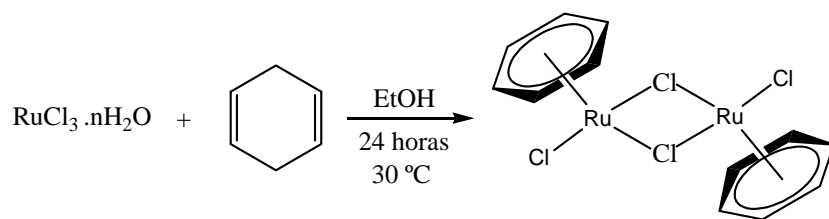
El diclorometano y el acetonitrilo (grado HPLC, Merck) que se emplearon en la síntesis y purificación de los metalociclos de rutenio(II) fueron destilados bajo atmósfera inerte de nitrógeno antes de usarse. El etanol absoluto, el éter dietílico anhidro (99.5%), el dioxano (99%) y el acetonitrilo anhidro (99.8%) (Aldrich Chemical Co) se emplearon tal y como se recibieron.

El diclorometano y el metanol se secaron mediante la técnica informada en la literatura.⁽⁵⁶⁾ El diclorometano se colocó en un matraz redondo junto con pentóxido de fósforo para eliminar el agua que contenía el disolvente. El matraz se colocó en una canastilla calefactora, la cual se encontraba conectada a un reóstato, en la parte superior del matraz bola se acopló un colector equipado con dos llaves; una para cerrar el paso del disolvente del colector al matraz redondo y otra para extraer el disolvente ya destilado. En la parte superior del colector se le adaptó un refrigerante y todo el procedimiento se realizó bajo atmósfera de nitrógeno.

El metanol se secó de manera similar al diclorometano. En un matraz redondo acoplado a un colector de dos llaves y en la parte superior de este último un refrigerante, se colocó la cuarta parte del disolvente a destilar junto con el magnesio y un cristal de yodo, todo esto bajo una atmósfera de argón y sin agitación. Posteriormente se le agregó el resto de disolvente a destilar y se procedió a iniciar la agitación y el calentamiento. Para eliminar el contenido de oxígeno que contenía el disolvente el proceso se realizó todo el procedimiento bajo atmósfera de nitrógeno.

La síntesis de todos los complejos ciclometalados de rutenio(II) y de hierro(II) se realizaron bajo atmósfera inerte de argón y empleando las técnicas de Schlenk.⁽⁵⁷⁾

La síntesis del dímero $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ fue realizada de acuerdo a lo informado en la literatura,⁽⁵⁸⁾ partiendo de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ y ciclohexadieno en medio etanólico a 30°C.

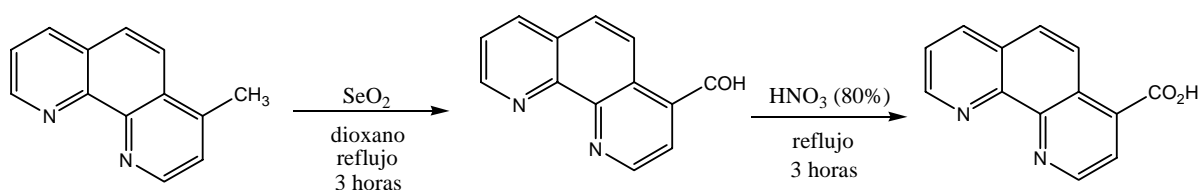


Ecuación 7. Obtención del complejo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$

El $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (0.038 moles) se coloca en un matraz bola de un litro y se le añade el etanol (400 ml) como medio de reacción, posteriormente se agrega el 1,3-ciclohexadieno (0.356 moles) y 30 ml de agua. El sistema se deja bajo agitación constante a 30°C hasta la formación de un precipitado rojizo. La mezcla de reacción se filtra y el precipitado se lava 5 veces con etanol y tres veces con éter dietílico, con la finalidad de eliminar el exceso de 1,3-ciclohexadieno. El rendimiento de la reacción fue del 94 %.

La síntesis del complejo $[\text{Fe}(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)_2](\text{PF}_6)_2$ se realizó acorde con lo informado en la literatura.⁽⁵⁵⁾ En un tubo de Schlenk de 100 ml previamente purgado por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío y equipado con una barra magnética se coloca el FeCl_2 (7.88 mmol), el hexametilbenceno (15.74 mmol) y el tricloruro de aluminio (25.22 mmol). El sistema con los sólidos se purga nuevamente por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío y finalmente se procede a adicionar el heptano (30ml) y la reacción se deja 14 horas bajo agitación a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción se añade lentamente (30 minutos) el ácido hexafluorofosfórico (15.74 mmol) y se espera hasta la formación de un precipitado, se deja 30 minutos para que finalice la precipitación del producto. El rendimiento de la reacción fue del 70 %. RMN- ^1H $[\text{CD}_3\text{CN}, 300.5311 \text{ MHz}, \delta(\text{ppm})]$: 2.19(s, 36H, CH_3). RMN- ^{31}P $[\text{CD}_3\text{CN}, 121.6565 \text{ MHz}, \delta(\text{ppm})]$: -144(hep, PF_6).

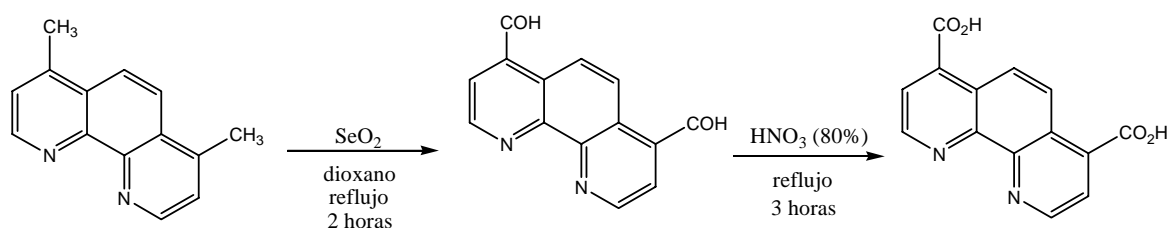
La obtención del ácido 1,10-fenantrolina-4-carboxílico se llevó a cabo en seguimiento a lo informado en la literatura.^(59, 60)



Ecuación 8. Obtención del ácido 1,10-fenantrolina-4-carboxílico

Para la síntesis del ácido 1,10-fenantrolina-4-carboxílico primeramente es necesario preparar el 1,10-fenantrolina-4-carboxialdehído. En un matraz de bola equipado con barra magnética se disuelve el dióxido de selenio (3.86 mmol) en dioxano caliente (6 ml). Se prepara aparte una disolución de 4-metil-1,10-fenantrolina (2.58 mmol) disuelta en 30 ml de dioxano. A esta disolución se le añade, por un lapso de dos horas, la solución de dióxido de selenio, esto se realiza bajo una agitación constante. Terminado el tiempo de adición, se deja agitando a reflujo de dioxano por 3 horas. Finalizado el tiempo de reacción se filtra caliente a través de celita (5 cm). El filtrado de dioxano es evaporado a presión reducida hasta la formación de un precipitado en la mezcla de reacción, se evita llevar a sequedad por el hecho de que algunos de los subproductos de la reacción presentan carácter explosivo, entre estos subproductos se encuentran los peróxidos de dioxano formados durante la oxidación. Se filtra la disolución y el producto se lava por triplicado con éter dietílico para eliminar los compuestos de selenio generados durante la oxidación. El 1,10-fenantrolina-4-carboxialdehído (2.16 mmol) se coloca en un matraz y se le añade ácido nítrico 80% (9 ml), se deja agitando la mezcla de reacción a reflujo de ácido nítrico por 3 horas. Se evapora hasta un 30% la mezcla de reacción y la solución es enfriada y vertida en hielo para la formación del precipitado, el sólido se lava con éter dietílico y se recrystaliza en metanol para la obtención del ácido 1,10-fenantrolina-4-carboxílico. El rendimiento de la reacción fue del 85%. RMN-¹H [DMSO-D, 300.5311 MHz, δ(ppm)]: 9.67 (s, 1H), 9.41 (dd, 1H, ³J = 4.0 Hz), 8.90 (dd, 1H, ³J = 6.0 Hz, ⁴J = 0.7 Hz), 8.79 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 8.31 (d, 1H ³J = 4.0 Hz), 8.13 (d, 1H, ³J = 4.0 Hz), 7.98 (d, H, ³J = 3 Hz)

La obtención del ácido 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxílico se realiza partir del procedimiento informado en la literatura.⁽⁶⁰⁾

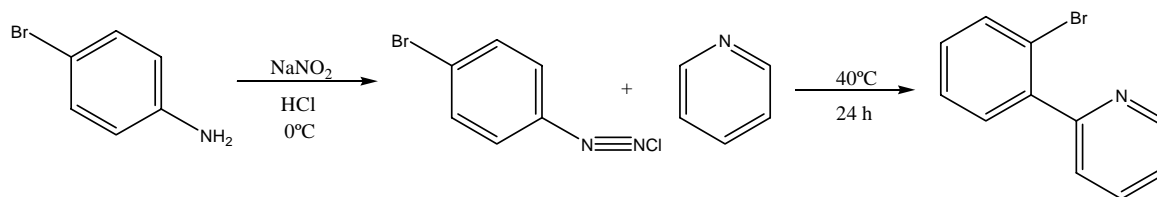


Ecuación 9 Obtención del ácido 1,10'-fenantrolina-4,7'-dicarboxílico.

En un matraz de bola equipado con barra magnética se realiza una mezcla de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (1.92 mmol) y dióxido de selenio (3.86 mmol) en dioxano

caliente (35 ml). Se calienta a reflujo de dioxano bajo agitación constante por dos horas y la mezcla de reacción es filtrada caliente a través de celita (5 cm). Se deja enfriar y el sólido obtenido se filtra y se lava con éter dietílico para eliminar los derivados de selenio generados durante la oxidación. El 1,10-fenantrolina 4,7-dicarboxialdehído (1.73 mmol) se coloca en un matraz bola y se le añaden 10 ml de ácido nítrico al 80%, se deja agitando a reflujo de ácido nítrico por 3 horas. Finalizado el tiempo de reacción se evapora dos terceras partes de la disolución y la mezcla de reacción es enfriada y vertida en hielo para inducir la precipitación, el sólido es lavado por triplicado con éter dietílico y recrystalizado en metanol para la obtención del diácido. El rendimiento de la reacción fue del 75 %. EM [I.E. m/z (a.r.%)] : 444 (3) 268 (5), 251 (6), 234(5), 224(33), 207 (11), 179 (92), 178 (62).

La síntesis de la 2-(2-bromofenil)piridina se realizó de acuerdo a lo informado en la literatura.⁽⁶¹⁾

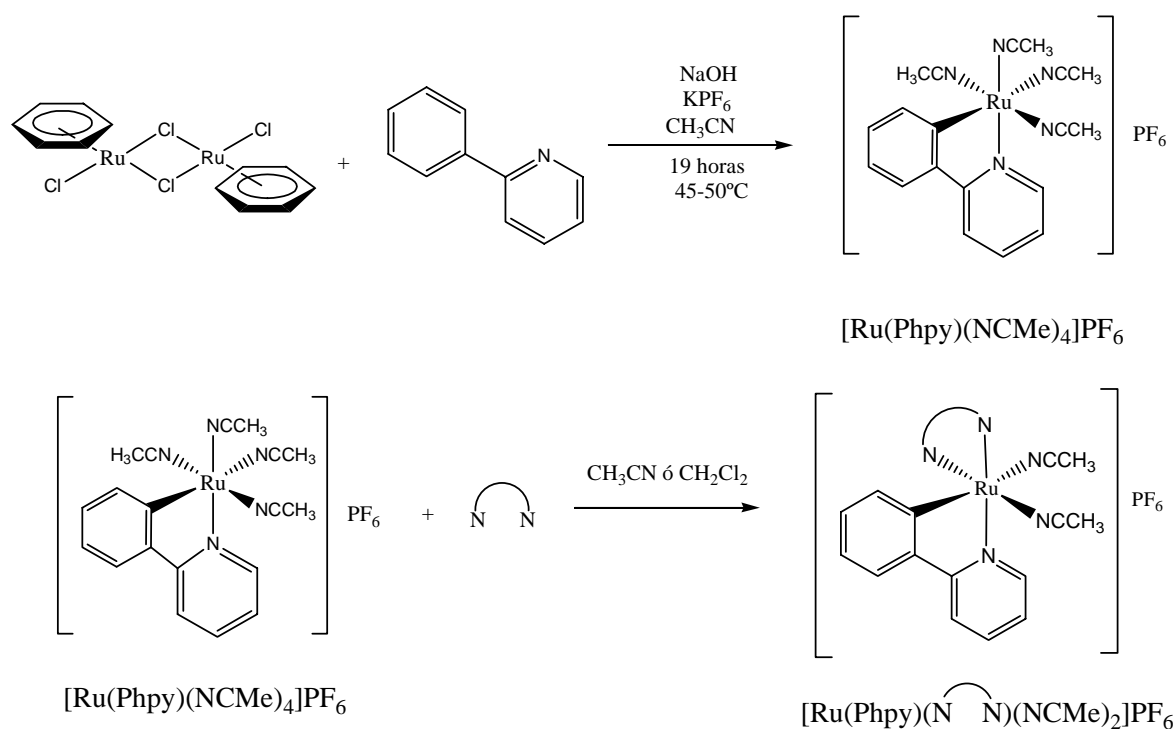


Ecuación 10. Obtención de 2-(2-bromofenil)piridina.

En un matraz bola equipado con barra magnética se adiciona la *p*-bromoanilina (17.67 mmol) y el HCl bajo una agitación constante, la temperatura del sistema debe ser de 0 °C. Por otro lado, se preparan 4.5 ml de una disolución acuosa de NaNO₂ (36.52 mmol). Se realiza la adición lenta de la disolución de NaNO₂ a la disolución de *p*-bromoanilina, cuidando de tener una agitación constante y que la temperatura no sobrepase los 0 °C. En otro matraz se coloca la piridina (100 ml) a 40 °C y se le añade lentamente (15 minutos) la disolución del cloruro de *p*-bromobencenodiazonio, la reacción se deja 24 horas bajo una agitación constante. Finalizado el tiempo de reacción se añade Na₂CO₃ (30 g) y se procede a filtrar y a evaporar a presión reducida el exceso de piridina de la reacción hasta tener 20 mL. En un destilador de pasos cortos a presión reducida se elimina de la mezcla lo que resta de piridina, agua y derivados de bajo punto de ebullición generados durante la reacción. Posteriormente se elabora una cromatografía en columna de sílica para proceder a la separación de los isómeros de la 2-(2-bromofenil)piridina que se generaron durante la reacción. La columna se eluye primeramente con una mezcla hexano-acetato de etilo

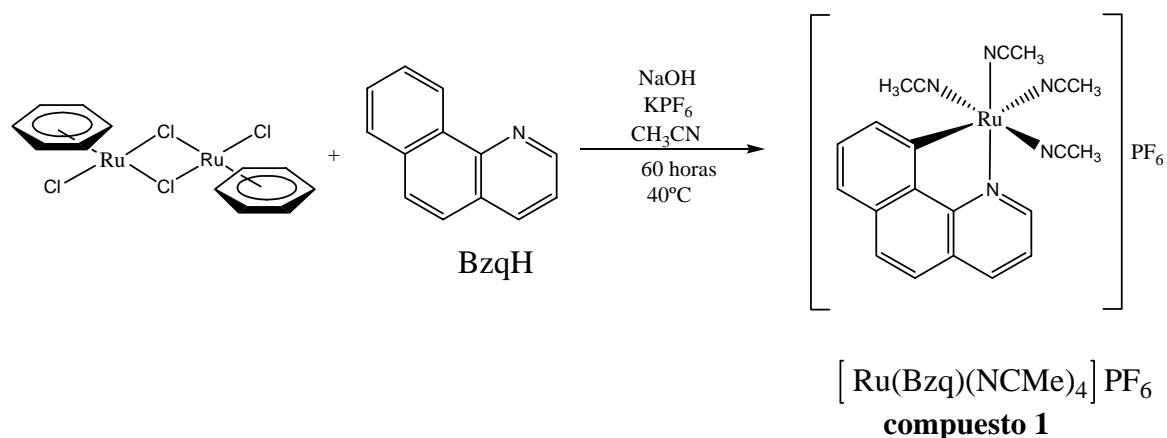
(99:1) y se colectan de la columna los primeros tres componentes de la mezcla, la 2-(2-bromofenil)piridina que es la cuarta fracción se eluye con una mezcla de hexano-acetato de etilo 50:50. En un espectrómetro de gases-masas se corroboró una pureza del producto del 97% y el peso molecular del 233 g/mol. RMN-¹H [CD₃Cl, 300.5311 MHz, δ(ppm)]: 8.49 (d, 1H, ³J = 6.0 Hz), 7.38 (dd, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 0.8 Hz), 7.75 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz), 7.74- 7.67 (m, 2H), 7.12 (td, 1H, ³J = 6.0 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.04 (td, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 6.91 (td, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 0.8 Hz).

La síntesis del metalociclo [Ru(Phpy)(NCMe)₄]PF₆ y los metalociclos tipo [Ru(Phpy)(N∩N)(NCMe)₂]PF₆, donde N∩N corresponde a la 2,2-bipiridina o la 1,10-fenantrolina, se realizó acorde con lo descrito en la literatura.^(62, 63)



Esquema 9. Síntesis de complejos ciclometalados de rutenio(II), [Ru(Phpy)(NCMe)₄]PF₆ y los tipo [Ru(Phpy)(N∩N)(NCMe)₂]PF₆

4.3 Síntesis del complejo ciclometalado [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆.



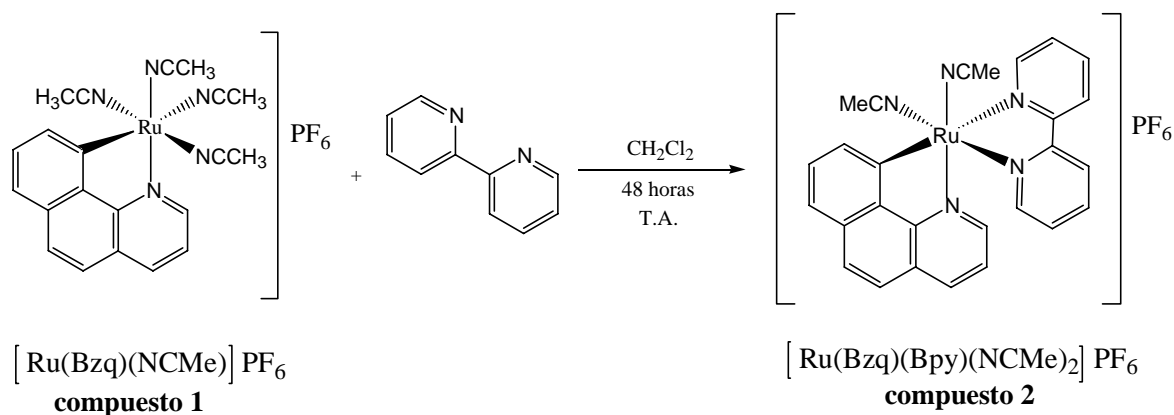
Ecuación 11. Obtención del rutenaciclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$.

En un tubo de Schlenk de 100 ml previamente purgado por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío y equipado con una barra magnética se coloca el complejo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ (1 mmol), el hexafluorofosfato de potasio (4 mmol), el hidróxido de sodio (2 mmol) y la benzoquinolina (2.5 mmol). El sistema se purga por triplicado y posteriormente se le añade 50 mL de acetonitrilo anhidro. Finalizada la adición del disolvente se procede a purgar el sistema por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío, se cierra el sistema y se mantiene la temperatura a 40°C mediante un baño de aceite con termómetro. La mezcla de reacción se deja calentando con agitación constante por 60 horas. Al finalizar el tiempo de reacción se deja enfriar la mezcla y se procede a evaporar el disolvente a presión reducida. La purificación de la mezcla de reacción se realizó mediante cromatografía en columna empacada de alúmina, empleando inicialmente diclorometano como eluyente y para extraer la fracción amarilla de interés fue necesario eluir con una mezcla de diclorometano y acetonitrilo (15:1). La fracción amarilla se colecta y se concentra en un tubo de Schlenk, posteriormente se procede a recristalizar al compuesto por difusión lenta, la mezcla de cristalización contiene en su primera fase 8 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 5:1, mientras que la segunda fase contiene 5 mL de la mezcla 5:1 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ y 5 mL de éter dietílico, la tercera fase de la mezcla de cristalización consiste en 72 mL de éter dietílico. Los cristales naranja se lavan tres veces con 15 mL de éter dietílico y se secan a vacío.

Compuesto 1. Rendimiento 52 %. EM[FAB⁺, m/z (a.r.%)]: 444 (2) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 403 (25) $[\text{M} + \text{H} - \text{NCCH}_3]^+$, 362 (5) $[\text{M} + \text{H} - 2\text{NCCH}_3]^+$, 321 (7) $[\text{M} + \text{H} - 3\text{NCCH}_3]^+$, 280 (4) $[\text{M} +$

H – 4NCCH₃)⁺. IR[KBr, ν cm⁻¹]: 838 (f, PF₆), 2277 (m, NCCH₃). RMN-¹H[CD₃CN, 300.5311 MHz, δ (ppm)]: 9.18 (dd, 1H, ³J = 5.2 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 8.26 (dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.4), 8.17 (dd, 1H, ³J = 5.8 Hz, ⁴J = 2.3 Hz), 7.83 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz), 7.67 (d, 1H, ³J = 8.7 Hz), 7.53 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 5.4 Hz), 7.49 (d, 1H, ³J = 4.0 Hz), 7.48 (s, 1H), 2.58 (s, 3H, NCCH₃), 1.96 (s, 3H, NCCH₃), 1.90 (s, 6H, 2NCCH₃). RMN-³¹P[CD₃CN, 121.6565 MHz, δ (ppm)]: -144 (hep, PF₆).

4.4. Síntesis de los complejo [Ru(Bzq)(bpy)(NCMe)₂]PF₆.



Ecuación 12. Obtención del complejo ciclometalado de rutenio(II) [Ru(Bzq)(Bpy)(NCMe)₂]PF₆.

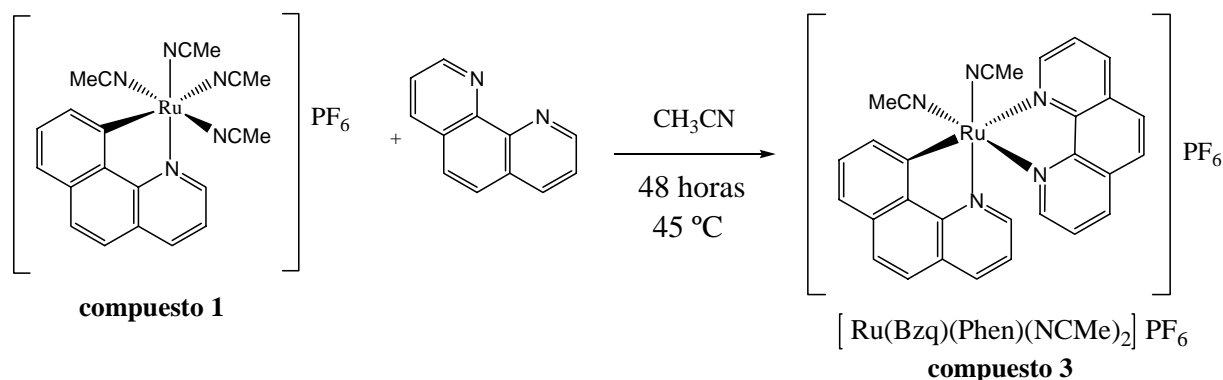
En un tubo de Schlenk de 100 ml previamente purgado por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío se colocan en presencia de agitación el complejo [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆ (0.43 mmol) y la 2,2'-bipiridina (0.85 mmol), posteriormente se procede a purgar por triplicado al sistema. Se le añaden 30 mL de CH₂Cl₂ anhidro y nuevamente se purga el sistema. La reacción se deja agitando a temperatura ambiente por 48 horas.

Finalizado el tiempo de reacción se procede a evaporar el disolvente a presión reducida y la purificación de la mezcla de reacción se realiza mediante una columna empacada de alúmina, como primer eluyente se utiliza diclorometano, seguidamente se eluye con una mezcla de diclorometano-acetonitrilo (10:3). La fracción color terracota se colecta en un tubo de Schlenk y se evapora el disolvente a presión reducida. Finalmente se recrystaliza el compuesto por difusión; la mezcla de cristalización contiene en su primera fase 4 ml de

CH₂Cl₂/CH₃CN 3:1, mientras que la segunda fase contiene 4 ml de la mezcla 3:1 de CH₂Cl₂/CH₃CN y 4 ml de éter dietílico, la tercera fase de la mezcla de cristalización consiste en 70 ml de éter dietílico. Los cristales café oscuro se lavan tres veces con 15 ml de éter dietílico y se dejan secando al vacío.

Compuesto 2. Rendimiento 60 %. EM[FAB⁺, m/z (a.r.)]: 663 (4%) [M + H + PF₆]⁺, 518 (22%) [M + H]⁺, 477 (19%) [M + H - NCCH₃]⁺, 436 (72%) [M + H - 2NCCH₃]⁺, 279 (10%) [M + H - 2NCCH₃ - Bpy]⁺, 257 (7%) [M + H - 2NCCH₃ - Bzq]⁺. IR [pastilla/KBr, ν cm⁻¹]: 843 (f, PF₆), 2267 (m, NCCH₃). RMN-¹H [CD₃CN, 300.5311 MHz, δ(ppm)]: 9.47 (ddd, 1H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, ⁴J = 0.8 Hz), 8.48 (dt, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.1 Hz), 8.44 (dd, 1H, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 1.1 Hz), 8.21 (td, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 0.5 Hz), 8.21 (dt, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.11 Hz), 8.05 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.91-7.86 (m, 2H), 7.74 (ddd, 1H, ³J = 5.8 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, ⁴J = 0.8 Hz), 7.71-7.57 (m, 5H), 7.11 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 5.5 Hz), 6.84 (ddd, 1H, ³J = 7.4 Hz, ³J = 5.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 2.25 (s, 3H, NCCH₃), 2.12 (s, 3H, NCCH₃). RMN-³¹P [CD₃CN, 121.6565 MHz, δ(ppm)]: -143.99 (hep, PF₆).

4.5. Síntesis del complejo [Ru(Bzq)(phen)(NCMe)₂]PF₆.



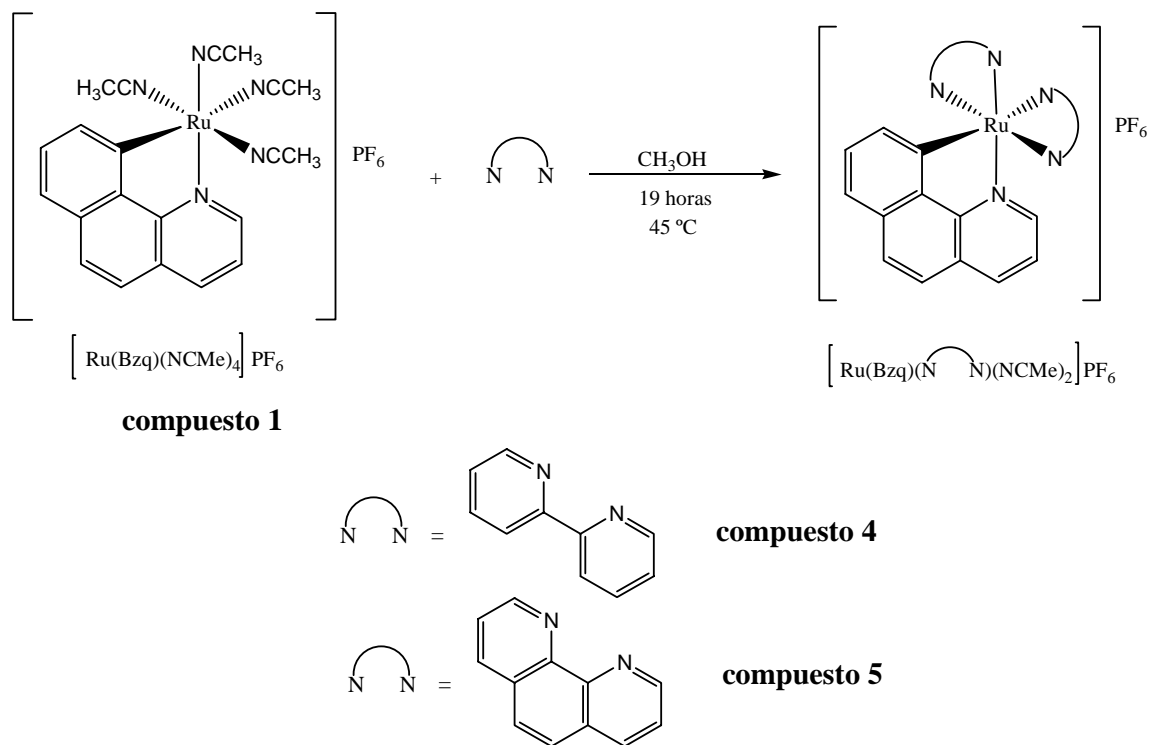
Ecuación 13. Obtención del rutenaciclo [Ru(Bzq)(phen)(NCMe)₂]PF₆.

En un tubo de Schlenk de 100 ml previamente purgado por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío se colocan en presencia de agitación el complejo ciclometalado de rutenio(II) [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆ (0.43 mmol) y la 1,10-fenantrolina (1.06 mmol), posteriormente se procede a purgar por triplicado al sistema y finalmente se añaden 30 mL de CH₃CN anhidro, el sistema se purga nuevamente por triplicado y se deja agitando a 45 °C mediante un baño de aceite con termómetro por un lapso de 48 horas.

Finalizado el tiempo de reacción se procede a concentrar totalmente a presión reducida y la purificación de la mezcla de reacción se realiza mediante una columna empacada de alúmina, primeramente se emplea como eluyente el diclorometano, con la finalidad de eliminar la materia prima, posteriormente se aumenta la polaridad del eluyente, preparando para ello una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃CN 5:1. La fracción rojiza se colecta y se concentra a presión reducida en un tubo de Schlenk. Posteriormente se procede a recristalizar al compuesto por difusión lenta, la mezcla de cristalización contiene en su primera fase 5 ml de CH₂Cl₂/CH₃CN 5:1, mientras que la segunda fase contiene 2.5 ml de la mezcla 5:1 de CH₂Cl₂/CH₃CN y 2.5 ml de éter dietílico, la tercera fase de la mezcla de cristalización consiste en 65 ml de éter dietílico. Los cristales cafés oscuros se lavan por triplicado con 15 ml de éter dietílico y se secan al vacío.

Compuesto 3. Rendimiento 57 %. EM [FAB⁺, m/z (a.r.)]: 687 (3%) [M + H + PF₆]⁺, 542 (11%) [M + H]⁺, 501 (7%) [M + H - NCCH₃]⁺, 460 (29%) [M + H - 2NCCH₃]⁺, 280 (7%) [M + H - 2NCCH₃ - Phen]⁺. IR [pastilla/KBr, ν cm⁻¹]: 842 (f, PF₆), 2267 (m, NCCH₃). RMN-¹H [CD₃CN, 300.5311 MHz, δ (ppm)]: 9.81 (d, 1H, ³J = 4.9 Hz), 8.75 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz), 8.52 (d, 1H, ³J = 6.9 Hz), 8.25-8.13 (m, 3H), 8.02-7.97 (m, 3H), 7.91 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz), 7.72 (t, 1H, ³J = 7.2 Hz), 7.64-7.57 (m, 3H), 7.2 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ³J = 5.5 Hz), 6.95 (dd, 1H, ³J = 7.3 Hz ³J = 5.5 Hz), 2.19 (s, 3H, NCCH₃), 2.14 (s, 3H, NCCH₃). RMN-³¹P[CD₃CN, 121.6565 MHz, δ (ppm)]: -144(hep, PF₆).

4.6 Síntesis de los rutenacilos $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$.



Ecuación 14. Síntesis de los rutenacilos tipo $[\text{Ru}(\text{C}\cap\text{N})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$.

En un tubo de Schlenk de 100 ml previamente purgado por triplicado mediante la línea mixta de argón-vacío y equipado con una barra magnética se colocan en presencia de agitación el complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$ (0.43 mmol) y el ligante bidentado nitrogenado aromático (1.28 mmol), finalizada la adición de los sólidos se procede a purgar por triplicado al sistema y finalmente se añaden 40 ml de CH_3OH anhidro, el sistema se purga nuevamente por triplicado y se deja agitando a $45\text{ }^\circ\text{C}$ mediante un baño de aceite con termómetro por un lapso de 19 horas.

Finalizado el tiempo de reacción se procede a concentrar totalmente a presión reducida la mezcla de reacción y se purifica mediante una cromatografía en columna empacada de alúmina, primero se eluye con diclorometano, con la finalidad de eliminar la materia prima y el ligante, posteriormente se aumenta la polaridad del eluyente, preparándose una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 7:1. La fracción morada se colecta y se concentra a presión reducida en un tubo de Schlenk, posteriormente se procede a recrystallizar al compuesto por difusión lenta, la mezcla de cristalización contiene en su primera fase 6 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 7:1, mientras que la segunda fase contiene 3 ml de la mezcla 7:1 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ y 3 ml de

éter dietílico, la tercera fase de la mezcla de cristalización consiste en 60 ml de éter dietílico. Los cristales negros se lavan por triplicado con 15 ml de éter dietílico y se secan al vacío.

Compuesto 4. Rendimiento 55 %. EM [FAB⁺, m/z (a.r.)]: 737(3%) [M + H + PF₆]⁺, 592 (78%) [M + H]⁺, 436 (28%) [M + H - Bpy]⁺, 280 (4%) [M + H - 2Bpy]⁺. IR [pastilla/KBr, ν cm⁻¹]: 842 (f, PF₆). RMN-¹H [CD₃CN, 300.5311 MHz, δ (ppm)]: 8.48 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz), 8.37-8.33 (m, 2H), 8.28 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz), 8.19 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 8.04-7.98 (m, 2H), 7.88-7.82 (m, 5H), 7.76-7.67 (m, 3H), 7.62 (dd, 1H, ³J = 5.8 Hz, ⁴J = 0.5 Hz), 7.48-7.40 (m, 2H), 7.32-7.21 (m, 3H), 7.05-6.98 (m, 2H), 6.68 (d, 1H, ³J = 6.9 Hz), RMN-³¹P [CD₃CN, 121.6565 MHz, δ (ppm)]: -144 (hep, PF₆).

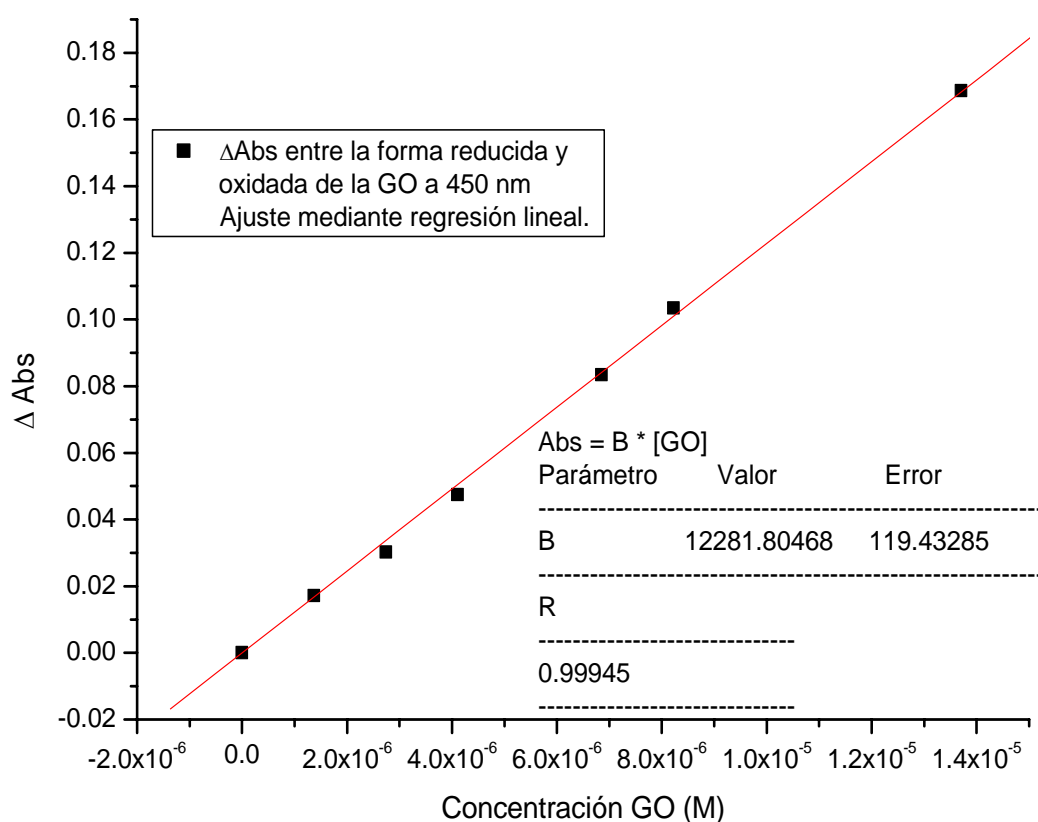
Compuesto 5. Rendimiento 51 %. EM [FAB⁺, m/z (a.r.)]: 640 (2%) [M + H]⁺, 460 (29%) [M + H - Phen]⁺, 280 (4%) [M + H - 2Phen]⁺. IR [pastilla/KBr, ν cm⁻¹]: 842 (f, PF₆). RMN-¹H [CD₃CN, 300.5311 MHz, δ (ppm)]: 8.76 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz), 8.64 (d, 1H, ³J = 7.4 Hz), 8.60 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz), 8.54 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz), 8.29 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.1 Hz), 8.18-8.12 (m, 2H), 8.04-7.75 (m, 9H), 7.62 (ddd, 1H, ³J = 7.4 Hz, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 1.1 Hz), 7.44-7.38 (m, 3H), 7.27-7.15 (m, 3H), 6.75 (d, 1H, ³J = 6.9 Hz). RMN-³¹P [CD₃CN, 121.6565 MHz, δ (ppm)]: -144 (hep, PF₆).

4.7. Determinaciones cinéticas.

Para la realización de los estudios cinéticos fue necesario determinar la actividad enzimática de la glucosa oxidasa suministrada por Aldrich Chemical Co, este procedimiento se realizó en seguimiento a lo informado en la literatura.⁽⁶⁴⁾

La actividad del grupo FAD es determinada por espectroscopia en el UV en un equipo HP 8453 Agilent, con un coeficiente de extinción molar diferencial entre la forma oxidada y reducida de la enzima reportado de $1.31 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 450 nm. Primeramente se prepararon 7 disoluciones con concentraciones de enzima que se encuentran en el intervalo de concentraciones de 1 μM a 10 μM a un pH ajustado de 5.5, con una disolución amortiguadora de acetatos 0.01, para cada una de las celdas se determinó la absorbencia a 450 nm y se procedió a adicionar en la celda espectrofotométrica 30 μl de una disolución

1.0 M de glucosa, se espera 1 minuto y se registra nuevamente la absorbencia a 450 nm. Se determina la diferencia de absorbencia entre la forma oxidada y reducida de la enzima y se elabora una gráfica de la diferencia de las absorbencias como función de la concentración de enzima preparada (Gráfica 1). El coeficiente de extinción molar obtenido se comparó con el informado en la literatura y de esta manera, se logró determinar la actividad de la enzima en función de la concentración de sitios activos FAD que posea la enzima. El valor experimental obtenido para el coeficiente de extinción molar diferencial entre las formas redox de la enzima fue de $1.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 450 nm, por lo que la concentración de enzima activa en el lote que suministra Aldrich Chemical Co. es del 94 %.



Gráfica 1. La diferencia de absorbencia entre las formas redox de la GO en función de la concentración de GO.

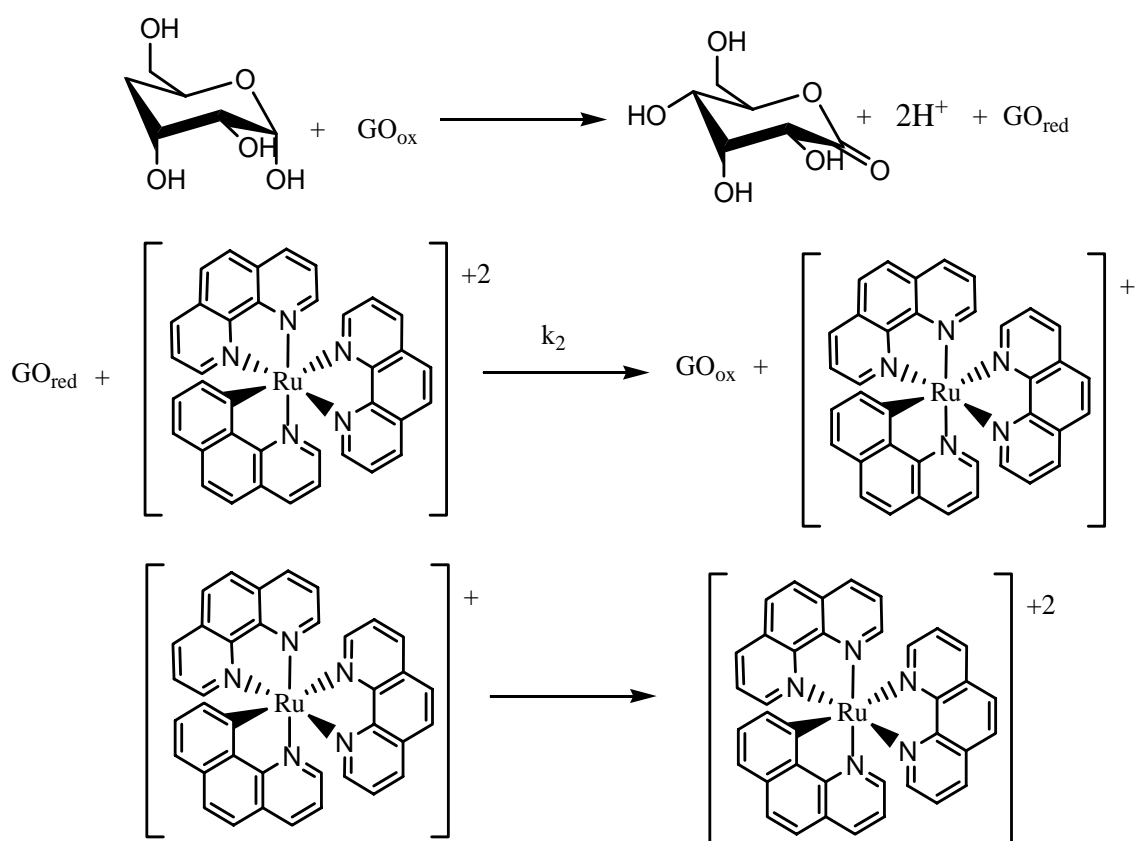
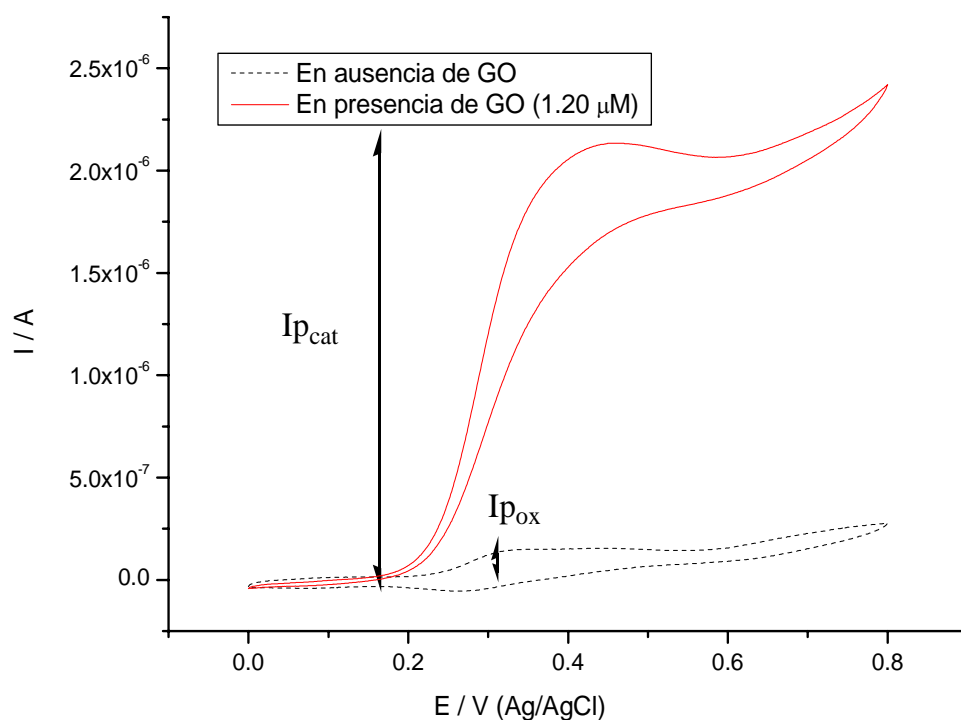
La determinación de la constante de velocidad del mediador para oxidar a la forma reducida de la enzima (k_2) se realizó de acuerdo a lo informado por Bourdillon y colaboradores.⁽⁶⁵⁾ Los parámetros cinéticos fueron obtenidos por la técnica de voltamperometría cíclica. Las mediciones cinéticas se realizaron sobre las determinaciones de las corrientes catalíticas obtenidas en presencia de mediador, enzima y glucosa ($I_{p_{cat}}$).

Cabe señalar que en el presente trabajo se inicia con la forma reducida del mediador (Ru^{II}), por lo que es necesario generar electroquímicamente la especie catalítica del mediador (Ru^{III}), para realizar la previa electrolisis fue necesario conocer el potencial redox de los rutenociclos preparados y posteriormente, en la determinaciones cinéticas, ajustar el barrido de potencial y la ventana de potencial con la finalidad de oxidar al complejo de rutenio(II) *in-situ* y con ello, determinar el parámetro cinético de interés en presencia y en ausencia de enzima (k_2). Para que el método señalado a continuación sea válido, la introducción de la enzima no debe afectar la estabilidad de la forma oxidada del mediador.

Las mediciones voltamperométricas en el presente trabajo se realizaron a un pH controlado de 7.1 mediante una disolución amortiguada de fosfatos 0.1M y a una temperatura controlada de 25 °C. La determinación de la corriente catalítica ($I_{\text{p}_{\text{cat}}}$) y de la corriente de oxidación del compuesto ($I_{\text{p}_{\text{ox}}}$) se realizó a diferentes velocidades de barrido (3 a 40 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) y de acuerdo a lo descrito en el Esquema 10. Se recomienda trabajar a bajas velocidades de barrido para la determinación de k_2 , con la finalidad de que el mediador siempre este presente al electrodo en su forma oxidada, asegurando con ello que el proceso catalítico siempre se este llevando a cabo. Las concentraciones que se trabajaron de mediador se encontraban en el intervalo de 2.5 μM y 0.1 mM, con un 5% de acetonitrilo, la concentración de la enzima siempre estuvo por debajo de los 3 μM y la concentración de glucosa fue de 0.1 M. Tomando en cuenta las condiciones de trabajo anteriormente señaladas, fue posible determinar la constante de segundo orden de la transferencia electrónica entre el mediador y la enzima redox mediante la elaboración de una grafica de $I_{\text{p}_{\text{cat}}}/I_{\text{p}_{\text{ox}}}$ en función de $([\text{GO}]/V)^{1/2}$. La pendiente obtenida mediante regresión lineal de la función, es igual a la siguiente expresión:

$$m = 3.17 \left(\frac{RT}{F} \right)^{1/2} k_2^{1/2} \quad \frac{RT}{F} = 0.059$$

Las unidades de k_2 son $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, las correspondientes a una constante de segundo orden de reacción.



Esquema 10. Un ejemplo de catálisis electroquímica de la glucosa oxidasa ($2.7\mu\text{M}$) en la oxidación de la glucosa en presencia con un rutenociclo, **compuesto 5**, como mediador (0.1mM). Se muestra la forma de determinar $I_{\text{p}_{\text{cat}}}$ e $I_{\text{p}_{\text{ox}}}$. Voltamperogramas en ausencia (línea punteada) y en presencia de glucosa (0.5 M) a una velocidad de barrido de 3 mV/s . el pH fue ajustado en 7.1 .

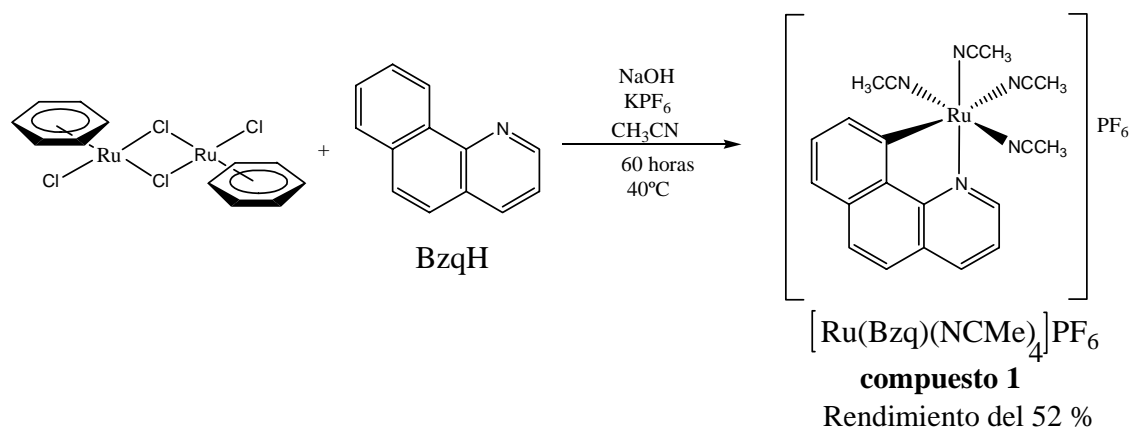
5. Complejos ciclometalados de rutenio(II).

5. Complejos ciclometalados de rutenio(II).

En esta parte de trabajo se analizarán los resultados obtenidos para la síntesis y la caracterización de los complejos ciclometalados de rutenio(II), discutiendo su espectrometría de masas FAB⁺, espectroscopia en el infrarrojo, RMN (¹H y ³¹P), en algunos casos difracción de rayos X y se discutirá de igual forma, su comportamiento electroquímico.

5.1. Rutenaciclo [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆.

Para la obtención de estos rutenaciclos fue necesario emplear el proceso de ciclometalación vía activación del enlace C-H de la posición *orto* de la benzoquinolina, mediante una sustitución electrofílica aromática promovida por un medio básico. El precursor de rutenio empleado para la obtención del metalociclo [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆ fue el [Ru(η⁶-C₆H₆)Cl₂]₂.



Ecuación 15. Síntesis del complejo ciclometalado [Ru(Bzq)(NCMe)₄]PF₆

Este complejo se obtuvo en un moderado rendimiento, si se compara con otras rutas para la obtención de metalociclos de rutenio(II).⁽⁴⁸⁾

El aspecto físico del compuesto obtenido en su forma amorfa es de color anaranjado, mientras que en su estado cristalino son agujas de color naranja brillante. En disolución de diclorometano o metanol el compuesto llega a ser inestable, al ser expuesto al aire presenta descomposición del rutenaciclo en un lapso de 10 horas, generando un aceite insoluble de color negro verdoso. Por otro lado, en estado sólido, ya sea cristalino o amorfo, los

compuestos suelen ser más estables que en disolución, es por ello que es necesario almacenar este metalociclo como sólido en un tubo de Schlenk con atmósfera inerte de argón para evitar su descomposición.

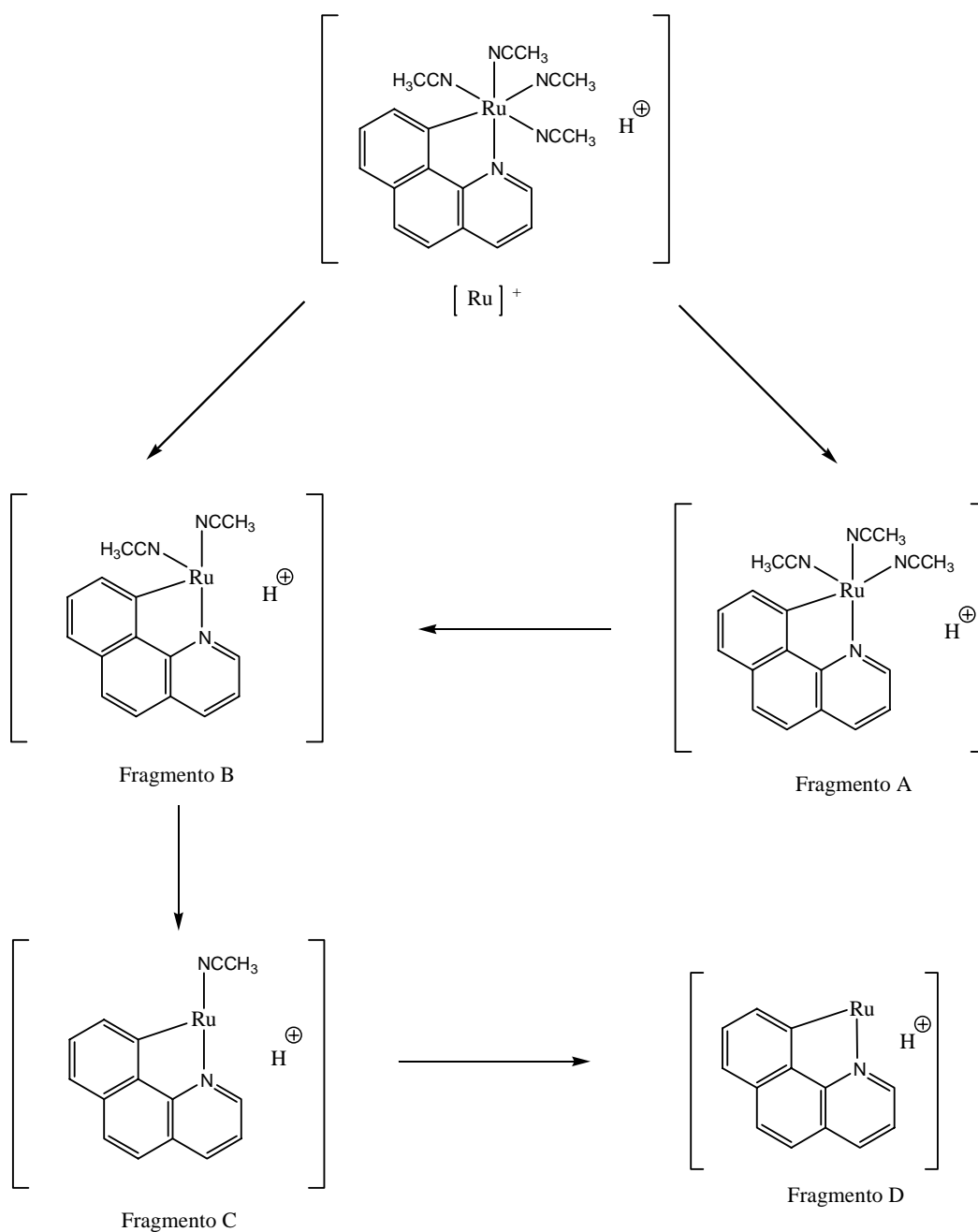
5.1.1. Espectrometría de masas FAB⁺.

En este tipo de técnica generalmente se observa la parte catiónica del complejo metálico. La m/z está de acuerdo con el peso molecular de fragmento catiónico del rutenaciclo [Ru(Bzq)(NCMe)]PF₆.

Tabla 4. Fragmentación en espectrometría de masas FAB⁺ del complejo [(Bzq)(NCMe)₄Ru]PF₆.

Compuesto	[Ru] ⁺		Fragmento A		Fragmento B		Fragmento C		Fragmento D	
	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.
1	444	2%	403	25%	362	5%	321	7%	280	4%

Para complementar el análisis de la espectrometría de masas se observan diversos fragmentos que guardan una relación con el ion molecular en su forma catiónica, ya que se tiene una pérdida de 41 unidades, la cual correspondería a una pérdida del ligante NCCH₃ y la presencia del fragmento A. Posteriormente se tienen las siguientes 3 pérdidas consecutivas de 41 unidades, lo cual indica la fragmentación de otros 3 ligantes acetonitrilo, los cuales se encuentran en la esfera de coordinación del complejo ciclometalado, teniendo como resultado a los fragmentos B, C y D. Este último fragmento registrado ya no contiene ningún ligante acetonitrilo en la esfera de coordinación del centro metálico, ya que el centro metálico solamente estaría unido a la benzoquinolina. En todas las señales está presente la isotopía del rutenio. Con base en lo antes mencionado es posible proponer un patrón de fragmentación característico, considerando la peculiaridad de que todos los metalociclos presentes en este trabajo el ion y los fragmentos generados están ionizados con +1 unidad de m/z (Esquema 11).



Esquema 11. Propuesta para el patrón de fragmentación del metalociclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$.

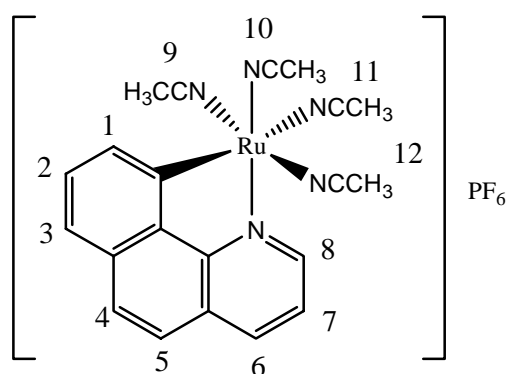
5.1.2. Espectroscopia en el infrarrojo.

Mediante este tipo de estudio es posible describir cualitativamente los grupos funcionales que estén presentes en una molécula. En el caso de este rutenociclo, se observa una banda intensa a 838 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento del enlace P-F del anión hexafluorofosfato. Una banda de mediana intensidad se presenta a 2277 cm^{-1} , y

corresponde al estiramiento simétrico del triple enlace C-N de los acetonitrilos que se encuentran en la esfera de coordinación del rutenio. En los 3000 cm^{-1} se observan señales correspondientes a los metilenos de los anillos aromáticos.

5.1.3. Resonancia magnética nuclear.

Para este rutenaciclo se observan señales correspondientes a protones aromáticos y a protones pertenecientes a los metilos de los ligantes acetonitrilo. A continuación se exhiben la estructura molecular del metalociclo sintetizado (Esquema 12), enumerando los átomos de carbono que soporten protones, con la finalidad de relacionar sus respectivos desplazamientos químicos y la multiplicidad que presenten algunas de las señales en la estructura molecular del compuesto planteado (tabla 5).



Esquema 12. Estructura molecular del **compuesto 1**.

Tabla 5. Desplazamientos químicos (ppm) en RMN ^1H del rutenaciclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$, realizados en CD_3CN

H-8	H-1	H-7	H-6	H-3	H-2	H-9 y H-12	H-10 / H-11
9.18 (dd)	8.26 (dd)	8.17 (dd)	7.83 (d)	7.67 (d)	7.53 (dd)	1.96 (s)	2.58 (s) ó 1.90 (s)

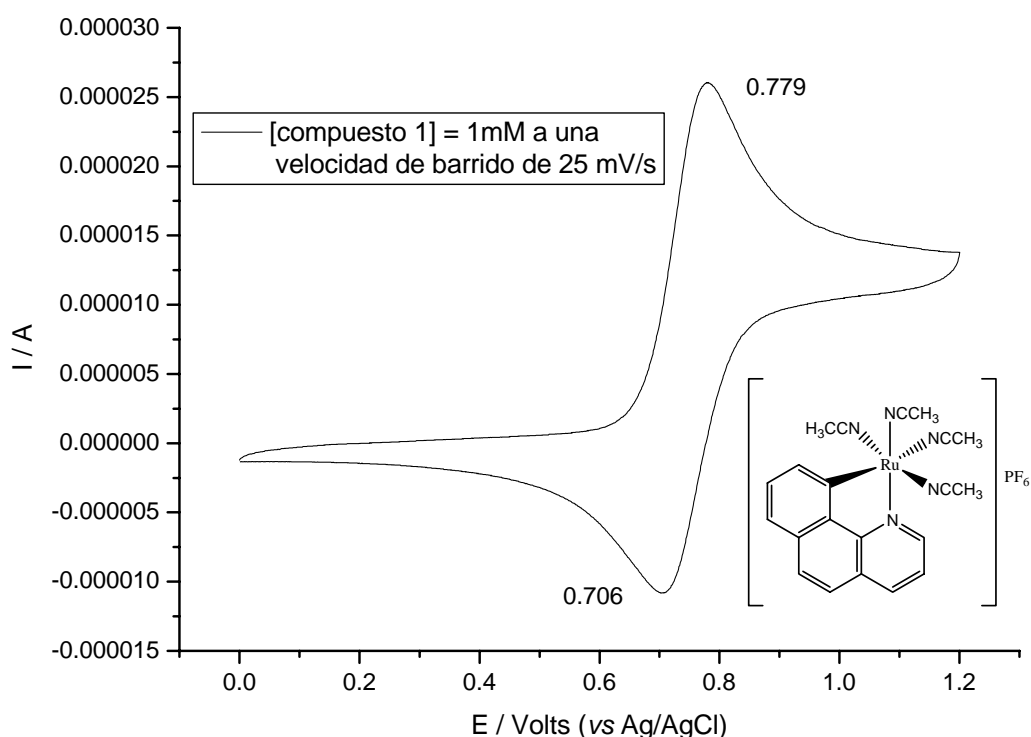
Como se puede observar en la tabla, el protón H-8 para el metalociclo es el más desplazado hacia campos bajos, debido a que el enlace N-Ru desprotege al protón *orto* a este enlace. Bajo el mismo criterio, el protón H-1 se encuentra a 8.26 ppm debido al efecto de desprotección que genera el enlace C-Ru. Por otro lado, es posible relacionar en la estructura molecular propuesta, las señales correspondientes a los protones de los ligantes acetonitrilo. La señal que se encuentra a 1.96 ppm correspondería a los protones

pertenecientes a dos de los ligandos acetonitrilo (H-9 y H-12), estos protones son químicamente y magnéticamente equivalentes.

En RMN de ^{31}P es posible confirmar la presencia del anión hexafluorofosfato, ya que se observa una señal héptuple de señales en -144 ppm para el **compuesto 1**, dado que se presenta un acoplamiento entre el fósforo y los seis átomos de flúor.

5.1.4. Caracterización electroquímica.

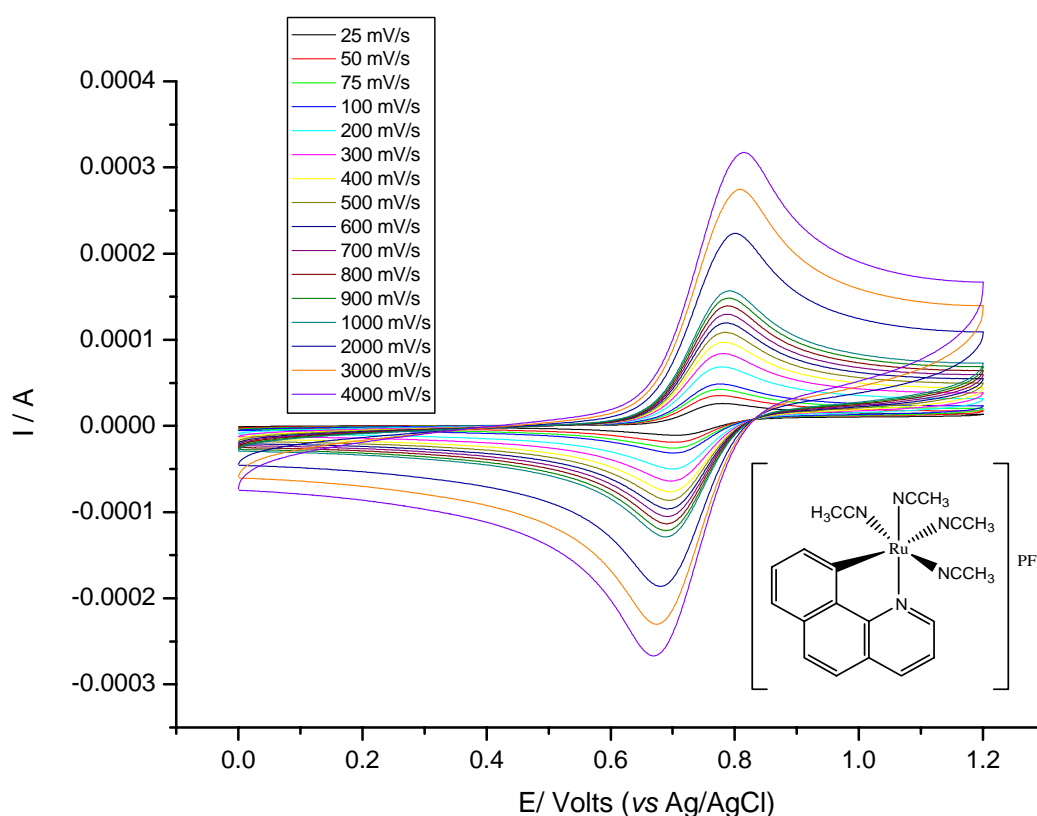
En este apartado se caracteriza al complejo organometálico con un enfoque electroquímico. Se puso una mayor énfasis al proceso de oxidación del complejo ciclotalado de rutenio(II), debido a la importancia que pueden llegar a presentar las especies $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ en el papel de mediador en la transferencia asistida del electrón con glucosa oxidasa.



Gráfica 2. Voltamperometría cíclica del **compuesto 1** a una velocidad de barrido de 25 mV/s con $[(\text{nBu})_4\text{NPF}_6] = 0.1 \text{ M}$ en CH_3CN

En este caso se ajustó la ventana de potencial con la finalidad de determinar por voltamperometría cíclica el potencial redox del complejo organometálico a una baja velocidad de barrido de $25\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. De acuerdo a la Gráfica 2 el potencial redox del

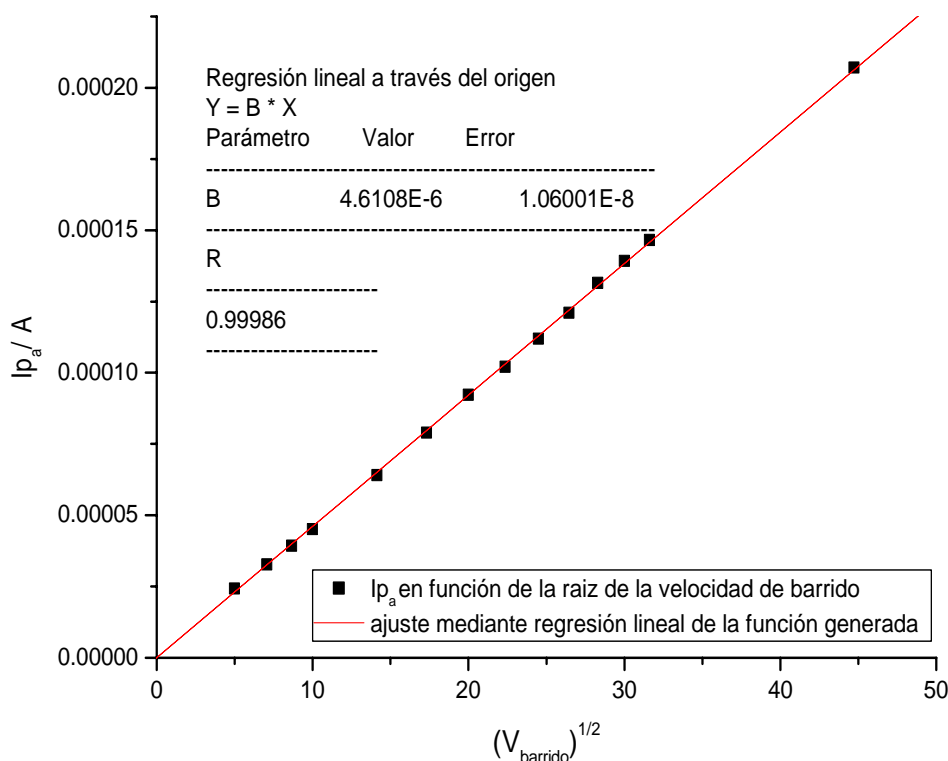
complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$ es de 0.743 Volts (vs Ag/AgCl). Por otro lado, se observa un comportamiento reversible del complejo metálico entre las especies $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$, ya que el cociente entre la intensidad de pico anódico ($I_{p_{ox}}$) y pico catódico (I_{p_c}) llega a ser de 1.13. Para corroborar la reversibilidad del sistema es necesario realizar la voltamperometría cíclica del complejo ciclotalado de rutenio(II) a diferentes velocidades de barrido (Gráfica 3), con ello es posible determinar la reversibilidad del sistema redox presente en esta ventana de potencial.



Gráfica 3. Voltamperometría cíclica del **compuesto 1** (1mM) a diferentes velocidades de barrido (25-4000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) con $[(\text{nBu})_4\text{NPF}_6]$ 0.1 M en CH_3CN .

El proceso $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ es reversible, ya que a diferentes velocidades de barrido, las intensidades de pico anódico y catódico se mantienen a un potencial constante (Gráfica 3), además de que la razón entre la corriente de pico anódico (I_{p_a}) y la corriente del pico catódico (I_{p_c}) presentan un valor cercano a la unidad para las velocidades de barrido trabajadas.

Una forma como se determina contundentemente el carácter reversible del proceso $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$, consiste en la elaboración de una gráfica, en la que se tenga la intensidad de corriente del pico anódico en función de la raíz de la velocidad de barrido (Gráfica 4).



Gráfica 4. Intensidad de corriente del pico anódico en función de la velocidad de barrido para el **compuesto 1** (1mM) y $[(n\text{Bu})_4\text{NPF}_6] = 0.1 \text{ M}$ como electrolito soporte en CH_3CN .

En este caso la intensidad de corriente del pico anódico es proporcional a la raíz de la velocidad de barrido, la cual está de acuerdo con la siguiente expresión.

$$I_{p_a} = (2.69 \cdot 10^8) n^{3/2} A C D^{1/2} V^{1/2}$$

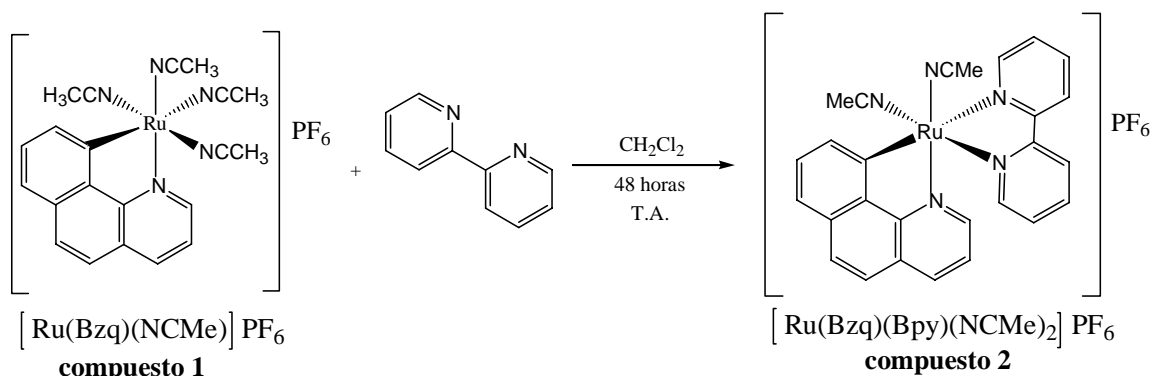
Donde n es el número de electrones intercambiados en la semi-reacción, A es la superficie del electrodo (m^2), C es la concentración del analito (M), D es la constante de difusión del analito (m^2/s) y V es la velocidad del barrido de potencial (V/s). En relación a los resultados obtenidos a partir de la Gráfica 4, se concluye que el sistema presenta una reversibilidad entre el equilibrio redox de sus formas reducida y oxidada del complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$.

Con base en el estudio electroquímico realizado es posible proponer al complejo ciclometalado de rutenio(II), $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$, como un posible mediador en la

transferencia asistida del electr3n con la glucosa oxidasa. Por otro lado, uno de los factores que no facilitar3 su posible aplicaci3n en electrocat3lisis ser3a la descomposici3n que presenta este compuesto al estar en contacto por tiempos prolongados con una atm3sfera de ox3geno molecular. Las pruebas electroqu3micas de actividad con la oxido-reductasa ser3n discutidas en el cap3tulo 7 del presente trabajo.

5.2 Rutenaciclo [Ru(Bzq)(bpy)(NCMe)₂]₂PF₆.

Como se mencion3 con anterioridad, el complejo ciclometalado de rutenio [Ru(Bzq)(NCMe)₄]₂PF₆ es sensible al ox3geno molecular, lo cual desfavorece su posible aplicaci3n como mediador en la transferencia asistida de electr3n con glucosa oxidasa, es por ello que este **compuesto 1** se emplear3 en el presente trabajo, como un precursor para la preparaci3n de otros metalociclos de rutenio(II). Se llev3 a cabo una adici3n de un ligante bidentado nitrogenado arom3tico (2,2'-bipiridina) a la esfera de coordinaci3n del complejo [Ru(Bzq)(NCMe)₄]₂PF₆, con la finalidad de aumentar la estabilidad de este compuesto. Adem3s, se conoce experimentalmente que este ligante favorece la transferencia asistida de electr3n con la glucosa oxidasa.⁽⁸⁾ Conociendo que la 2,2'-bipiridina es un ligante donador bidentado σ fuerte, se espera que esta entidad favorezca la eliminaci3n de dos ligantes acetonitrilo del complejo [Ru(Bzq)(NCMe)₄]₂PF₆, para tener la adici3n a la esfera de coordinaci3n de la 2,2'-bipiridina y de esta manera obtener como complejo resultante al rutenaciclo [Ru(Bzq)(Bpy)(CH₃CN)₂]₂PF₆. Este es un proceso de sustituci3n, en el que los ligantes acetonitrilo van a ser desplazados por el ligante bidentado nitrogenado arom3tico. Los rendimientos para esta reacci3n son moderados y un factor que influir3 en la s3ntesis de estos complejos es el medio de reacci3n, ya que el diclorometano favorece la salida de los ligantes acetonitrilo. (Ecuaci3n 16).



Ecuaci3n 16. Reacci3n de sustituci3n entre el **compuesto 1** y la 2,2'-bipiridina.

La reacción solamente genera un isómero, siendo este soluble en acetonitrilo, diclorometano, acetona y metanol. En estado amorfo presenta un color rojo oscuro, mientras que en su forma cristalina la coloración es café rojiza. Este metalociclo es estable a temperatura ambiente e inerte químicamente al oxígeno molecular, así como a diversos disolventes (acetona, diclorometano, metanol, agua). El factor de estabilidad es un punto a favor para considerar a este compuesto como un posible mediador en la transferencia electrónica con glucosa oxidasa y aplicarlo como biosensor de segunda generación. Cabe señalar que el punto más relevante de todos viene siendo la estabilidad redox que lleguen a presentar las formas reducida y oxidada del complejo ciclotmetalado preparado. Esto se analizará más adelante en la caracterización electroquímica del **compuesto 2**.

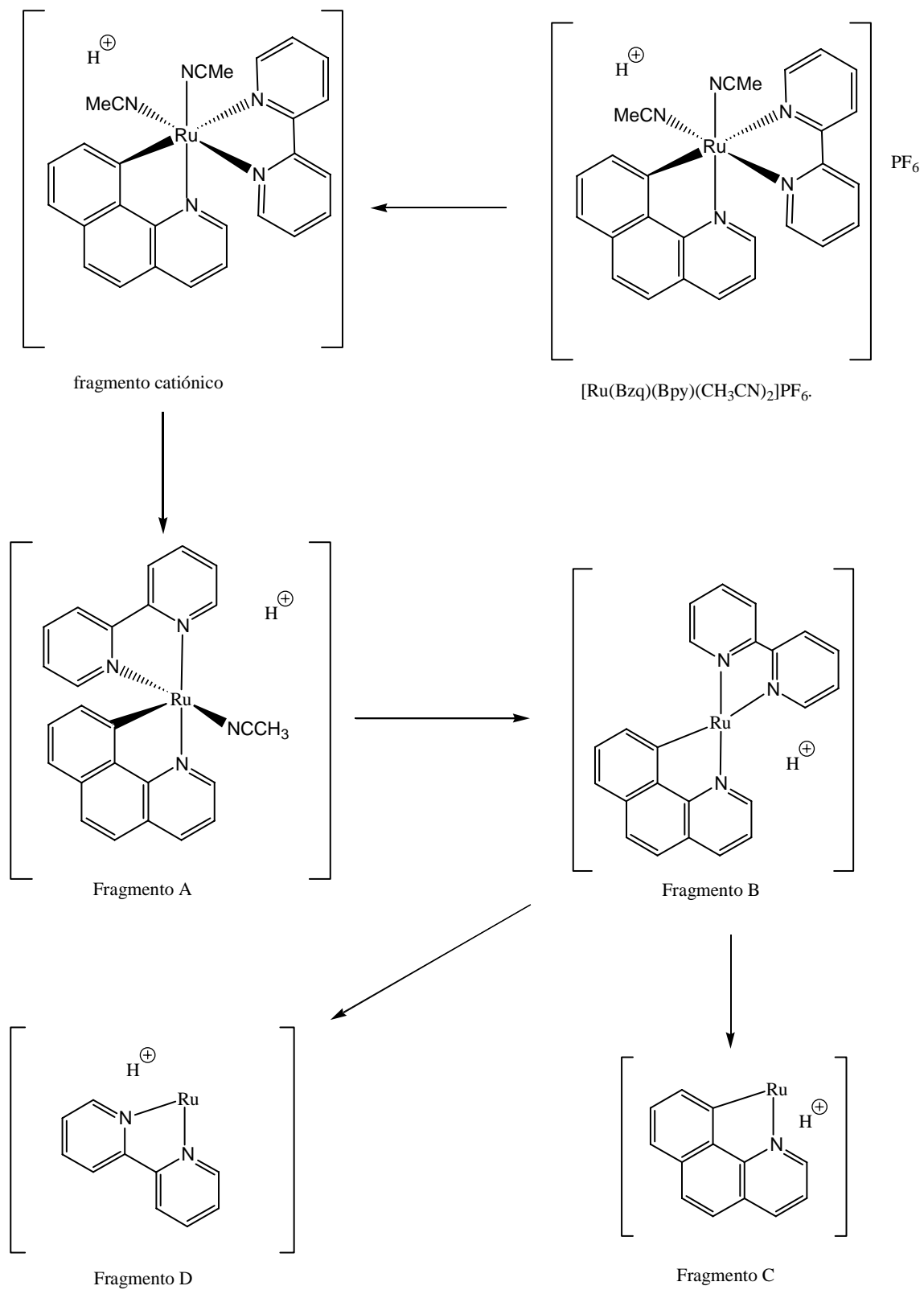
5.2.1 Espectrometría de masas FAB⁺.

En esta ocasión si se observa la relación m/z correspondiente a todo el complejo metálico (parte catiónica y aniónica). Por otro lado, como es de esperar en este tipo de espectrometría, se observa el peso molecular correspondiente al fragmento catiónico, concordando con la estructura molecular propuesta para el metalociclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$.

A continuación se mostrará el patrón de fragmentación para el **compuesto 2**, el cual guarda una cierta relación con el ion molecular del fragmento catiónico, ya que existen dos pérdidas correspondientes a los ligantes acetonitrilos, de tal manera que se tendrían los fragmentos A y B, también se observa la pérdida de una 2,2'-bipiridina, considerando un fragmento C, el fragmento D correspondería a la pérdida de los ligantes acetonitrilo y de la benzoquinolina. De acuerdo con lo mencionado anteriormente se plantea la una propuesta de patrón de fragmentación para el **compuesto 2** (Esquema 13), y se reportan las relaciones de m/z para el rutenacilo sintetizado (Tabla 6).

Tabla 6. Ion molecular y fragmentos observados para el complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$.

Ion molecular		$[\text{Ru}]^+$		Fragmento A		Fragmento B		Fragmento C		Fragmento D	
m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.
663	4%	518	22%	477	19%	436	72%	279	10%	257	7%



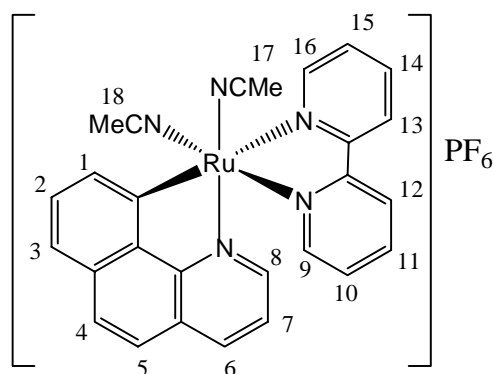
Esquema 13. Propuesta para el patrón de fragmentación del complejo ciclometalado $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$.

5.2.2 Espectroscopia en el infrarrojo.

Para este metalociclo la banda intensa corresponde al estiramiento del enlace P-F correspondiente al anión hexafluorofosfato, la cual llega a estar presente a los 843 cm^{-1} , además de que se registra una banda de baja intensidad entre los 2267 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento C-N de los ligantes acetonitrilos que se encuentran unidos al centro metálico.

5.2.3 Resonancia magnética nuclear.

Para este complejo ciclometalado de rutenio(II) se muestra su estructura molecular, enumerando los átomos de carbono que soportan protones para facilitar la asignación de los desplazamientos químicos y la multiplicidad perteneciente para algunas de las señales (Esquema 14).



Esquema 14. Estructura molecular para el rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$, enumerando las posiciones que soportan protones dentro de la molécula.

Tabla 7. Desplazamientos químicos (ppm) en RMN ^1H del rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$, realizada en CD_3CN

H-8	H-9	H-1	H-16	H-7	H-18 / H-17
9.18 (dd)	8.48 (dt)	8.44 (dd)	8.21 (dt)	8.21 (td)	2.25 (s) / 2.12 (s)

La señal más desplazada hacia campos más bajos corresponde al protón *orto* al enlace N-Ru entre la benzoquinolina y el centro metálico, la desprotección es generada por el centro metálico. La señal que se encuentra a 8.48 corresponde al protón H-9. Las señales que se encuentran entre los 8.48 y los 6.84 ppm corresponden a los protones aromáticos

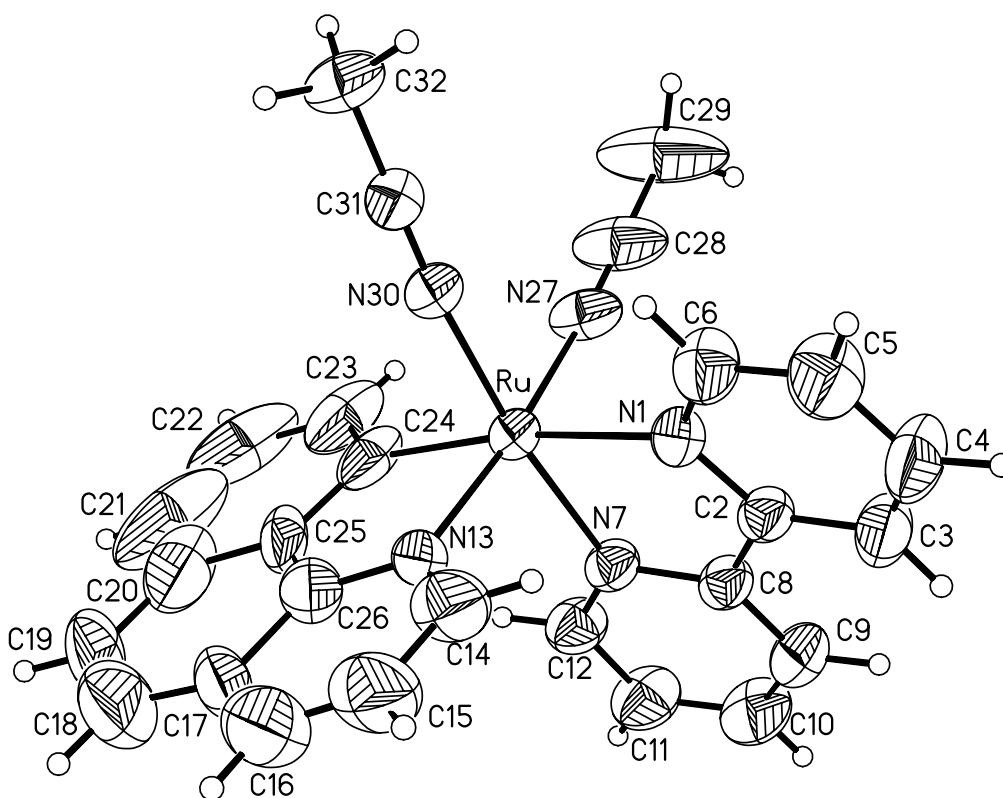
restantes que se encuentran dentro de la estructura molecular propuesta. Las dos señales que se encuentran a campos altos (2.25-2.12 ppm) corresponden a los protones pertenecientes a los ligantes acetonitrilo (H-18 y H-17), los cuales no son ni químicamente ni magnéticamente equivalentes debido a que se tiene solamente el isómero mostrado en el Esquema 14, el cual fue corroborado por difracción de rayos X.

En RMN de ^{31}P es posible corroborar la presencia del anión hexafluorofosfato dentro de la molécula, ya que se observa una señal héptuple en -144 ppm, correspondiente al acoplamiento entre el fósforo y los seis átomos de flúor.

5.2.4 Difracción de rayos X.

La estructura del **compuesto 2** fue confirmada por la técnica de difracción de rayos X (Esquema 15). La molécula tiene el anión hexafluorofosfato dentro de la estructura molecular, además de que este rutenaciclo tiende a cristalizar con una molécula de diclorometano, los cuales fueron omitidos por claridad de la estructura molecular del complejo.

La geometría que presenta $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$ es la de un octaedro distorsionado. En este metalociclo también se observa que el enlace Ru-N1 en posición *trans* al enlace Ru-C24 tiene el valor más grande en cuestión de longitud, esto se debe a la influencia *trans* que presenta el enlace Ru-C24. Las distancias de Ru1-N30 y Ru1-N27 llegan a ser muy semejantes, además de que la posición de los ligantes acetonitrilo es en *cis* lo cual está de acuerdo con lo propuesto en RMN ^1H . Por otro lado, las longitudes de estos enlaces en comparación con las Ru-N13, Ru-N7 y Ru-N1 llegan a ser menores, indicando que el enlace entre N-Ru es más fuerte en los acetonitrilos, con respecto a los otros enlaces Ru-N. Esto puede explicar la formación de este isómero, ya que de ser así, los acetonitrilos del **compuesto 1** al reaccionar con 2,2'-bipiridina tienen un efecto *trans* sobre los otros acetonitrilo del **compuesto 1**, lo que posteriormente conlleva a la coordinación del ligante bidentado nitrogenado aromático al complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ en la posición *trans* al acetonitrilo y al enlace Ru-C (Esquema 16).



Esquema 15. Estructura molecular del **compuesto 2**, se omitió el anión hexafluorofosfato y la molécula de CH_2Cl_2 .

Tabla 8. Datos cristalográficos para el **compuesto 2**.

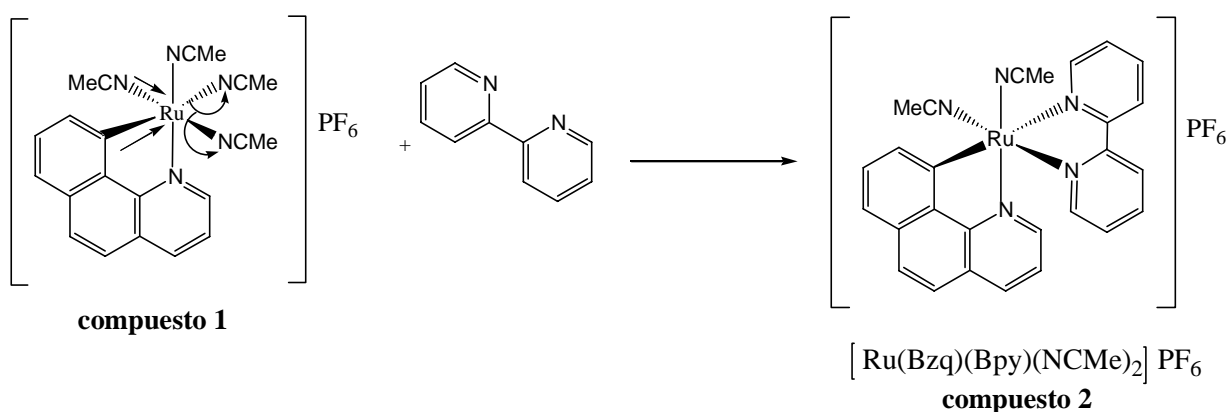
Parámetros		
Temperatura	291 K	
Fórmula empírica	$\text{C}_{27} \text{H}_{22} \text{F}_6 \text{N}_5 \text{P Ru}$ con CH_2Cl_2	
Peso fórmula	747.46 g/mol	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	$\text{P2}_1/\text{c}$	
Dimensiones de la celda unitaria	$a = 15.2255(12) \text{ \AA}$	$\alpha = 90.00^\circ$
	$b = 13.7004(11) \text{ \AA}$	$\beta = 114.42^\circ$
	$c = 16.1399(12) \text{ \AA}$	$\gamma = 90.00^\circ$
Z	4	
Densidad	1.620 Mg/m^3	
Coefficiente de absorción	0.802 mm^{-1}	
Intervalo Θ	1.47 to 25.00°	
Reflexiones colectadas	24575	
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados-matriz completa	
R_{final}	$R_1=0.0554$ $wR_2=0.1505$	

Tabla 9. Longitudes de enlace más representativas para el **compuesto 2**.

Enlace seleccionado	Longitudes de enlace (Å)
Ru-N(30)	2.014(4)
Ru-N(27)	2.017(5)
Ru-C(24)	2.038(6)
Ru-N(7)	2.053(4)
Ru-N(13)	2.078(5)
Ru-N(1)	2.130(4)

Tabla 10. Ángulos de enlace más representativos para el **compuesto 2**.

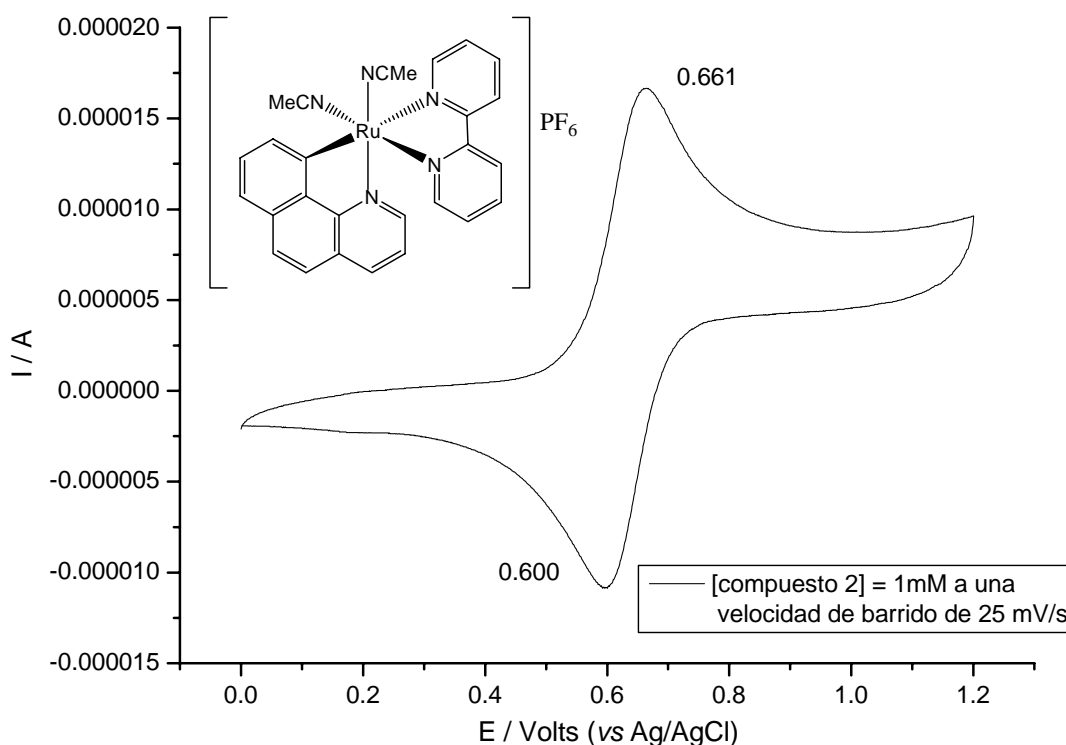
Ángulos seleccionados	grados	Ángulos seleccionados	Grados
N(30)-Ru-N(27)	86.49(17)	N(7)-Ru-N(1)	77.50(16)
N(30)-Ru-C(24)	90.61(19)	N(13)-Ru-N(1)	93.26(19)
N(27)-Ru-C(24)	94.9(3)	C(2)-N(1)-C(6)	117.3(5)
N(30)-Ru-N(7)	172.73(17)	C(2)-N(1)-Ru	115.7(3)
N(27)-Ru-N(7)	90.85(17)	C(6)-N(1)-Ru	127.0(4)
N(30)-Ru-N(1)	95.77(16)	N(1)-C(2)-C(3)	122.3(5)
N(27)-Ru-N(1)	91.01(19)	N(1)-C(2)-C(8)	113.9(4)
C(24)-Ru-N(1)	171.6(2)		



Esquema 16. Propuesta mecanística para la obtención de solamente uno de los isómeros del complejo [Ru(Bzq)(Bpy)(CH₃CN)₂]PF₆

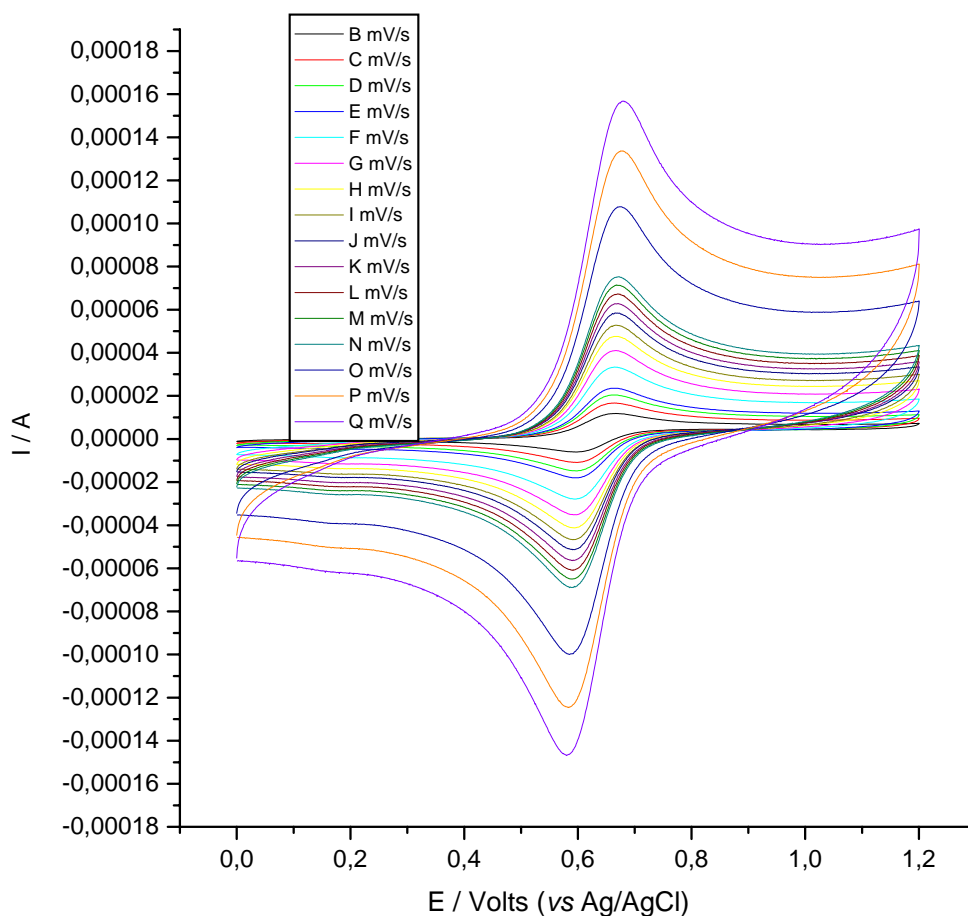
5.2.5. Caracterización electroquímica.

Como en el caso anterior se hará énfasis en el proceso oxidante del complejo organometálico de rutenio(II), por el papel que puede presentar el **compuesto 2** como mediador en la transferencia asistida electrónica con glucosa oxidasa.



Gráfica 5. Voltamperometría cíclica del **compuesto 2** a una velocidad de barrido de 25 mV/s con [(nBu)₄NPF₆] = 0.1 M en CH₃CN.

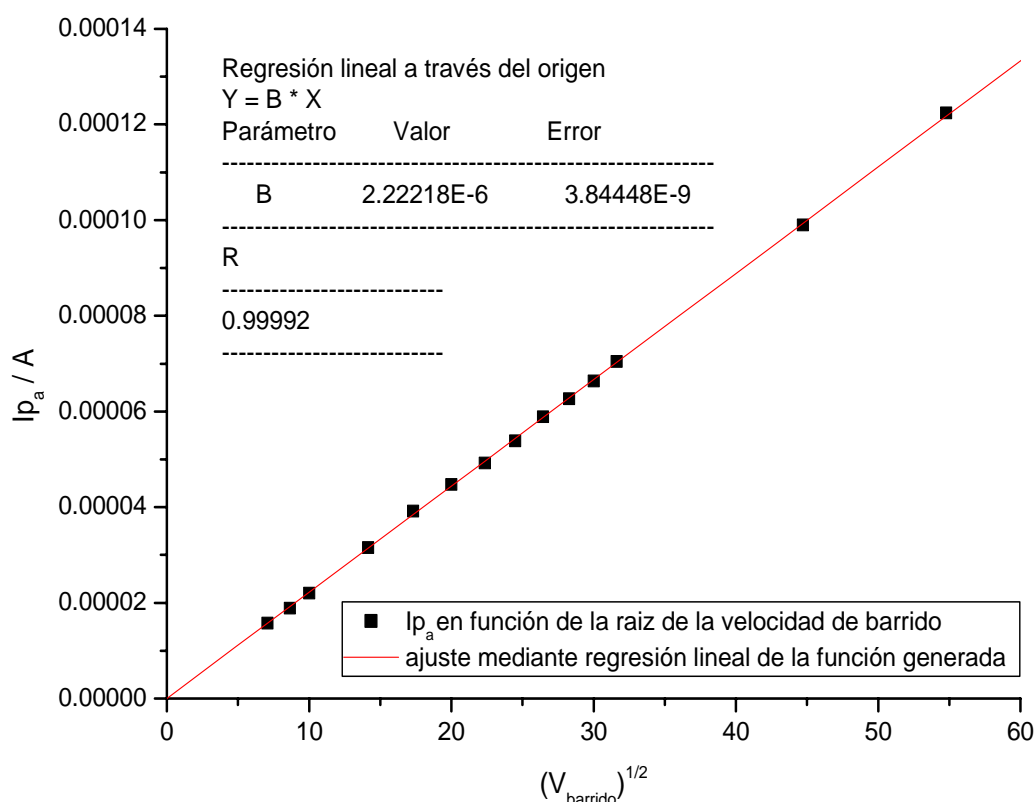
En este caso se ajustó la ventana de potencial con la finalidad de determinar por voltamperometría cíclica el potencial redox del complejo organometálico a una baja velocidad de barrido de 25 mV*s⁻¹. De acuerdo a la Gráfica 5, el potencial redox del complejo [Ru(Bzq)(Bpy)(NCMe)₂]²⁺PF₆⁻ es de 0.630 Volts (vs Ag/AgCl). En primera instancia se observa un comportamiento reversible entre las transiciones redox Ru^{II}/Ru^{III} en el complejo, ya que el cociente entre la intensidad de pico anódico (I_{p_{ox}}) y pico catódico (I_{p_c}) llega a ser de 1.08, es por ello que llega a ser necesario realizar la voltamperometría cíclica del **compuesto 2** a diferentes velocidades de barrido (Gráfica 6), con la finalidad de determinar la reversibilidad entre las formas oxidada y reducida del compuesto.



Gráfica 6. Voltamperometría cíclica del **compuesto 2** (1mM) a diferentes velocidades de barrido (25-4000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) con $[(\text{nBu})_4\text{NPF}_6]$ 0.1 M en CH_3CN .

El proceso $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ indica que el compuesto es reversible a bajas velocidades de barrido (menores a 1000 mV/s), ya que el potencial correspondiente a la corriente de pico anódico o catódico se mantiene constante a diferentes velocidades de barrido. Por otro lado, elaborando una gráfica en la que se tenga la intensidad de corriente en función de la raíz de la velocidad de barrido (Gráfica 7), es posible determinar con certeza la reversibilidad del sistema. En este caso se tiene una función lineal para la corriente de pico anódico en función de la raíz de la velocidad de barrido, lo cual señala que el equilibrio redox entre las especies $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ del **compuesto 2** es reversible.

El complejo $[(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{NCMe})_2\text{Ru}]\text{PF}_6$ cumple varios requisitos que le permiten ser un potencial candidato como mediador en la transferencia asistida con la glucosa oxidasa. En el capítulo 7 se describen los resultados electroquímicos que mostró este complejo ciclometalado de rutenio(II) como mediador de la oxido-reductasa.

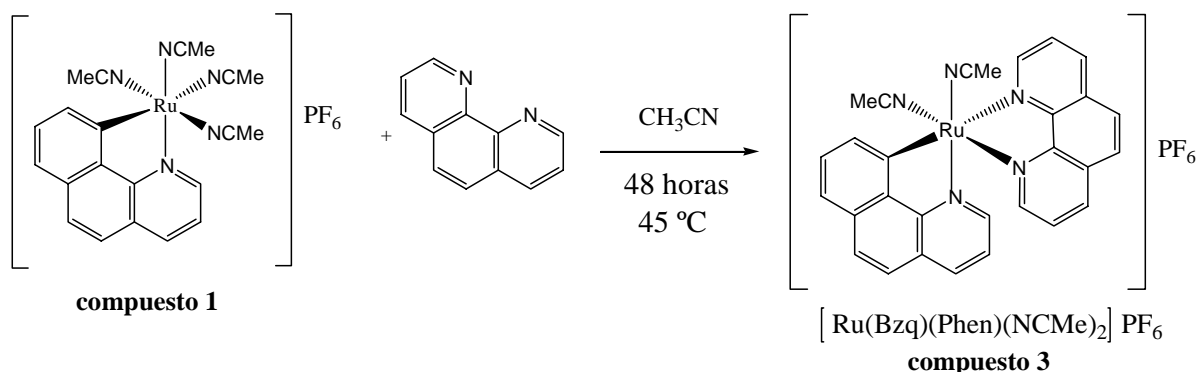


Gráfica 7. Intensidad de corriente del pico anódico en función de la velocidad de barrido para el **compuesto 2** (1mM) y $[(nBu)_4NPF_6] = 0.1$ M como electrolito soporte en CH_3CN .

5.3 Rutenacilo $[Ru(Bzq)(Phen)(NCMe)_2]PF_6$.

Para la obtención de este rutenacilo es necesario emplear al **compuesto 1** como precursor para la síntesis del complejo $[Ru(Bzq)(Phen)(NCMe)_2]PF_6$. El disolvente desempeña un papel relevante en la síntesis de este complejo metálico, ya que se obtiene un mejor rendimiento cuando esta reacción se efectúa en acetonitrilo y no en diclorometano, como en el caso de la síntesis del **compuesto 2**. Se conoce que la 1,10-fenantrolina tiene un mayor carácter coordinante que la 2,2'-bipiridina, permitiendo que la síntesis sea posible de realizar en acetonitrilo como disolvente de reacción. En este caso no existe una marcada competencia entre la coordinación de la 1,10-fenantrolina y el acetonitrilo, el cual está como disolvente y como ligante en la esfera de coordinación del **compuesto 1**, promoviendo que la 1,10-fenantrolina elimine dos de los ligantes acetonitrilos de la esfera de coordinación del rutenacilo $[Ru(Bzq)(NCMe)_4]PF_6$ y se adicione este ligante bidentado nitrogenado aromático a la esfera de coordinación del

compuesto 1. La obtención del compuesto $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ llega a presentar un rendimiento de reacción del 57%.

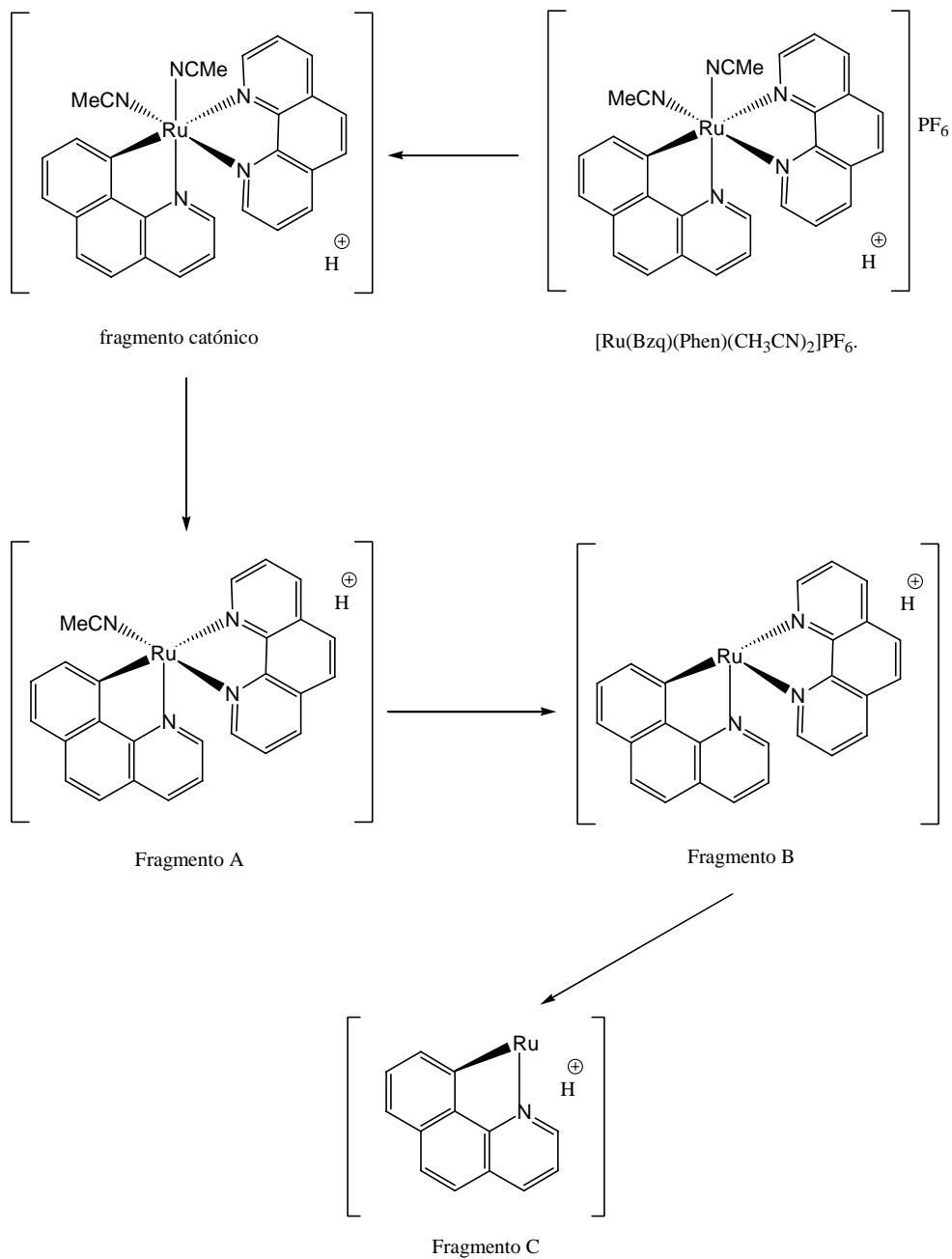


Ecuación 17. Reacción de adición de la 1,10-fenantrolina para la obtención del metalociclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$

Este metalociclo de rutenio(II) es soluble en acetonitrilo, acetona y diclorometano y llega a ser parcialmente soluble en metanol, es estable, tanto en estado sólido como en disolución a condiciones ambientales. La coloración que presentan en general estos complejos en su estado sólido es café claro en su forma amorfa y café rojiza en su forma cristalina.

5.3.1. Espectrometría de masas FAB⁺.

Se tiene registro del valor m/z para toda la molécula ionizada, aunque en una baja abundancia relativa con respecto a los demás fragmentos, se observa el fragmento catiónico del complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$. Se observan dos fragmentos que corresponde a las pérdidas consecutivas de los dos ligantes acetonitrilo, los cuales corresponderían al fragmento A y al fragmento B dentro del patrón de fragmentación propuesto a continuación (Esquema 17). También esta presente un fragmento C el cual corresponde a la pérdida del ligante bidentado nitrogenado aromático del fragmento B respectivamente. De acuerdo con la propuesta realizada es posible señalar las relaciones m/z para el complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ (Tabla 11).



Esquema 17. Propuesta para el patrón de fragmentación para el metalociclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$

Tabla 11. Ion molecular y fragmentos observados para el complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$.

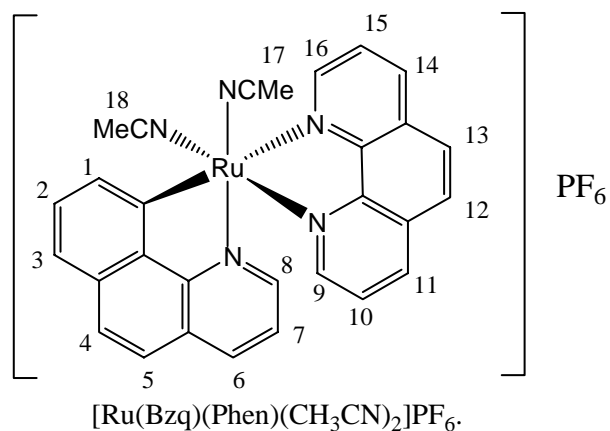
Ion molecular		$[\text{Ru}]^+$		Fragmento A		Fragmento B		Fragmento C	
<i>m/z</i>	%a.r.	<i>m/z</i>	%a.r.	<i>m/z</i>	%a.r.	<i>m/z</i>	%a.r.	<i>m/z</i>	%a.r.
687	3%	542	11%	501	7%	460	29%	280	7%

5.3.2. Espectroscopia en el infrarrojo.

Para el **compuesto 3** la banda intensa que se encuentra a los 842 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace P-F correspondiente al anión hexafluorofosfato, presente como contraión dentro del complejo metálico. Se registra una banda de mediana intensidad presente a los 2267 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento C-N de los ligantes acetonitrilos que se encuentran coordinados al centro metálico. También se elucidan metilenos y metilos dentro del complejo metálico (bandas de gran intensidad en el intervalo de $3150\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$)

5.3.3. Resonancia Magnética Nuclear.

Para este complejo ciclometalado de rutenio(II) se muestra su estructura molecular, enumerando los átomos de carbono que soportan protones, con el fin de facilitar la asignación de los desplazamientos químicos y la multiplicidad perteneciente a algunas señales (Esquema 18).



Esquema 18. Estructura molecular para el rutenaciclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$, enumerando las posiciones que soportan protones dentro de la molécula.

Tabla 12. Desplazamientos químicos (ppm) en RMN ^1H del rutenaciclo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$.

H-8	H-9	H-16	H-17 / H-18
9.81 (d)	8.75 (d)	8.52 (d)	2.19 (s) / 2.14 (s)

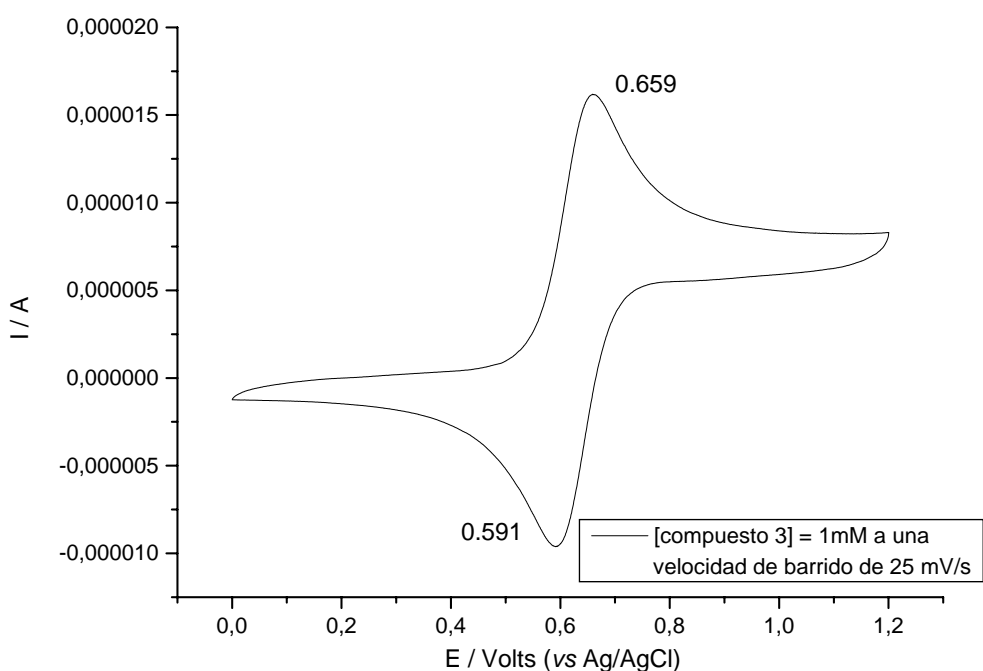
Como se ha observado en los otros metalociclos, la señal que está más desplazada hacia campos bajos corresponde al protón *orto* al enlace N-Ru, esta desprotección es generada por el centro metálico. La señal que se encuentra en 8.79 ppm corresponde al protón H-9, mientras que el protón H-16 presenta un desplazamiento a campos altos, con respecto al protón H-9. Las señales que se encuentran entre los 8.25 y los 6.95 ppm corresponden a los protones aromáticos restantes que se encuentran dentro de la estructura molecular propuesta. Las dos señales que se encuentran a campos muy altos (2.19 y 2.14 ppm) corresponden a los protones pertenecientes a los ligantes acetonitrilo (H-18 y H-17), los cuales no son ni químicamente ni magnéticamente equivalentes debido al isómero obtenido de la reacción (Esquema 18).

En RMN de ^{31}P es posible corroborar la presencia del anión hexafluorofosfato dentro de la molécula, ya que se registra una señal héptuple en -144 ppm, correspondiente al acoplamiento entre el fósforo y los seis átomos de flúor.

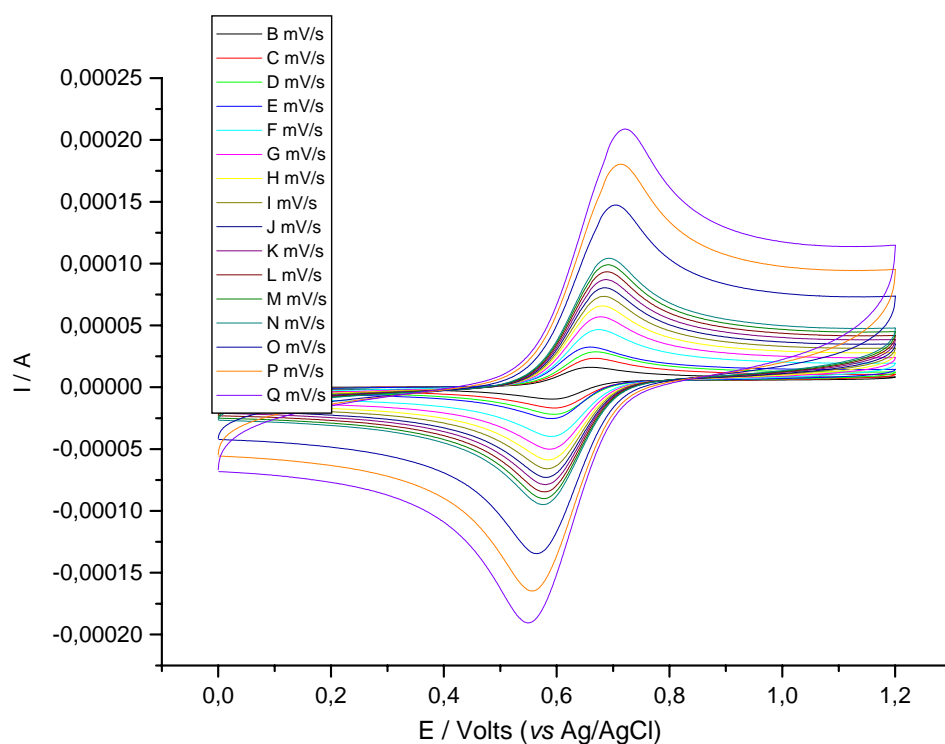
5.3.4 Caracterización electroquímica.

Se ajustó la ventana de potencial para el estudio del equilibrio electroquímico entre las especies $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ correspondientes al **compuesto 3**.

El potencial redox del complejo en acetonitrilo se encuentra en los 0.625 V (*vs* Ag/AgCl). A primera instancia se observa que la diferencia de potenciales de pico anódico y catódico tiene un valor diferente al de 0.059 V, siendo lo esperado para un sistema reversible de un electrón. Otro factor que debe tomarse en cuenta en la reversibilidad del proceso redox es el cociente entre las intensidades de corriente anódica y catódica del complejo, el valor determinado para la razón es de 1.03, lo cual indica la reversibilidad entre las formas redox que posee el **compuesto 3**, más no obstante, es necesario realizar un estudio electroquímico a diferentes velocidades de barrido para determinar la reversibilidad de las especies redox del metalociclo .



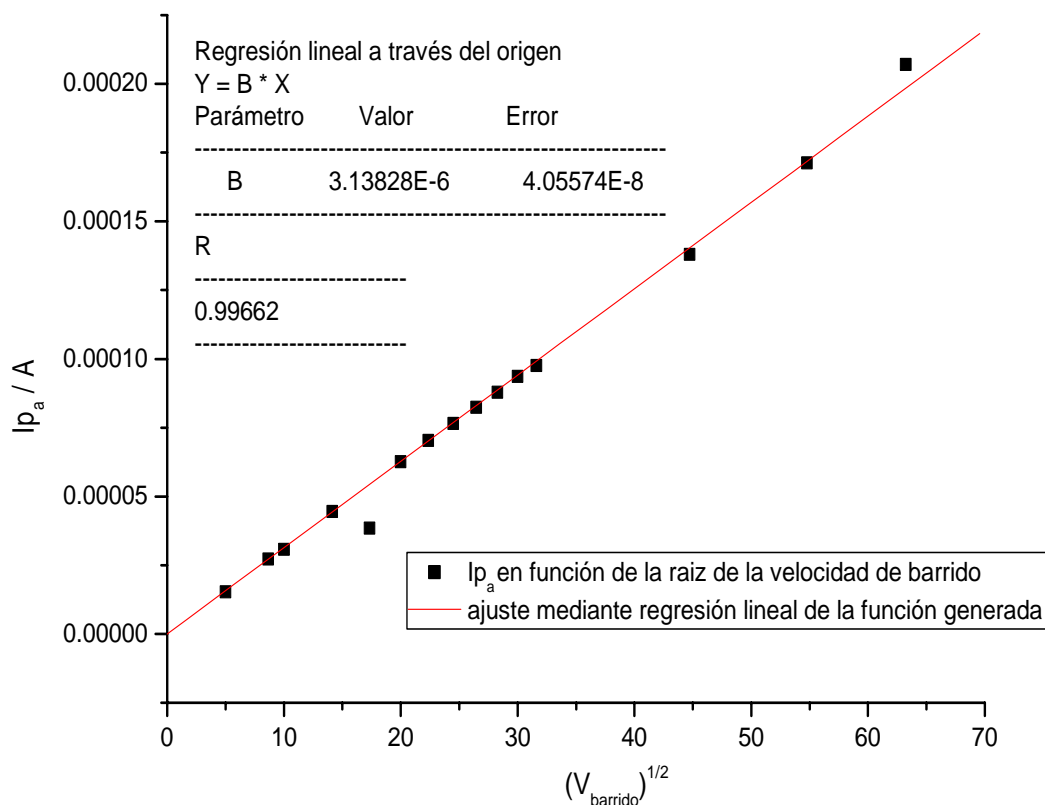
Gráfica 8. Voltamperometría cíclica del **compuesto 3** a una velocidad de barrido de 25 mV/s con $[(nBu)_4NPF_6] = 0.1 M$ en CH_3CN .



Gráfica 9. Voltamperometría cíclica del **compuesto 3** (1mM) a diferentes velocidades de barrido (25-4000 $mV \cdot s^{-1}$) con $[(nBu)_4NPF_6] = 0.1 M$ en CH_3CN .

En la Gráfica 9 se observa un comportamiento reversible entre las formas oxidada y reducida de la enzima, ya que no existe una notable variación de los potenciales

correspondientes a los picos anódico y catódico conforme aumenta la velocidad de barrido. En el estudio de la corriente de pico anódico en función de la raíz de la velocidad de barrido (Gráfica 10), se obtiene una función lineal, corroborando la reversibilidad entre las transiciones de Ru^{II} y Ru^{III} en el complejo [Ru(Bzq)(Phen)(CH₃CN)₂]PF₆.



Gráfica 10. Intensidad de corriente del pico anódico en función de la velocidad de barrido para el **compuesto 3** (1mM) y [(nBu)₄NPF₆] = 0.1 M como electrolito soporte en CH₃CN.

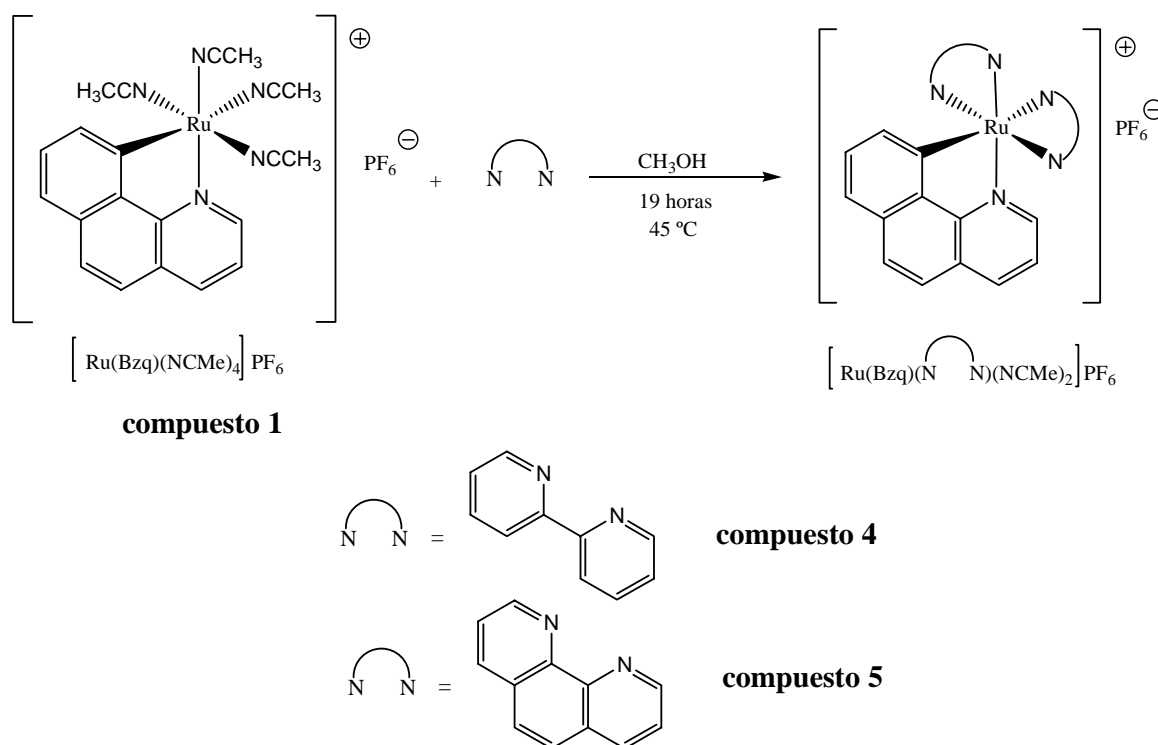
Con base en los resultados electroquímicos, se estima que este metalociclo de rutenio(II) es un buen candidato para realizar su estudio de actividad como mediador, en la reacción oxidante de glucosa catalizada por la glucosa oxidasa.

5.4. Rutenaciclos tipo [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆.

Experimentalmente se ha visto que adicionar ligantes bidentados nitrogenados aromáticos a la esfera de coordinación del rutenio favorece a la actividad que presenten estos complejos como mediadores de electrones en enzimas redox, es por ello que se sintetizaron metalociclos de rutenio(II) tipo [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆, donde N∩N puede ser 2,2-bipiridina o 1,10-fenantrolina, la reacción se lleva a cabo en metanol (Esquema 19),

para favorecer la salida de todos los ligandos acetronitrilo del **compuesto 1** y la adición de los ligandos bidentados a la esfera de coordinación del centro metálico. Esta misma reacción se probó en diclorometano y en acetronitrilo como disolvente de reacción, pero en los dos casos no se generaba el complejo tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$, es por ello que se recurrió a la utilización de medio metanólico para la síntesis de este tipo de rutenaciclos.

Estos complejos presentan una alta solubilidad en diclorometano, acetronitrilo, metanol y acetona. Exhiben un carácter inerte frente al oxígeno y son estables tanto en estado sólido como en disolución, un factor relevante que debe de tomarse en cuenta para la utilización de estos complejos como mediadores con glucosa oxidasa. Presentan una coloración negra, ya sea en su forma amorfa o cristalina.

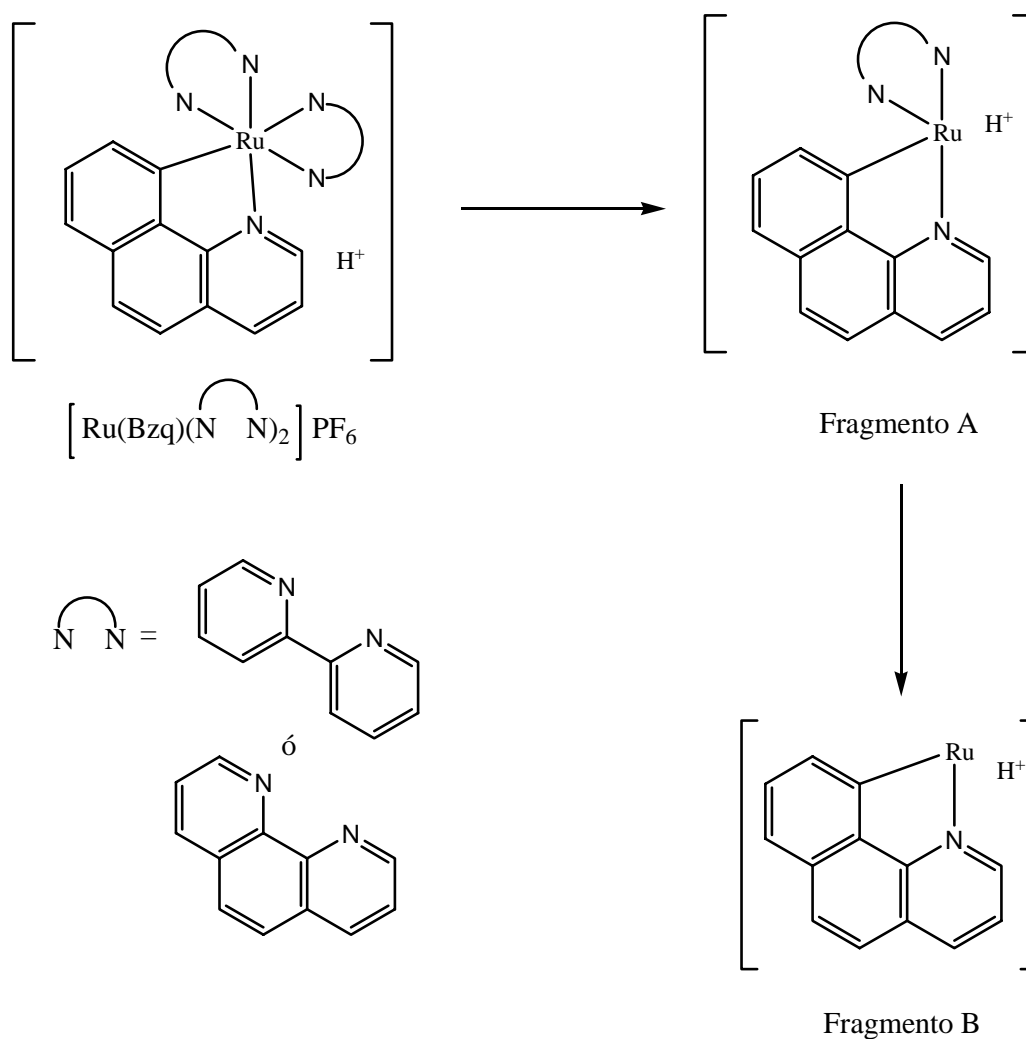


Esquema 19. Reacción de sustitución de la 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina para la obtención del metalociclo tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$

5.4.1. Espectrometría de masas FAB^+ .

En este tipo de espectrometría generalmente se observa el fragmento catiónico del complejo metálico. La relación m/z está de acuerdo con el peso molecular de la parte catiónica propuesta para los dos metalociclos sintetizados.

En espectrometría de masas se detectan diversos fragmentos que guardan una relación con el ion molecular en su forma catiónica, ya que se tienen pérdidas consecutivas de los ligantes bidentados nitrogenados aromáticos (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipirdina), los cuales en el patrón de fragmentación corresponden a los fragmentos A y B respectivamente. Con base en lo anteriormente mencionado es posible proponer un patrón de fragmentación generalizado para estos dos rutenacilos, considerando la peculiaridad de que para todos los metalociclos presentes en este trabajo, se encuentran ionizados con +1 unidad de m/z (Esquema 20).



Esquema 20. Propuesta para el patrón de fragmentación generalizado para los metalociclos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}-\text{N})_2]\text{PF}_6$

Tabla 13. Fragmentación en espectrometría de masas FAB⁺ de los complejos [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆.

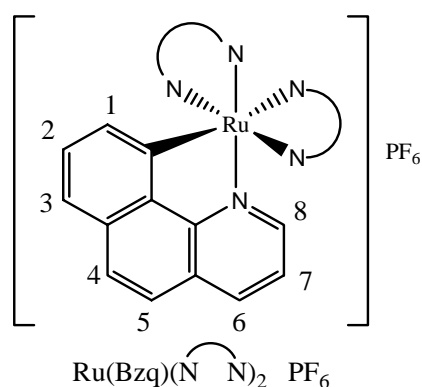
	Ión molecular		[Ru] ⁺		Fragmento A		Fragmento B	
	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.	m/z	%a.r.
Compuesto 4	737	3%	592	78%	436	28%	280	4%
Compuesto 5	-	-	640	2%	460	29%	280	4%

5.4.2. Espectroscopia en el infrarrojo.

En los dos complejos se presenta una banda intensa a los 840 cm⁻¹, correspondiente al estiramiento del enlace P-F existente en el anión hexafluorofosfato, el cual se encuentra presente en los dos metalociclos sintetizados, en este caso no se tiene una banda de mediana intensidad entre los 2200 y 2300 cm⁻¹ que indicaría la existencia de ligantes acetonitrilo en la esfera de coordinación de los complejos ciclometalados de rutenio(II), con ello se confirma que se llevo a cabo la sustitución de todos los ligantes acetonitrilo del **compuesto 1** por los ligantes bidentados nitrogenados aromáticos (2,2'-bipiridina y 1,10-fenantrolina).

5.4.3 Resonancia Magnética Nuclear.

Para estos complejos ciclometalados de rutenio(II) se muestra una estructura molecular generalizada, enumerando los átomos de carbono que soportan protones mas representativos para lograr la caracterización de los metalociclos. Con la finalidad de facilitar la asignación de los desplazamientos químicos, la multiplicidad perteneciente a algunas señal y la cantidad de protones aromáticos presentes en los complejos ciclometalados tipo [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆ (Esquema 21).



Esquema 21. Estructura molecular para los rutenociclos tipo [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆, enumerando las posiciones que soportan protones dentro de la molécula.

Tabla 14. Desplazamientos químicos (ppm) en RMN ^1H de los rutenacilo tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$, realizada en CD_3CN

	H-8	H-1
compuesto 4	8.48 (d)	8.19 (dd)
compuesto 5	8.42 (d)	8.20 (d)

En este caso es posible distinguir el protón H-8 en los dos rutenacilos sintetizados, ya que se registra un desplazamiento a campos bajos con respecto a los demás protones aromáticos dentro de la molécula, debido a la desprotección generada por el centro metálico sobre el protón *orto* al enlace N-Ru de la benzoquinolina. La señal correspondiente a H-8 se asigna debido a que debe de encontrarse a campos más altos con respecto a las otras señales de los protones *orto* del enlace Ru-N pertenecientes a los ligantes bidentados nitrogenados aromáticos. Los demás protones no se pueden asignar ya que están las señales sobrepuestas unas con otras (ver anexo)

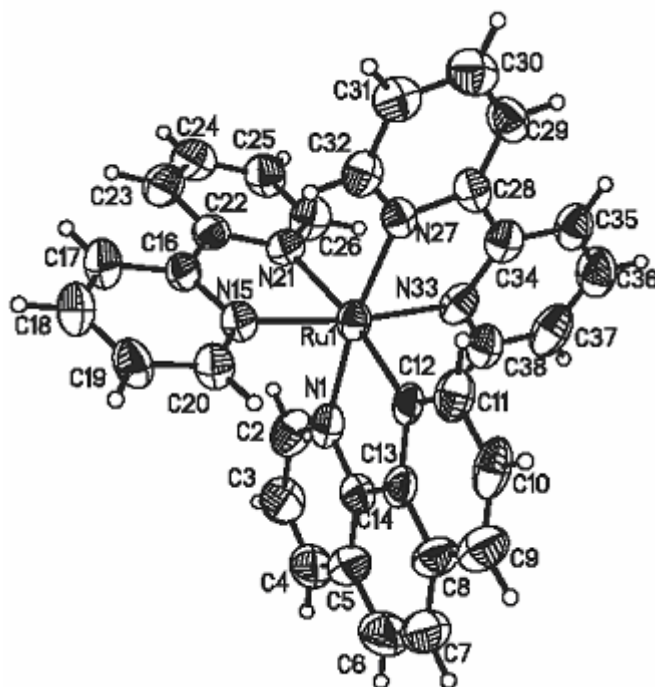
En RMN de ^{31}P es posible corroborar la presencia del anión hexafluorofosfato en los dos complejos ciclometalados sintetizados, ya que se observa una señal héptuple en -144 ppm, correspondiente al acoplamiento entre el fósforo y los seis átomos de flúor.

5.4.4. Difracción de rayos X.

La estructura del **compuesto 4** fue confirmada por la técnica de difracción de rayos X. Es posible observar el anión hexafluorofosfato dentro de la estructura molecular, además de que este rutenacilo, al igual que el **compuesto 2**, tiende a cristalizar con una molécula de diclorometano (Esquema 22).

La geometría que presenta este metalociclo de rutenio(II) es la de un octaedro distorsionado. En este metalociclo también se observa que el enlace Ru-N21 en posición *trans* al enlace Ru-C12 tiene el valor más grande en cuestión de longitud, esto se debe a la influencia *trans* que sufre el enlace Ru-N21. Las distancias entre Ru(1)-N(33), Ru(1)-N(12), Ru(1)-N(27), llegan a ser muy semejantes entre si, debido a que tiene ligantes nitrogenados semejantes (piridina). Por otro lado, la distancia Ru(1)-N(1) llega a ser mayor con respecto a las tres longitudes de enlace anteriormente señaladas, posiblemente esto se

deba a la influencia *trans* ejercido por el enlace Ru(1)-N(27). Si se comparan las longitudes de enlaces Ru(1)-N(33), Ru(1)-N(12), Ru(1)-N(27) del complejo [Ru(dmba)(Bpy)₂PF₆], reportado en la literatura,⁽⁴⁸⁾ con respecto al **compuesto 4**, no existe una gran diferencia entre estas longitudes de enlace así como en los ángulos de enlace presentes en este metalociclo y el otro.



Esquema 22. Estructura molecular del **compuesto 4**, se omitió el anión hexafluorofosfato y la molécula de CH₂Cl₂.

Tabla 15. Datos cristalográficos para el **compuesto 4**.

Parámetros	
Fórmula empírica	C ₆₆ H ₄₈ F ₁₂ N ₁₀ P ₂ Ru ₂ con CH ₂ Cl ₂
Peso fórmula	1558.15 g/mol
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P ₂ /c
Dimensiones de la celda unitaria	a = 24.0282(16) Å α = 90.00 °
	b = 14.0507(9) Å β = 104.5472(2)°
	c = 19.3602(13) Å γ = 90.00 °
Z	4
Densidad	1.636 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.700 mm ⁻¹
Intervalo Θ	1.69 to 25.00°
Reflexiones colectadas	50705
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados-matriz completa
R _{final}	R ₁ =0.0623 wR ₂ =0.1127

Tabla 16. Longitudes de enlace más representativas para el **compuesto 2**.

Enlace seleccionado	Longitudes de enlace (Å)
Ru(1)-N(33)	2.043(6)
Ru(1)-C(12)	2.047(7)
Ru(1)-N(27)	2.064(6)
Ru(1)-N(15)	2.072(6)
Ru(1)-N(1)	2.096(6)
Ru(1)-N(21)	2.140(6)

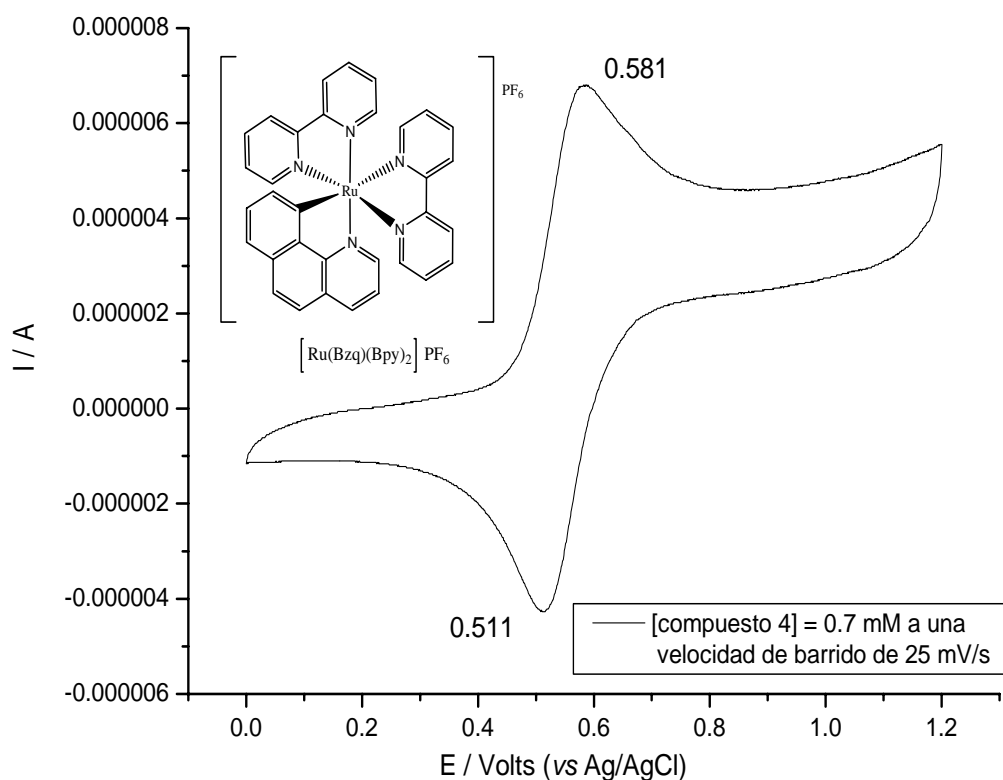
Tabla 17. Ángulos de enlace más representativos para el **compuesto 2**.

Ángulos seleccionados	grados	Ángulos seleccionados	grados
N(33)-Ru(1)-C(12)	90.3(2)	N(27)-Ru(1)-N(1)	171.5(2)
N(33)-Ru(1)-N(27)	78.2(3)	N(15)-Ru(1)-N(1)	90.6(2)
C(12)-Ru(1)-N(27)	94.8(3)	N(33)-Ru(1)-N(21)	96.7(2)
N(33)-Ru(1)-N(15)	172.2(3)	C(12)-Ru(1)-N(21)	172.1(3)
C(12)-Ru(1)-N(15)	95.9(2)	N(27)-Ru(1)-N(21)	90.3(2)
N(27)-Ru(1)-N(15)	96.6(2)	N(15)-Ru(1)-N(21)	77.5(2)
N(33)-Ru(1)-N(1)	95.0(3)	N(1)-Ru(1)-N(21)	95.7(2)
C(12)-Ru(1)-N(1)	79.9(3)		

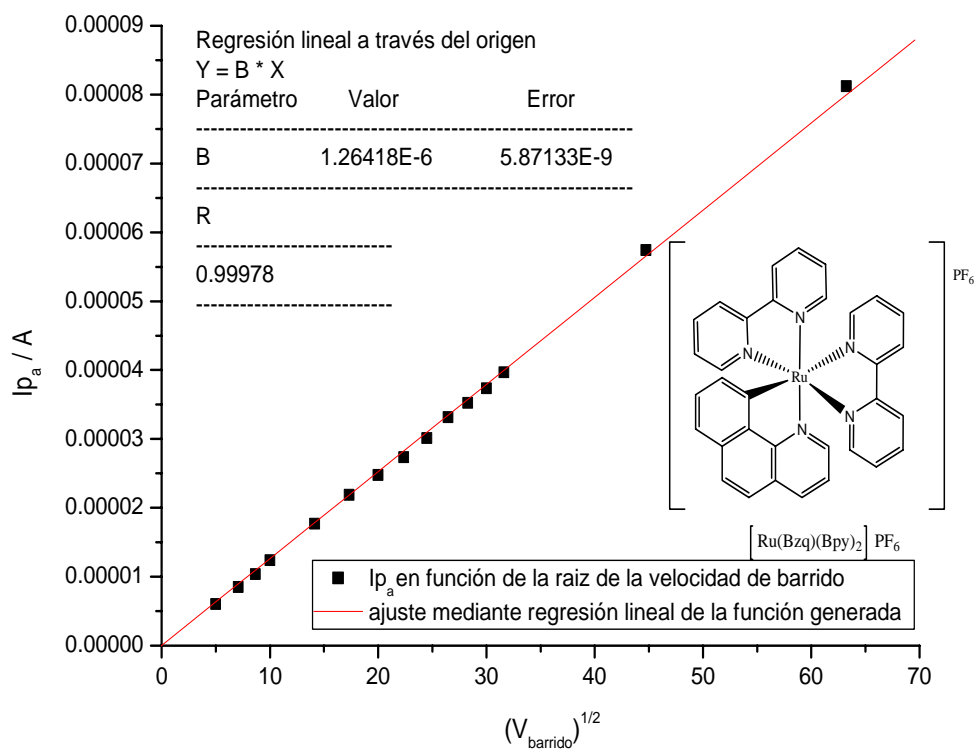
5.4.5. Caracterización electroquímica.

Se realizó la caracterización electroquímica del **compuesto 4** y **compuesto 5**, se estudió el proceso oxidativo de los compuestos debido a la importancia que presenta las especies $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ en el desarrollo de biosensores de segunda generación.

El rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})_2]\text{PF}_6$ tiene un potencial redox de 0.546 V (*vs* Ag/AgCl), cualitativamente se observa una reacción redox reversible entre la forma oxidada y reducida del complejo ciclometalado de rutenio(II) sintetizado (Gráfica 11). No obstante fue necesario realizar un estudio electroquímico a diferentes velocidades de barrido para determinar la reversibilidad en las transiciones redox $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ para el **compuesto 4** (Gráfica 12).



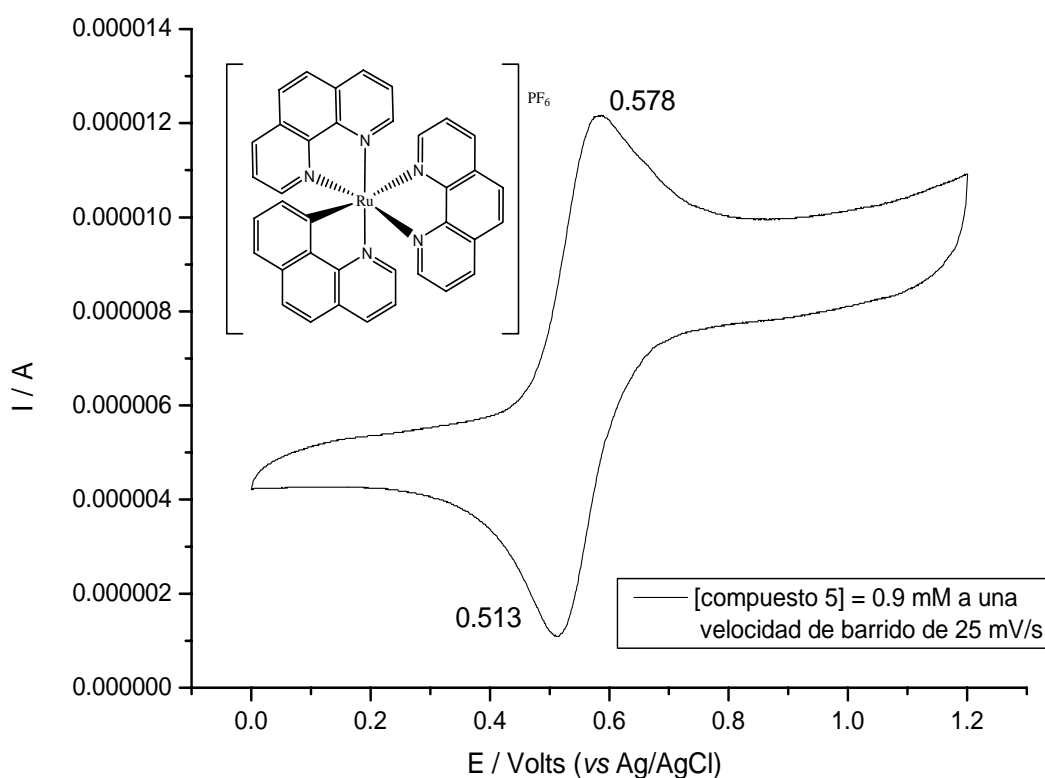
Gráfica 11. Voltamperometría cíclica del **compuesto 4** a una velocidad de barrido de 25 mV/s con [(nBu)₄NPF₆] = 0.1 M en CH₃CN.



Gráfica 12. Intensidad de corriente del pico anódico en función de la velocidad de barrido para el **compuesto 4** (0.7 mM) y [(nBu)₄NPF₆] = 0.1 M como electrolito soporte en CH₃CN.

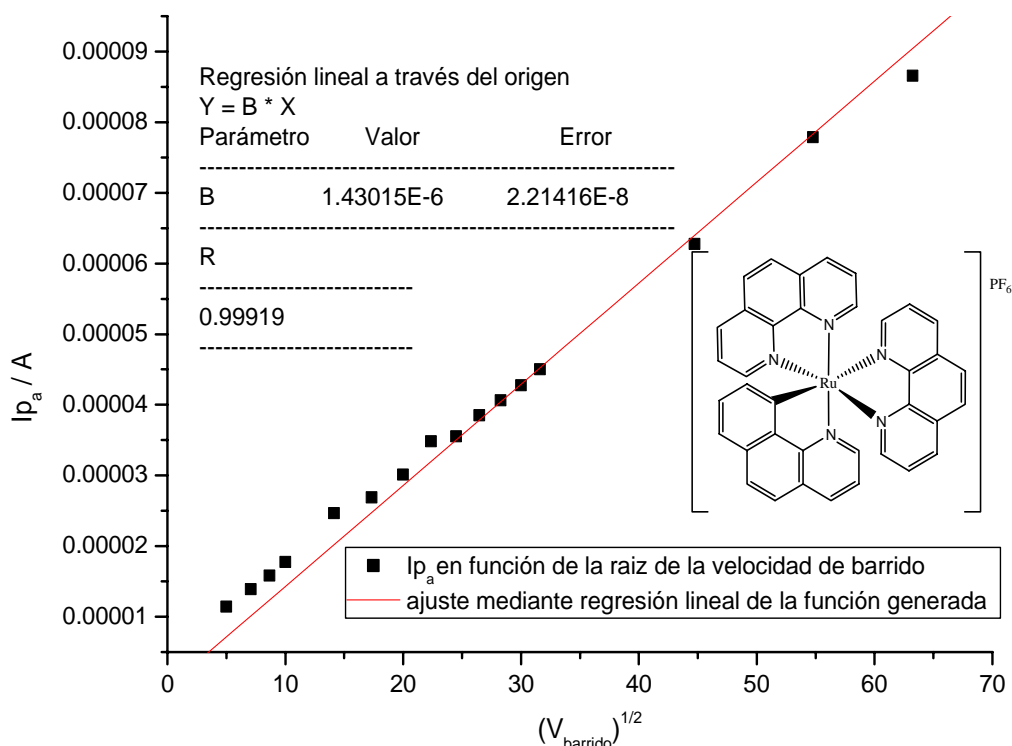
La reacción redox entre la forma oxidada y reducida del rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})_2]\text{PF}_6$ es reversible a altas y bajas velocidades de barrido, ya que la corriente de pico anódico es proporcional con respecto a la raíz de la velocidad de barrido (Gráfica 12). Este comportamiento lo hace un excelente candidato para su estudio de actividad como mediador en la transferencia asistida del electrón en glucosa oxidasa.

El potencial redox obtenido para el **compuesto 5** fue de 0.544 V (vs Ag/AgCl), muy similar al presentado por el rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})_2]\text{PF}_6$ (Gráfica 11).



Gráfica 13. Voltamperometría cíclica del **compuesto 5** a una velocidad de barrido de 25 mV/s con $[(\text{nBu})_4\text{NPF}_6]$ 0.1 M en CH_3CN .

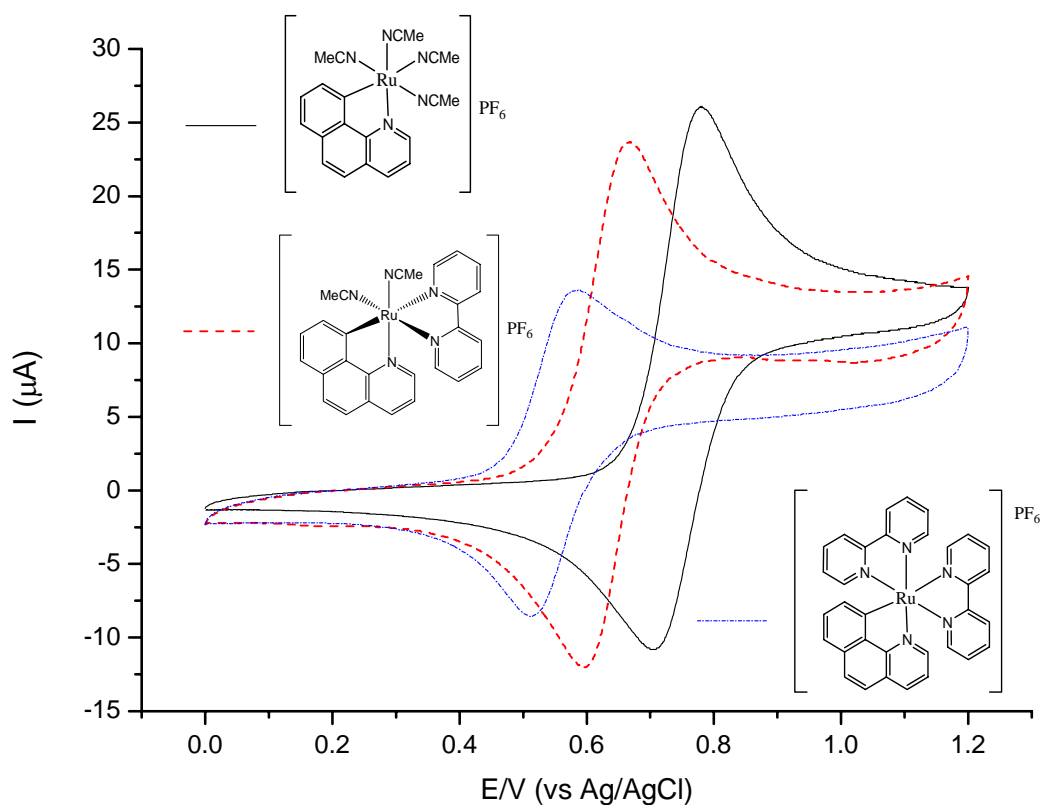
El rutenacilo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})_2]\text{PF}_6$ muestra un comportamiento igual de reversible como el mostrado por el **compuesto 4** (Gráfica 12), ya que presenta una constante de proporcionalidad para la corriente de pico anódico en función de la raíz de la velocidad de barrido, es por ello que se concluye que el **compuesto 5** presenta un equilibrio redox reversible entre sus formas oxidada y reducida, lo cual, es favorable para una aplicación en bioelectrocatalisis en el proceso oxidante de glucosa en presencia de glucosa oxidasa.



Gráfica 14. Intensidad de corriente del pico anódico en función de la velocidad de barrido para el **compuesto 5** (0.9mM) y [(nBu)₄NPF₆] = 0.1 M como electrolito soporte en CH₃CN.

5.5. Estudio electroquímico comparativo de los complejos de rutenio(II).

Con base a la aplicación que llegan a presentar los complejos ciclometalados de rutenio(II) como mediadores en la transferencia asistida del electrón en glucosa oxidasa, se realizó el siguiente estudio cualitativo y comparativo de sus potenciales redox, ya que se observó que al adicionar ligantes bidentados nitrogenados aromáticos a la esfera de coordinación del centro metálico se disminuye el potencial redox del complejo metálico. Esto último se llega a observar entre los compuestos tipo [Ru(Bzq)(N∩N)(NCMe)₂]PF₆ y los tipo [Ru(Bzq)(N∩N)₂]PF₆, donde al aumentar el número de ligantes bidentados nitrogenados aromáticos sobre la esfera de coordinación del centro metálico, disminuye como consecuencia el potencial redox del rutenio. Con el desarrollo de estas rutas de síntesis y obtención de metalociclos de rutenio(II) presentados en este trabajo, se modificó finamente el potencial redox del rutenio en los diversos metalociclos preparados en el presente trabajo.

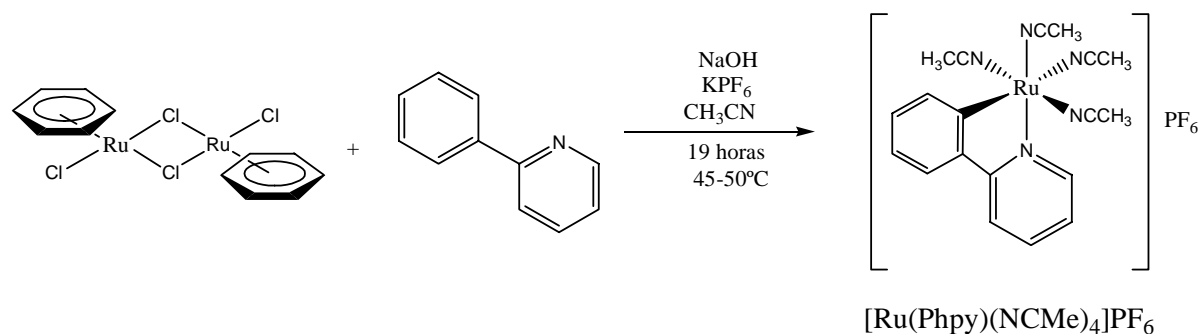


Gráfica 15. Voltamperometría cíclica de algunos complejos ciclometalados de rutenio (II), a una velocidad de barrido de 100 mV/s en acetonitrilo, 0.1 M (nBu)₄NPF₆.

5.6. Rutenacilos solubles en agua.

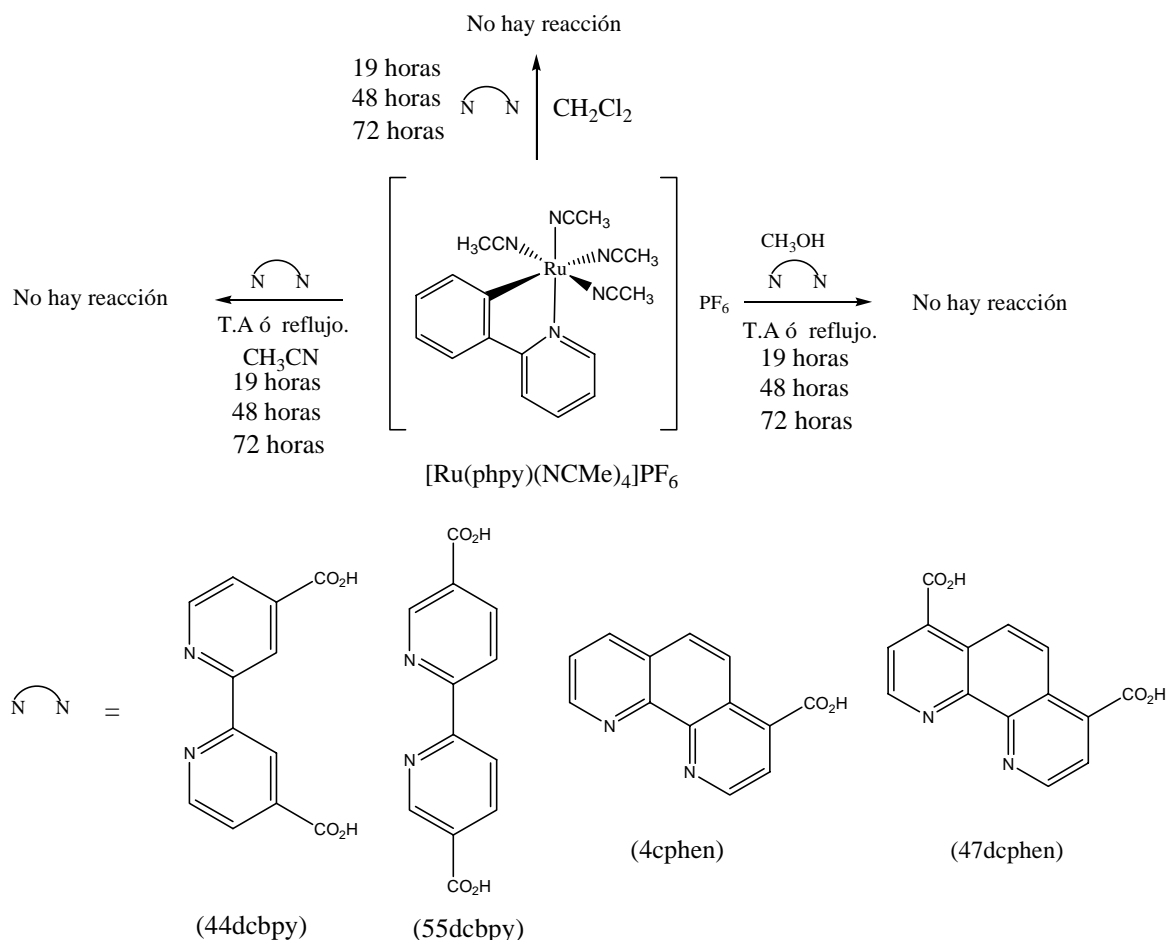
Con base a los resultados obtenidos por los metalociclos de rutenio(II) preparados en este trabajo en el área de bioelectrocatalisis, como mediadores en la transferencia asistida de electrón en glucosa oxidasa (7. Mediadores), se trató de desarrollar nuevas rutas para la síntesis de metalociclos de rutenio(II) que presenten una alta solubilidad en agua. Es por ello que se preparó el complejo [Ru(Phpy)(NCMe)₄]PF₆ como precursor para la síntesis de otros rutenacilos. Se intentó adicionar a la esfera de coordinación de este precursor el ácido 11,10-fenantrolina-4-carboxílico, el ácido 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxílico, ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico y el ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico. Esperando que al coordinarse al complejo [Ru(Phpy)(NCMe)₄]PF₆ no se modificara en gran medida, la actividad como mediadores en la transferencia asistida del electrón con glucosa oxidasa

que presentan los complejos ciclometalados de rutenio(II) análogos a los que han preparado nuestro grupo de trabajo.^(8, 62, 63)



Ecuación 18. Síntesis del complejo ciclometalado $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$

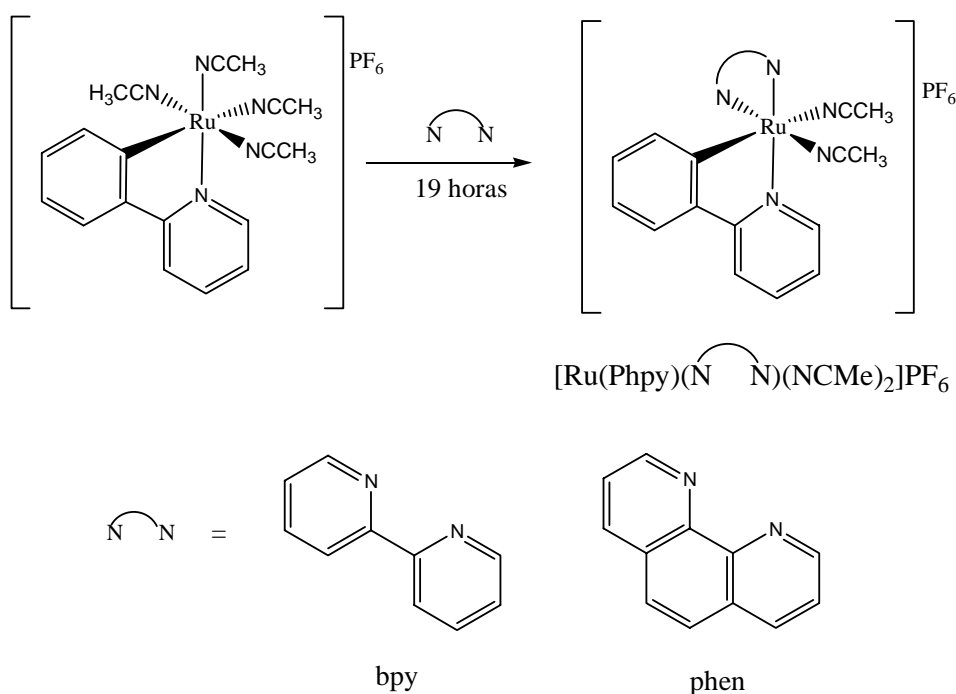
No fue posible adicionar estos ligandos bidentados nitrogenados a la esfera de coordinación del centro metálico mediante las rutas de síntesis mostradas en el esquema 23, en estas reacciones muchas de las ocasiones se recuperaba la materia prima, el complejo $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$ o se obtenía un producto de descomposición correspondiente a este precursor utilizado (óxidos de rutenio).



Esquema 23. Rutas de síntesis desarrolladas para la obtención de metalociclos de rutenio(II) solubles en agua

Pese a que se trabajó a diferentes condiciones de reacción y con diferentes ligantes bidentados nitrogenados aromáticos, no fue posible la adición de estos ligantes a la esfera de coordinación del centro metálico, por lo que fue necesario utilizar otro complejo ciclometalado de rutenio(II) como precursor para la adición de este tipo de ligantes (44dcbpy, 55dcbpy, 4cphen, 47dcphen).

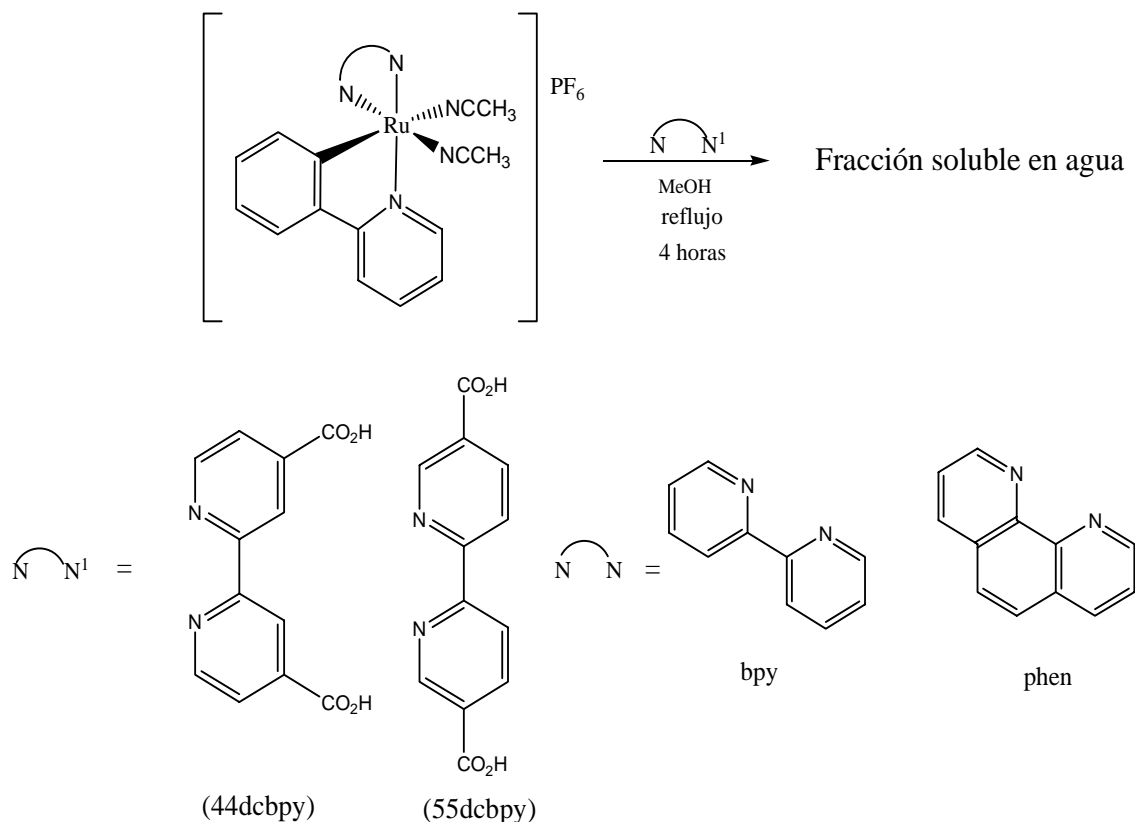
Los precursores propuestos y empleados para lograr la adición de los derivados carboxílicos de la 2,2-bipiridina y 1,10-fenantrolina fueron los complejos ciclometalados tipo $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{N}\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ (Ecuación 19). Estos rutenaciclos se prepararon en seguimiento a lo descrito en la literatura.^(62, 63)



Ecuación 19. Síntesis del complejo ciclometalado $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{N}\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$

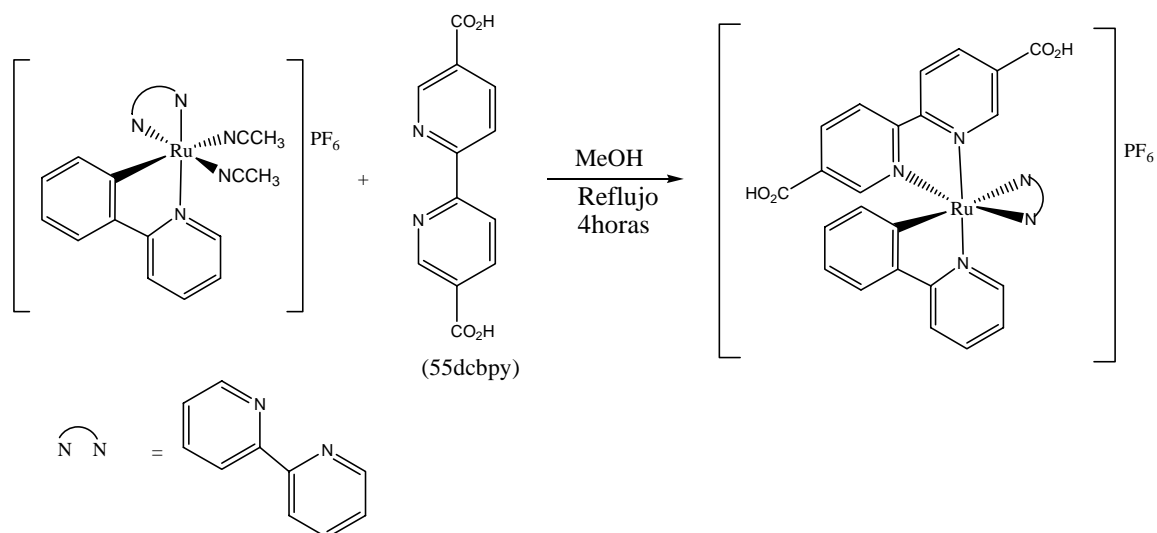
Para recurrir a la reacción de adición de uno de los ácidos carboxílicos fue necesario recurrir a un reflujo de metanol anhidro (30 ml) por 4 horas, del ligante carboxílico (0.345 mmol) y del complejo ciclometalado tipo $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{N}\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ (0.157 mmol) (Esquema 24), finalizada la reacción, se evapora a sequedad por presión reducida y se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna de alúmina, para eliminar lo que no ha reaccionado de precursor y los subproductos generados durante la reacción, el eluyente con el que se inicia a correr la columna es acetonitrilo, posteriormente se eluye con metanol y finalmente se extrae de la columna la última

fracción morada con agua, se colecta y se evapora a sequedad para recuperar el precipitado y el sólido se lava con éter dietílico y se seca al vacío.



Esquema 24. Reacción de adición de un ligante bidentado nitrogenado sobre un complejo ciclometalado tipo $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{N}\cap\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$

Fue posible caracterizar la última fracción colectada de la cromatografía en alúmina mediante espectrometría FAB^+ y por espectroscopia en el IR, ya que en ^1H RMN se tuvo problemas de analizar la muestra, por la baja solubilidad que presentaba el complejo resultante en disolventes deuterados (DMSO-D_6 , D_2O , CD_3CN , CD_3OD , CDCl_3). Cabe destacar que se tienen varios subproductos en la reacción, esto puede deberse, en gran medida a la labilización y activación de los ligandos acetonitrilo del complejo metálico $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{N}\cap\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$ por el disolvente (MeOH). El producto de la reacción que se caracterizó mediante espectrometría de masas y espectroscopia en el IR fue el correspondiente a la reacción señalada en la ecuación 20.



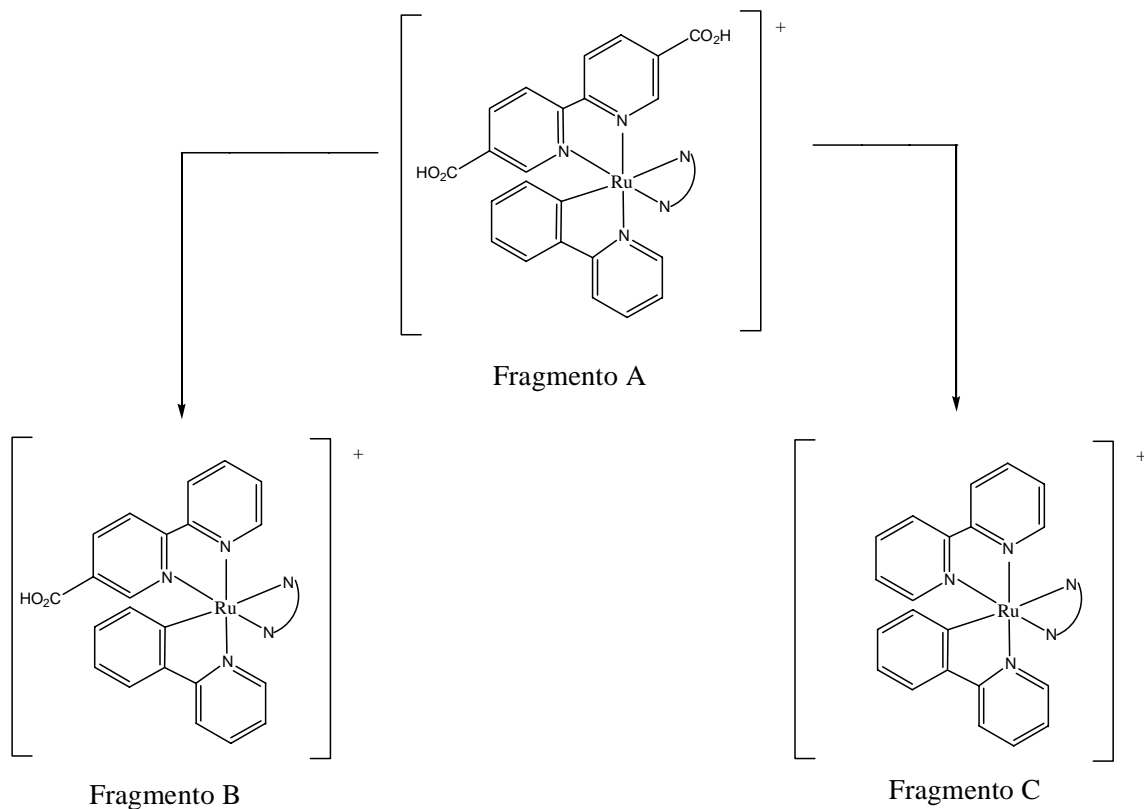
Ecuación 20. Reacción de adición de un ligante bidentado nitrogenado sobre un complejo ciclometalado tipo $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{N}(\text{N})\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$

Por espectrometría de masas se observa al fragmento catiónico del complejo de rutenio(II), de igual manera se registra la pérdida de un grupo carboxilo (Fragmento B), también se registra la fragmentación de dos grupos carboxilo (Fragmento C). En el Esquema 25 se propone un patrón de fragmentación para el complejo resultante de la reacción así como una tabla de m/z y la abundancia relativa para cada señal.

Fragmento catiónico	Fragmento A		Fragmento B		Fragmento B	
	m/z	(%a.r.)	m/z	(%a.r.)	m/z	(%a.r.)
$[\text{Ru}]^+$						
Compuesto 4	679	2%	634	28%	613	4%

Tabla 18. Fragmentos observados para el complejo obtenido de la adición del ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico sobre el complejo $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{Bpy})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$.

En espectroscopia en el IR se revela una señal de gran intensidad a 843 cm^{-1} , la cual corresponde al anión hexafluorofosfato, también se observa a 1663 cm^{-1} una señal correspondiente a los carbonilos del grupo funcional carboxilo, se registra una señal de baja intensidad a 3352 cm^{-1} , la cual correspondería al grupo O-H del ácido carboxílico.



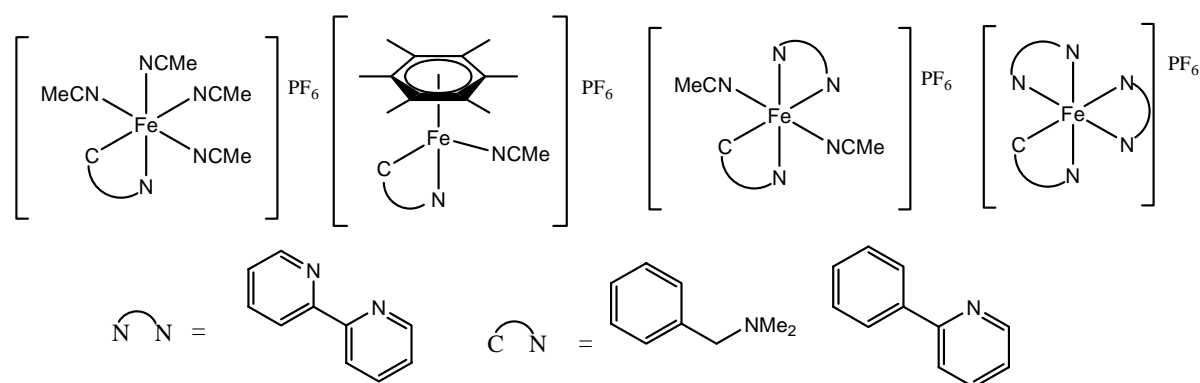
Esquema 25. Patrón de fragmentación para el complejo resultante de la adición del ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico sobre el complejo $[\text{Ru}(\text{Phpy})(\text{Bpy})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$

Se espera seguir bajo esta línea de investigación para el desarrollo de nuevas rutas de síntesis de metalociclos de rutenio(II) que presenten una alta solubilidad en agua.

6. Complejos ciclometalados de hierro(II).

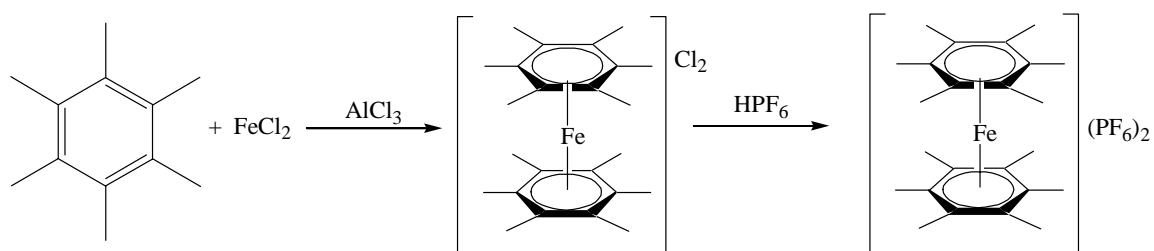
6. Complejos ciclometalados de hierro(II).

En este trabajo se desarrollaron rutas para la síntesis de metalociclos de hierro(II), los cuales, deben de ser análogos estructuralmente a los complejos ciclometalados de rutenio(II) preparados por nuestro grupo de trabajo (Esquema 26).^(8,62,63) Como se ha mencionado anteriormente, los complejos ciclometalados de rutenio(II), preparados por nuestro grupo de trabajo, han mostrado una alta actividad como mediadores en la transferencia electrónica con oxido-reductasas y se plantea que al preparar los análogos de hierro no se pierda la actividad como mediador y por lo tanto puedan ser aplicados en sistemas *in-vivo*.



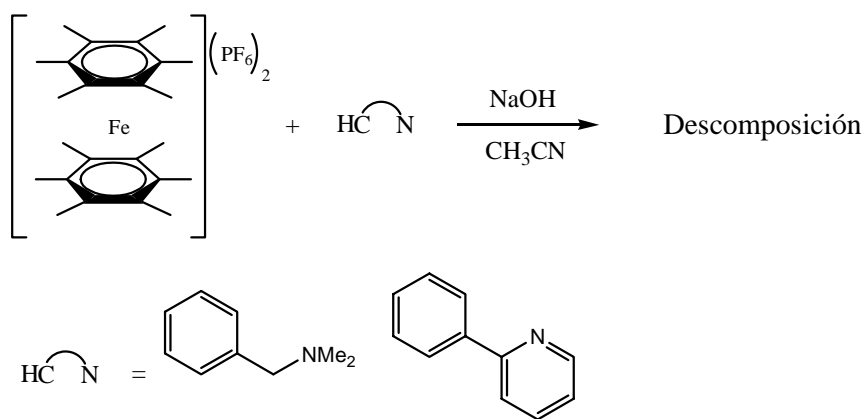
Esquema 26. Complejos ciclometalados de hierro(II) propuestos a sintetizar

Debido a que no es posible preparar el homólogo al $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$, es necesario proponer otro compuesto precursor para la síntesis de compuestos de hierro(II), el complejo $[\text{Fe}(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)_2](\text{PF}_6)_2$ (Ecuación 21).



Ecuación 21. Síntesis del precursor $[\text{Fe}(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)_2](\text{PF}_6)_2$

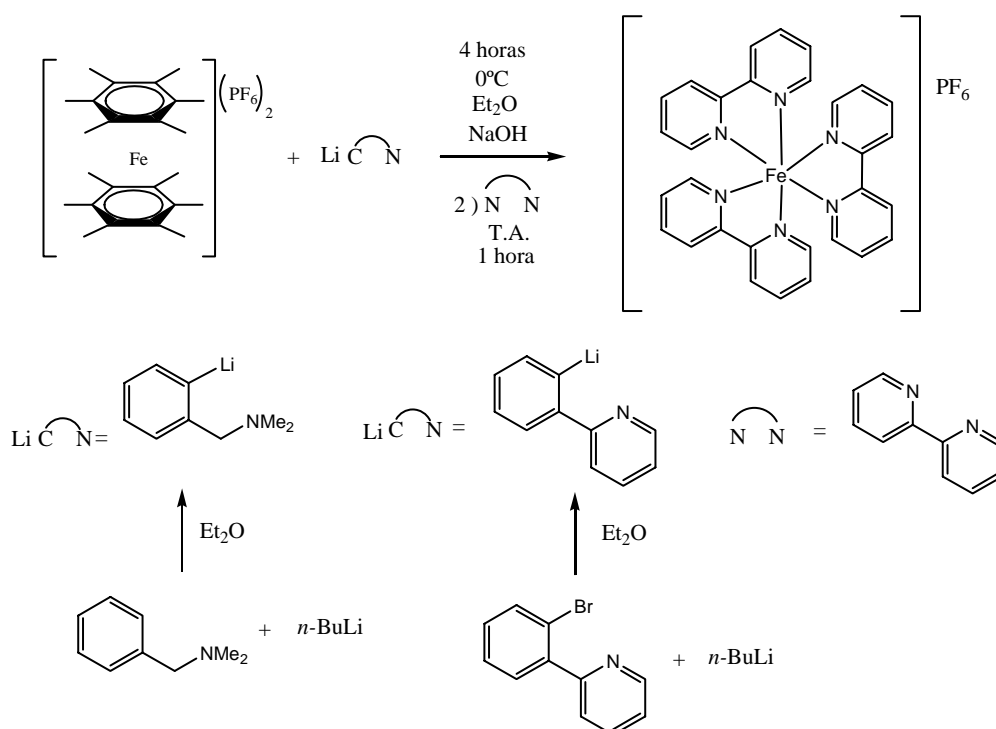
El precursor de hierro se intentó ciclometalar de acuerdo a lo realizado con los compuestos análogos de rutenio, mediante la activación en medio básico del enlace C-H *orto* (Esquema 27).



Esquema 27. Reacción de ciclometalación del compuesto $[\text{Fe}(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)_2](\text{PF}_6)_2$

Debido a que el complejo $[\text{Fe}(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)_2](\text{PF}_6)_2$ es inestable en acetonitrilo, no fue posible efectuar la ciclometalación mediante a estas condiciones, ya que el precursor se descomponía antes de efectuar el proceso de ciclometalación.

Se intentó realizar una transmetalación del precursor $[\text{Fe}(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)_2](\text{PF}_6)_2$ mediante la adición de 4 equivalentes del compuesto organolitiado (Esquema 28), los complejos organolitiados se prepararon *in-situ* de acuerdo a lo informado en la literatura.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ Cabe destacar que la 2-(2-bromofenil)piridina fue preparada con anticipación, ya que no fue posible conseguirla comercialmente, su preparación se realizó con ligeras modificaciones en el procedimiento experimental propuesto en la literatura.⁽⁶¹⁾



Esquema 28. Reacción de transmetalación vía un compuesto organolitiado, así como una posterior adición de un ligante bidentado nitrogenado aromático (2,2'-bipiridina).

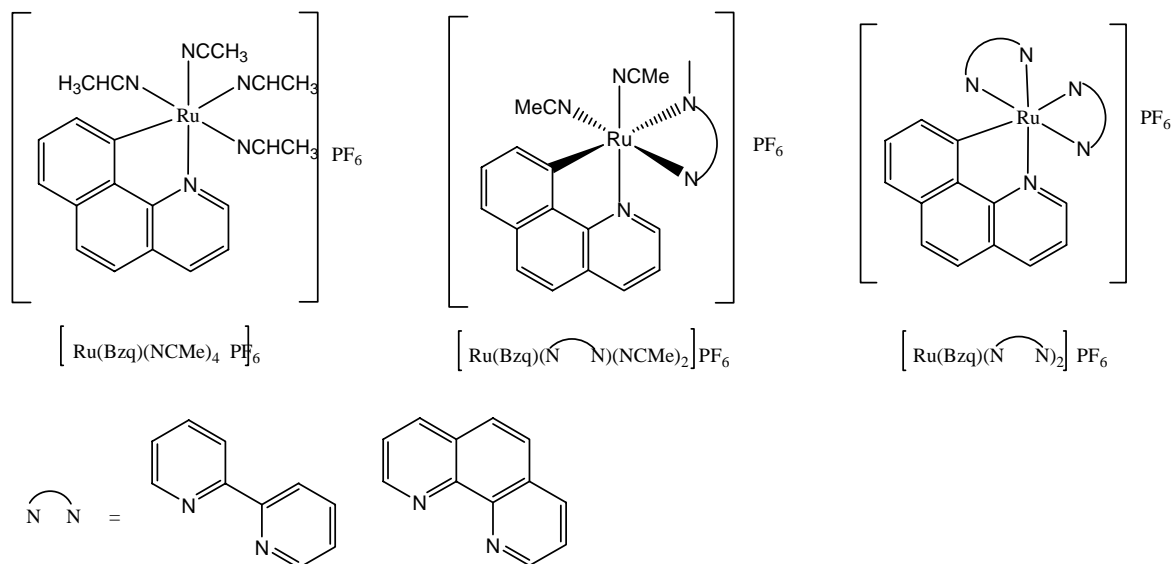
La reacción de transmetalación se efectuó a bajas temperaturas y posteriormente se intentó estabilizar la especie formada mediante la adición de un equivalente del ligante bidentado nitrogenado aromático (Esquema 28), ya que sin la adición de la 2,2'-bipiridina, el producto tendía a la formación de óxidos de hierro. El producto obtenido de las condiciones de reacción señalada fue el hexafluorofosfato de *tris*(2,2'-bipiridina) hierro(II). RMN-¹H [CD₃CN, 300.5311 MHz, δ(ppm)]: 8.51 (d, 6H, ³J = 8.0 Hz), 8.11 (s, 6H), 7.40 (s, 12H). RMN-³¹P [CD₃CN, 121.6565 MHz, δ(ppm)]: -144 (hep, PF₆).

Se espera continuar en esta línea de investigación para evaluar el comportamiento de mediador que pudieran tener este tipo de metalociclos en oxido-reductasas, en caso de tener una actividad semejante a la informada para los rutenaciclos análogos a los complejos de hierro(II), se diseñarían biosensores amperométricos enzimáticos con aplicaciones *in-vivo*.

7. Mediadores.

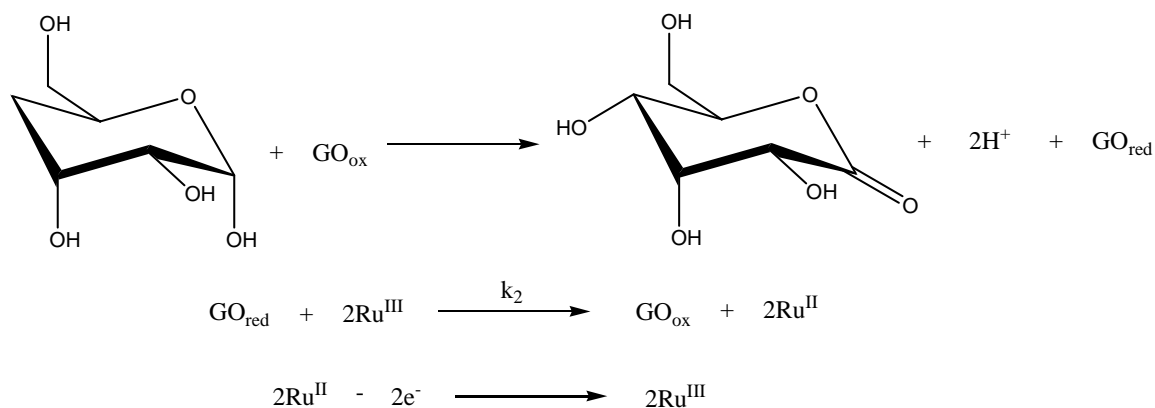
7. Mediadores.

En esta parte del trabajo se evaluó el comportamiento de mediador de los complejos ciclometalados de rutenio(II) sintetizados en el presente trabajo (Esquema 29).



Esquema 29. Complejos ciclometalados de rutenio(II) evaluados como mediadores en la transferencia asistida del electrón con glucosa oxidasa.

Se determinó la velocidad en la transferencia electrónica del compuesto ciclometalado de rutenio(II) con la glucosa oxidasa (k_2), de acuerdo a lo informado en la literatura.^(65, 69)



Esquema 30. Proceso oxidante de la glucosa con glucosa oxidasa en presencia de una especie de rutenio(II) como un mediador de un electrón.

La baja solubilidad que presentaban los complejos ciclometalados de rutenio(II) en agua fue un problema para la determinación del parámetro cinético (k_2), es por ello que las

disoluciones stock de metalociclos de rutenio contenían 5% de acetonitrilo, la adición de este disolvente favorecía la solubilidad de los complejos en agua y por otro lado, esta cantidad de acetonitrilo no afectaba el pH en la celda electroquímica.

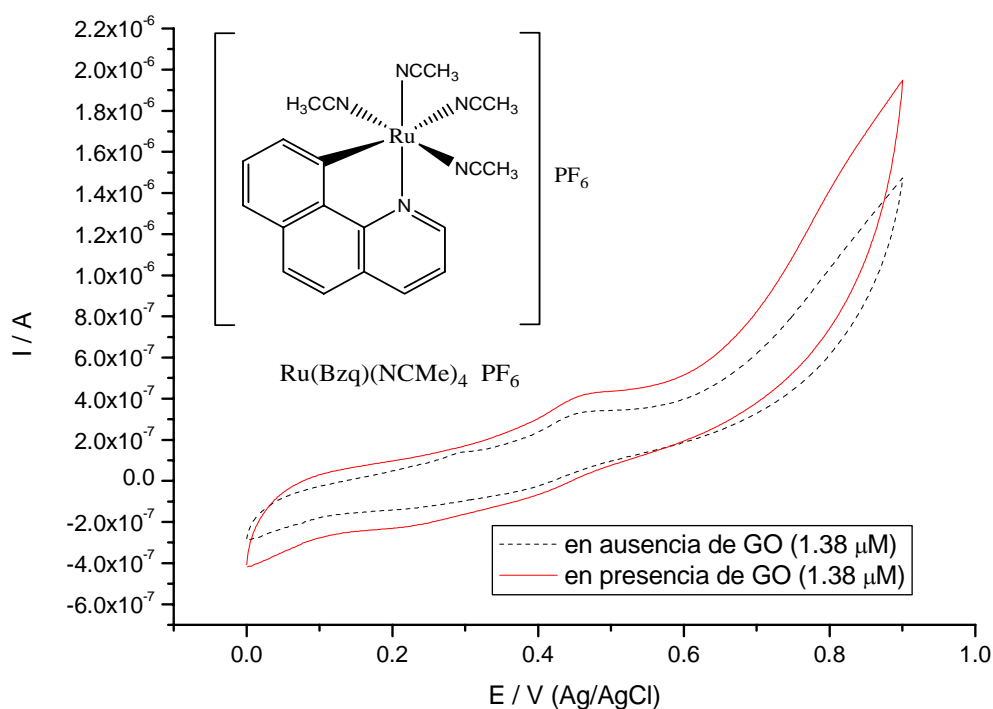
Para determinar la constante de segundo orden en la transferencia electrónica entre la forma oxidada del rutenaciclo (generado electroquímicamente) y la enzima redox (glucosa oxidasa), fue necesario determinar la corriente de pico catalítica ($I_{p_{cat}}$) y la corriente de pico de la oxidación del complejo metálico ($I_{p_{ox}}$). El procedimiento para determinar estas dos corrientes de pico se realiza mediante lo mostrado en el Esquema 10 (página 46). Por otro lado, el cociente entre estas dos corrientes de pico, llega a ser proporcional a la raíz de la razón entre la concentración de glucosa oxidasa y la velocidad de barrido. El comportamiento lineal de la función se presenta solamente a bajas velocidades de barrido (entre 3 y 40 mV/s) y en un exceso de sustrato (glucosa).⁽⁶⁵⁾ El ajuste lineal de la función relaciona la pendiente (m) con el parámetro cinético k_2 mediante la expresión siguiente.⁽⁶⁹⁾

$$m = 3.17 \left(\frac{RT}{F} \right)^{1/2} k_2^{1/2} \quad \frac{RT}{F} = 0.059$$

Donde k_2 tiene unidades de $M^{-1}s^{-1}$. A continuación se discutirán los datos cinéticos obtenidos para los 5 rutenaciclos propuestos como mediadores en la transferencia asistida del electrón con glucosa oxidasa.

7.1. Rutenaciclo $[Ru(Bzq)(NCMe)_4]PF_6$.

Este metalociclo no presentó una actividad como mediador en la transferencia asistida de electrón con glucosa oxidasa. Esto se determinó con base en la ausencia de corriente catalítica en la voltamperometría realizada con el complejo metálico (70 μM), la enzima (1.38 μM) y glucosa (0.05 M) a un pH de 7.1, regulado con una disolución amortiguada de fosfatos (0.01M) (Gráfica 16). La corriente catalítica es la que indica que se está efectuando el proceso de regeneración de la forma reducida de la enzima y asimismo el proceso catalítico oxidante de la glucosa.



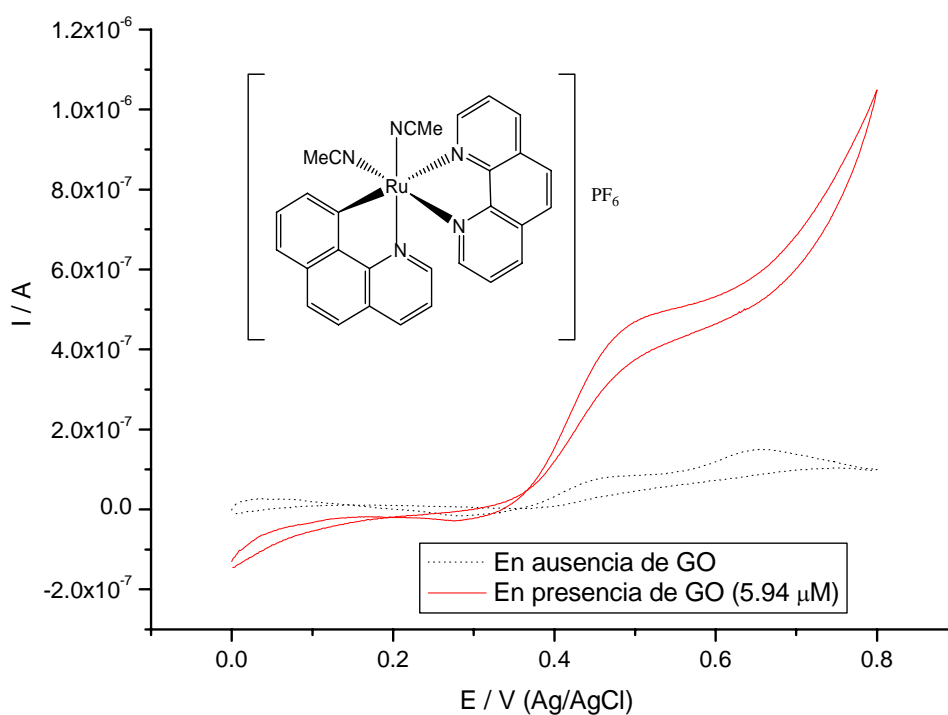
Gráfica 16. Voltamperometría cíclica de complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$ ($70 \mu\text{M}$) y glucosa (0.05 M) en ausencia y en presencia de glucosa oxidasa ($1.38 \mu\text{M}$) a pH de 7.1.

La ausencia de actividad entre el rutenacilo y la enzima puede explicarse con base en el “efecto antena”, ya que este metalociclo de rutenio(II) no posee ligantes dentro de su esfera de coordinación, que permitan el transporte de electrones entre el grupo prostético de la enzima y el centro metálico. Un factor relevante que debe ser tomado en cuenta consiste en la baja estabilidad del complejo metálico en disolución, ya que este complejo ciclometalado de rutenio(II) puede presentar una solvólisis,⁽⁶²⁾ desestabilizando el equilibrio entre la forma reducida y oxidada del complejo metálico, teniendo como consecuencia una disminución en la concentración de la especie Ru^{III} , siendo esta especie la activa en el proceso de intercambio electrónico entre la enzima redox (GO) y el complejo.

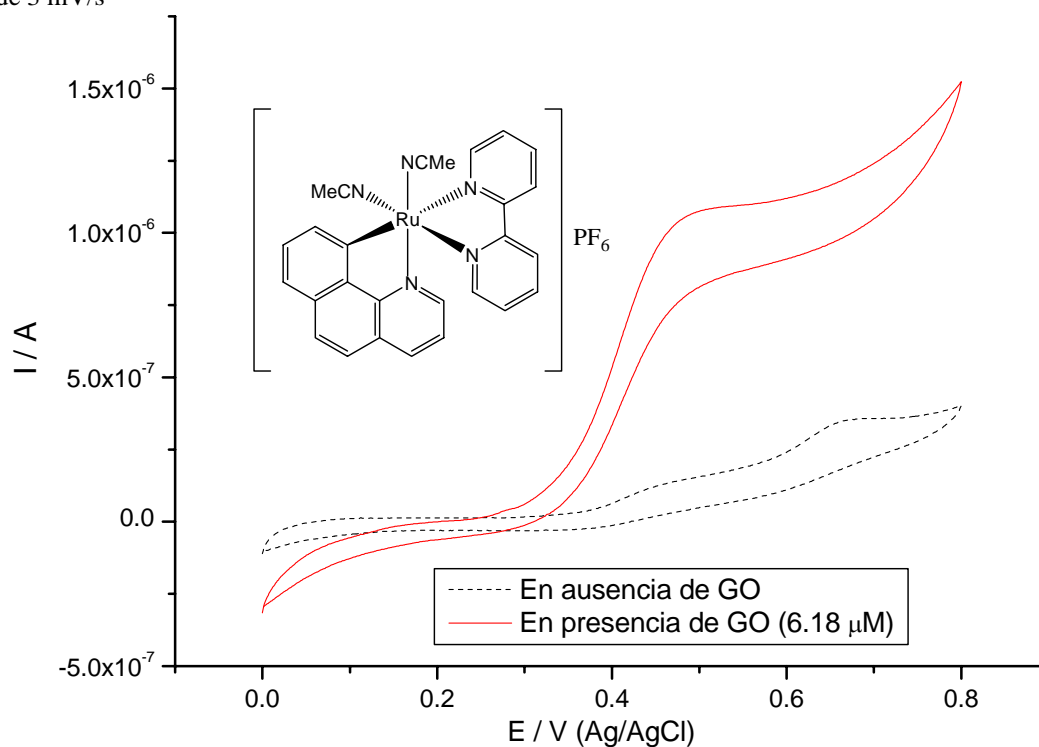
7.2. Rutenacilos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$.

Estos complejos presentaron una actividad como mediadores en presencia de la glucosa oxidasa, ya que se registró una corriente catalítica ($I_{\text{p cat}}$) por voltamperometría cíclica (Gráfica 17 y 18). Esto está de acuerdo a lo planteado, ya que el tener ligantes bidentados nitrogenados aromáticos en la esfera de coordinación del centro metálico,

favorece el proceso de intercambio electrónico entre la forma oxidada del metalociclo y la enzima.

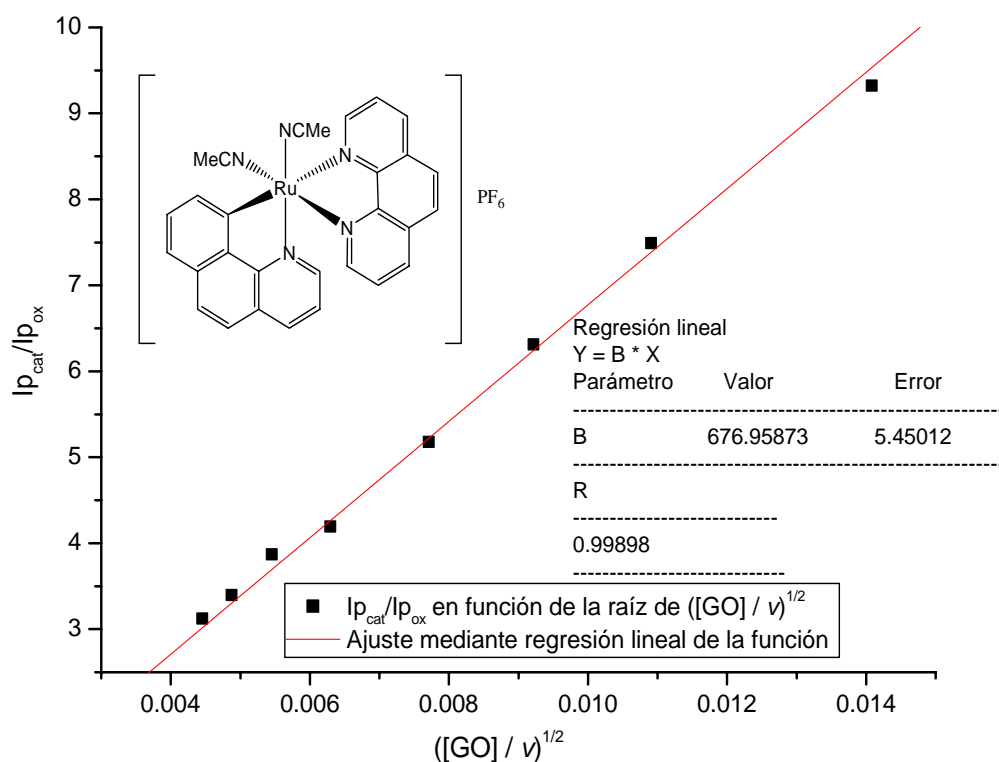


Gráfica 17. Voltamperometría cíclica de complejo $[Ru(Bzq)(Phen)(NCMe)_2]PF_6$ ($29.98 \mu M$) y glucosa ($0.05 M$) en presencia y en ausencia de glucosa oxidasa ($5.94 \mu M$) a pH de 7.1 a una velocidad de barrido de $3 mV/s$



Gráfica 18. Voltamperometría cíclica de complejo $[Ru(Bzq)(Bpy)(NCMe)_2]PF_6$ ($59.04 \mu M$) y glucosa ($0.05 M$) en presencia y en ausencia de glucosa oxidasa ($6.18 \mu M$) a pH de 7.1 a una velocidad de barrido de $3 mV/s$.

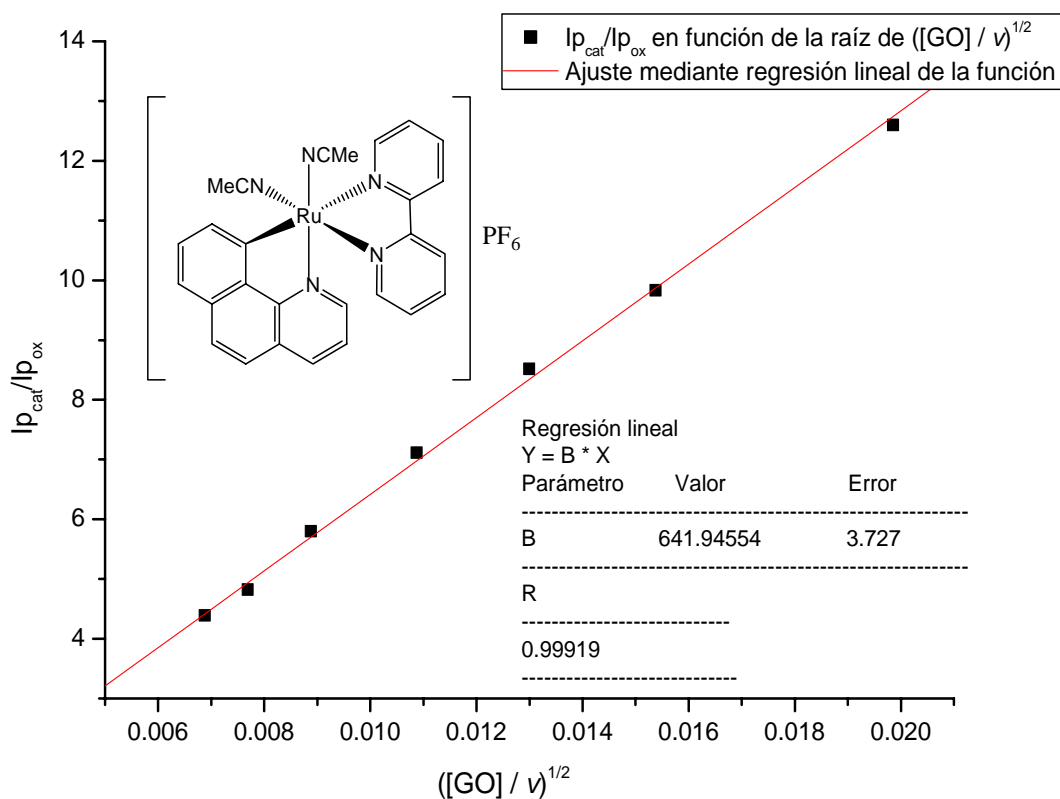
Ahora es necesario determinar la constante de velocidad para el intercambio de electrón entre el mediador (complejos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$) y la enzima, para ello es necesario obtener el cociente entre las corriente de pico catalítico y la corriente de pico anódico del complejo metálico en ausencia de glucosa oxidasa ($I_{p_{\text{cat}}}/I_{p_{\text{ox}}}$) en función de la raíz de la concentración entre la velocidad de barrido (Gráfica 19 y 20), con ello se obtiene una función de carácter lineal, de la cual es posible extraer el parámetro cinético de interés (k_2), mediante un ajuste por regresión lineal de la función generada, que fije como ordenada al origen a 0.



Gráfica 19. $I_{p_{\text{cat}}}/I_{p_{\text{ox}}}$ en función de la raíz de la concentración de GO entre la velocidad de barrido para el complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$.

En este caso la k_2 para este complejo es de $7.72 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo cual lo coloca como un buen mediador en la transferencia asistida de electrón con glucosa oxidasa, de acuerdo a lo informado en la Tabla 3 (página 21).

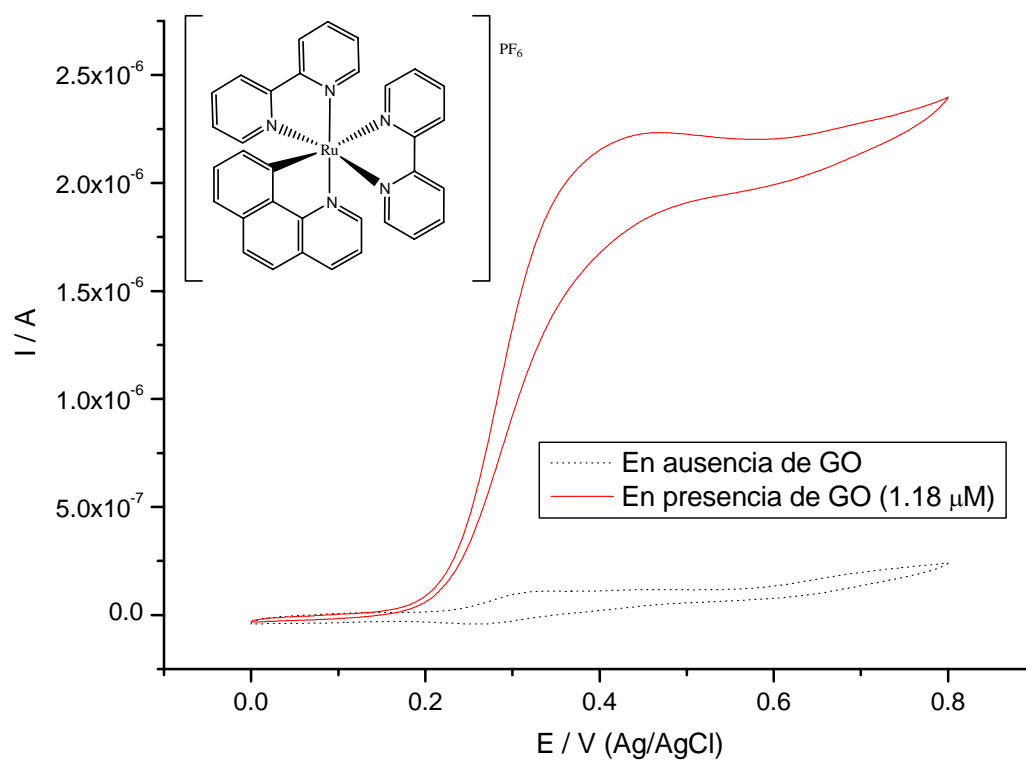
Para el complejo ciclometalado de rutenio $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})(\text{NCMe})_2]\text{PF}_6$, la constante de velocidad en la transferencia electrónica entre el complejo y la enzima redox es de $6.95 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, obtenida a partir de la Gráfica 20. Este valor sitúa a este rutenociclo como óptimo mediador en glucosa oxidasa, en relación con lo informado en la Tabla 3.



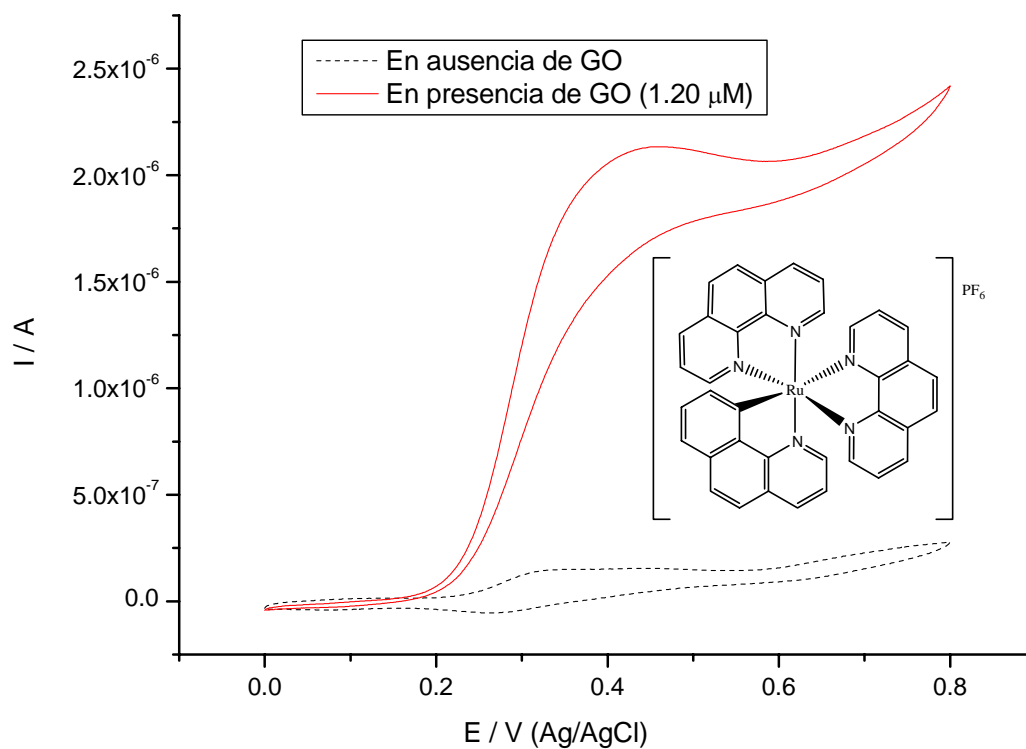
Gráfica 20. $I_{p_{cat}}/I_{p_{ox}}$ en función de la raíz de la concentración de GO entre la velocidad de barrido para el complejo $[Ru(Bzq)(Bpy)(NCMe)_2]PF_6$.

7.3. Rutenaciclos tipo $[Ru(Bzq)(N\cap N)_2]PF_6$.

Se espera que al tener otro ligante bidentado nitrogenado aromático en la esfera de coordinación del centro metálico se tenga una mayor velocidad en la transferencia del electrón con la glucosa oxidasa, ya que este tipo de ligantes facilitan en gran medida la transferencia electrónica entre la enzima y el complejo ciclometalado. Experimentalmente se corroboró lo planteado anteriormente, ya que este tipo de rutenaciclos presentan actividad como mediadores en la transferencia asistida electrónica con la glucosa oxidasa, debido a que se registró una corriente catalítica en la celda electroquímica (Gráfica 21 y 22).

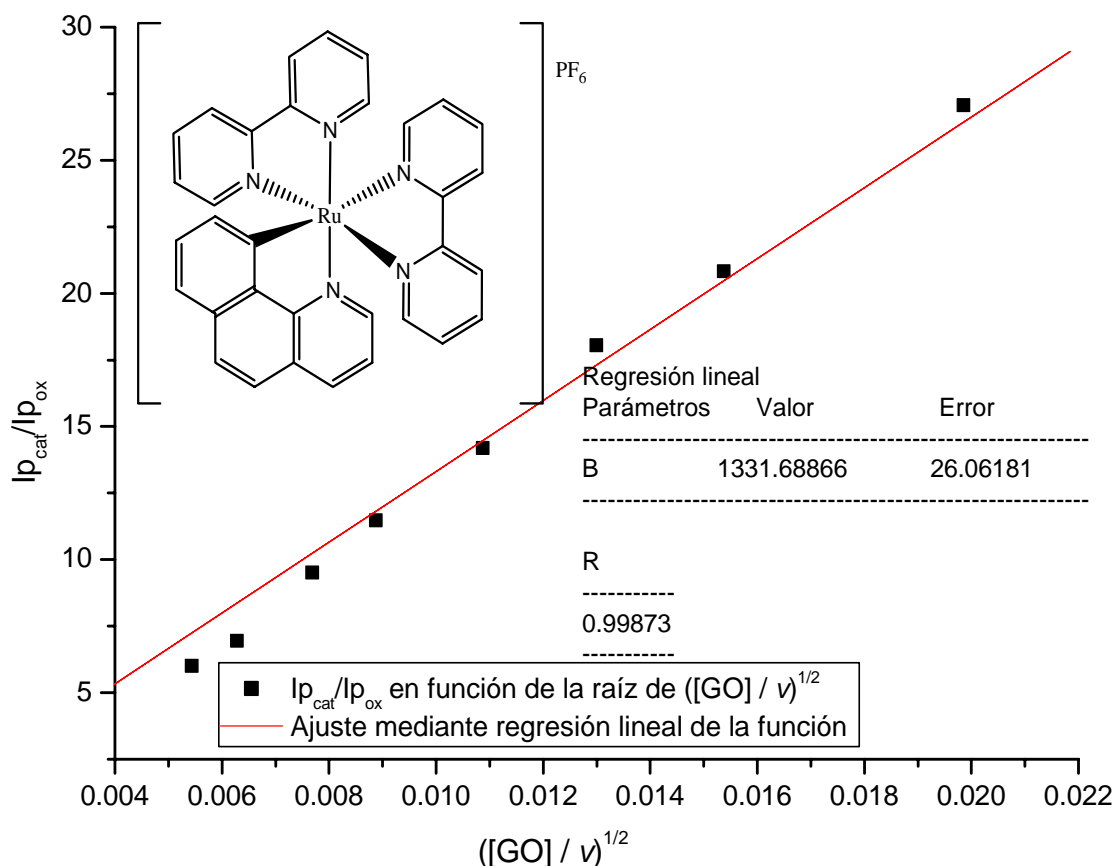


Gráfica 21. Voltamperometría cíclica de complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Bpy})_2]\text{PF}_6$ ($52.40 \mu\text{M}$) y glucosa (0.05 M) en presencia y en ausencia de glucosa oxidasa ($1.19 \mu\text{M}$) a pH de 7.1 a una velocidad de barrido de 3mV/s .



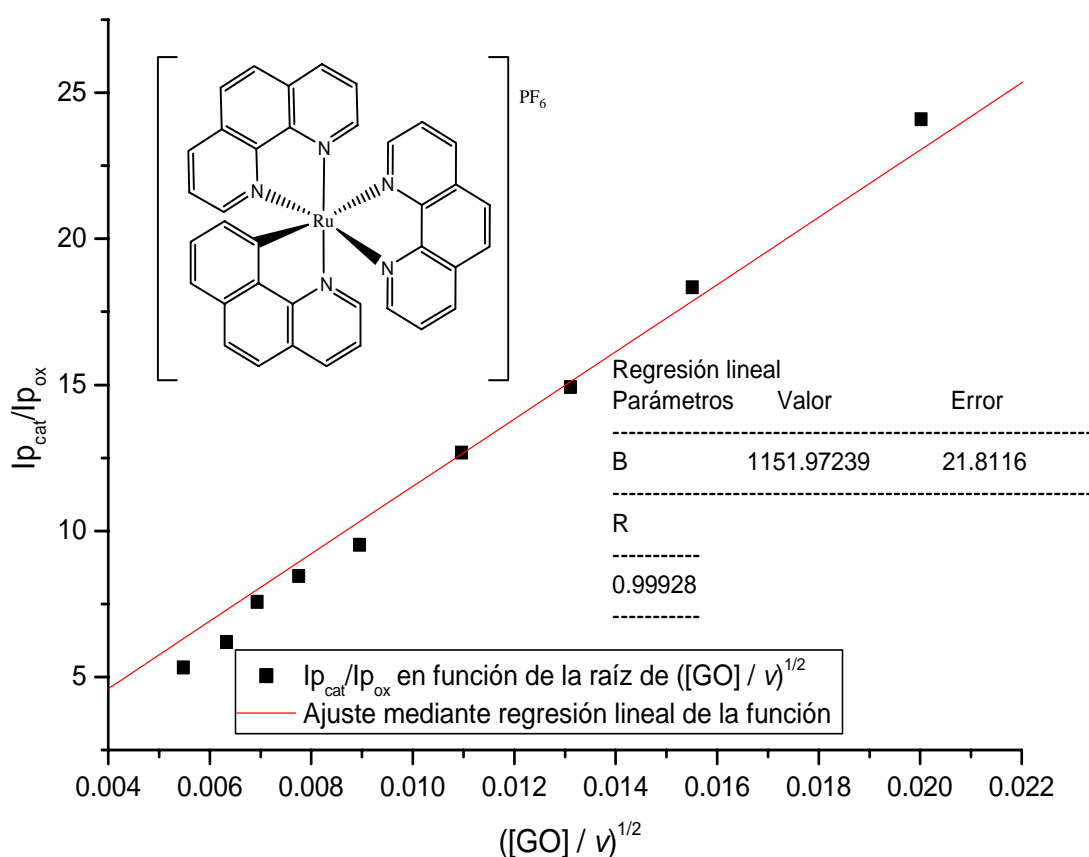
Gráfica 22. Voltamperometría cíclica de complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{Phen})_2]\text{PF}_6$ ($65.37 \mu\text{M}$) y glucosa (0.05 M) en presencia y en ausencia de glucosa oxidasa ($1.20 \mu\text{M}$) a pH de 7.1 a una velocidad de barrido de 3 mV/s .

Mediante la gráfica de $I_{p_{cat}}/I_{p_{ox}}$ en función de la raíz de la concentración de la glucosa oxidasa entre la velocidad de barrido fue posible determinar k_2 para los dos metalociclos de rutenio(II) tipo $[Ru(Bzq)(N\cap N)_2]PF_6$ (Gráficas 23 y 24).



Gráfica 23. $I_{p_{cat}}/I_{p_{ox}}$ en función de la raíz de la concentración de GO entre la velocidad de barrido para el complejo $[Ru(Bzq)(Bpy)_2]PF_6$.

El valor de k_2 para el metalociclo $[Ru(Bzq)(Bpy)_2]PF_6$ es de $3.07 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que para el complejo $[Ru(Bzq)(Phen)_2]PF_6$, la constante de velocidad de transferencia del electrón entre la glucosa oxidasa y el complejo es de $2.24 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estos valores se encuentran por encima de los informados para los complejos ciclometalados tipo $[Ru(Bzq)(N\cap N)(NCMe)_2]PF_6$, del orden de 10 veces. Este incremento en la constante está apegado a lo planteado por el efecto de agregar un ligante bidentado nitrogenado aromático más a la esfera de coordinación del rutenio, ya que se incrementa la posibilidad de transferir un electrón por medio de la enzima hacia el ligante, seguido de la transferencia del ligante al centro metálico, permitiéndose que se lleve a cabo el ciclo catalítico de la oxidación de la glucosa.



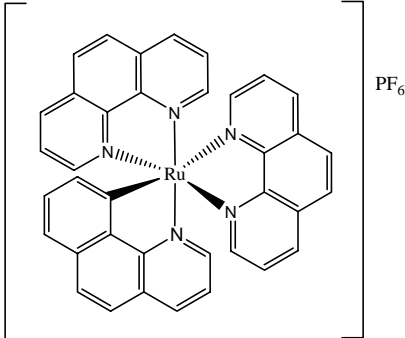
Gráfica 24. $I_{p_{cat}}/I_{p_{ox}}$ en función de la raíz de la concentración de GO entre la velocidad de barrido para el complejo $[Ru(Bzq)(Phen)_2]PF_6$.

Observando los datos electroquímicos registrados para los metalociclos de rutenio(II) sintetizados en el presente trabajo (Tabla 19), se observa que al agregar un número mayor de ligantes bidentados nitrogenados aromáticos, se tiene una k_2 del orden de 10 veces mayor con respecto a los metalociclos que tienen en la esfera de coordinación solamente un ligante bidentado aromático, además de que era lo esperado desde un principio. Por otro lado, el **compuesto 5** tiene un valor de k_2 un poco menor a lo obtenido por complejo $[Os(Phpy)(phen)_2]PF_6$, $1.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,⁽²⁷⁾ siendo algo muy favorable para hablar de un complejo de rutenio. Por otra parte, el **compuesto 4** tiene un valor de k_2 un poco mayor con respecto al compuesto $[Ru(dmiba)(bpy)_2]PF_6$, el cual es de $3.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁽⁴⁸⁾ De acuerdo a esto, se demostró que este tipo de complejos ciclotmetalados de rutenio(II), son unos excelentes mediadores en la transferencia asistida electrónica con glucosa oxidasa.

Tabla 19. Potenciales redox y valores de k_2 para los rutenociclos sintetizados en este trabajo.

complejo	E / Volts (vs Ag/AgCl)	$k_2 / M^{-1}s^{-1}$
<p>compuesto 1</p>	0.743	Sin actividad
<p>compuesto 2</p>	0.630	$6.95 \cdot 10^5$
<p>compuesto 3</p>	0.625	$7.72 \cdot 10^5$
<p>compuesto 4</p>	0.546	$3.07 \cdot 10^6$

Tabla 19. Continuación.

complejo	E / Volts (vs Ag/AgCl)	$k_2 / M^{-1}s^{-1}$
 <p style="text-align: center;">compuesto 5</p>	0.544	$2.24 \cdot 10^6$

Ahora, no es posible tener una relación de potencial redox-actividad de mediador, ya que el potencial redox no es un parámetro que afecte en gran medida la actividad del mediador con la enzima. Por otro lado, potenciales bajos favorecen a que electroquímicamente sea más fácil oxidar al mediador y de esta manera se tenga la especie de Ru^{III} del complejo ciclometalado de rutenio (la especie catalítica), sin que existan oxidaciones colaterales en el medio de reacción. Un parámetro que afecte directamente a k_2 sería la afinidad que posea el mediador con la enzima, corroborando lo planteado anteriormente, al aumentar el número de ligantes bidentados nitrogenados, se favorece la afinidad de la enzima con el mediador, y con ello se ve incrementada la velocidad de intercambio del electrón entre la glucosa oxidasa y el mediador (complejo ciclometalado de rutenio).

8. Conclusiones.

8. Conclusiones.

1. Ha sido propuesta y desarrollada una ruta sintética para la obtención de nuevos complejos ciclometalados de rutenio(II): $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, los complejos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$ y los metalociclos $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$.
2. En la síntesis de los complejos tipo *cis* $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$ se observó que la adición del ligante bidentado (2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina) se lleva a cabo de manera específica sobre el complejo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, ya que solamente se forma uno de los isómeros existentes para este tipo de complejos.
3. Los complejos $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, los tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$ y los metalociclos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$ tuvieron un comportamiento electroquímico reversible en las transiciones $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$.
4. Los metalociclos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$ y los $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$ presentaron actividad como mediadores en la transferencia asistida electrónica con glucosa oxidasa.
5. Se propone que al aumentar el número de ligantes bidentados nitrogenados en la esfera de coordinación del rutenio, se incrementa la velocidad de intercambio electrónico entre la glucosa oxidasa y el complejo organometálico. Por otro lado, el efecto de estos ligantes bidentados nitrogenados aromáticos en el metalociclo de rutenio(II) son de vital importancia para el desarrollo de biosensores amperométricos altamente sensibles.
6. El valor de k_2 para los complejos tipo $[\text{Ru}(\text{Bzq})(\text{N}\cap\text{N})_2]\text{PF}_6$ llega a ser alto ($k_2 > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), en comparación con otros mediadores informados en la literatura, colocando a este tipo de rutenociclos como excelentes mediadores en la transferencia asistida electrónica con glucosa oxidasa.



9. Perspectivas.

10. Bibliografía.

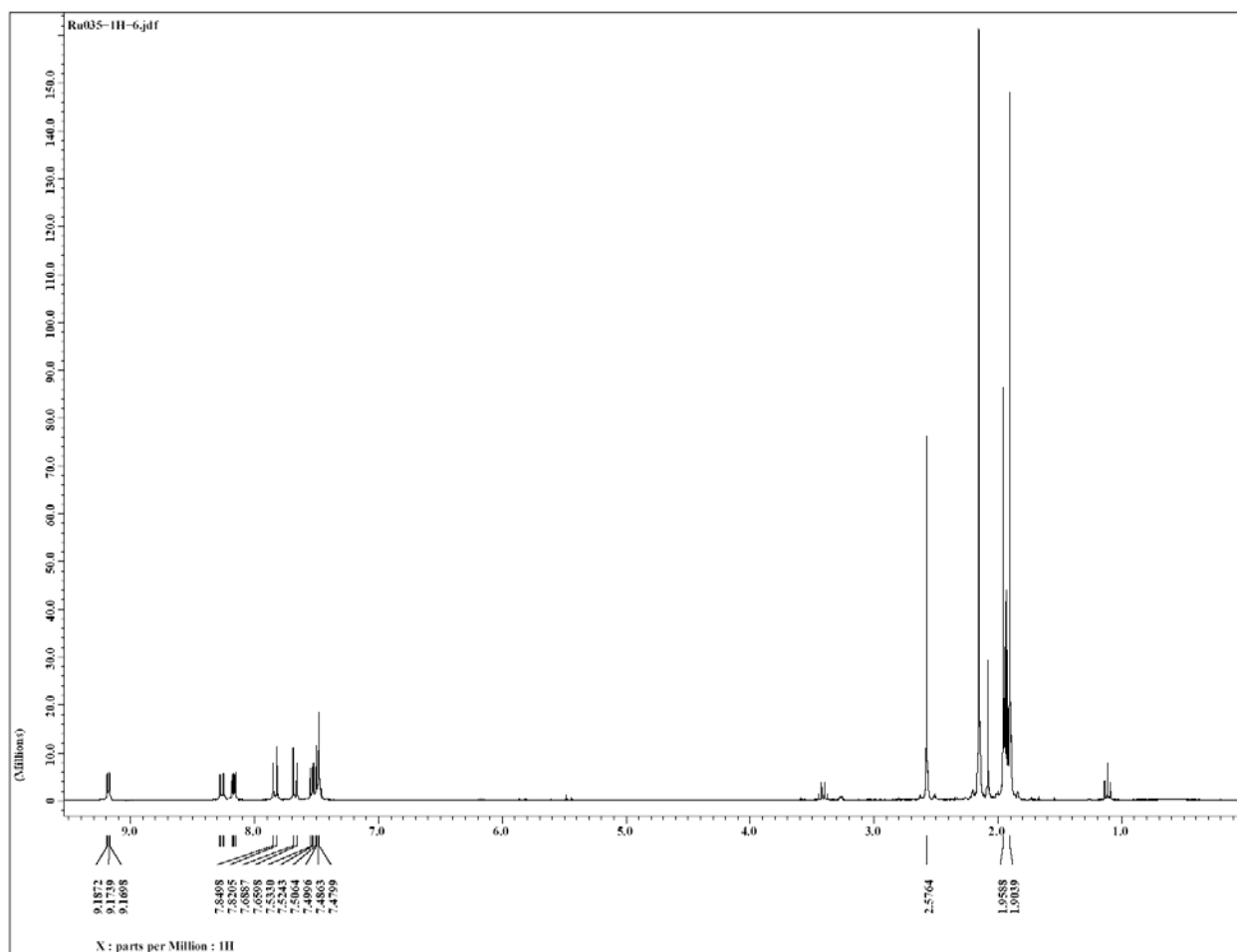
10. Bibliografía.

- (1) R. Noyori, T. Ohkuma, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 40.
- (2) K. Mashima, Y. Matsumura, K. Kusano, H. Kumobayashi, N. Sayo, Y. Hori, T. Ishizaki, S. Akutagawa, H. J. Takaya, *Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 609.
- (3) M. Kitamura, M. Tokunaga, T. Ohkuma, R. Noyori, *Organic Syntheses*; Wiley & Sons: New York, **1998**, Vol. 9, 589.
- (4) X. Wu, C. L. Fraser, *Macromolecules*, **2000**, *33*, 7776.
- (5) W. Baratta, A. Del Zotto, G. Esposito, A. Sechi, M. Toniutti, E. Zangrando, P. Rigo, *Organometallics*, **2004**, *23*, 6264.
- (6) J. T. Rademacher, M. Baum, M. E. Pallack, W. J. Brittain, I. Del Rio, G. van Koten, M. Lutz, A. L. Spek, *Organometallics*, **2000**, *19*, 361.
- (7) T. Ando, M. Kamigaito, M. Sawamoto, *Macromolecules*, **2000**, *33*, 5825.
- (8) A. D. Ryabov, V. S. Sukharev, L. Alexandrova, R. Le Lagadec, M. Pfeffer, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 6529.
- (9) J. Kulys, T. Buch-Rasmussen, K. Bechgaard, V. Razumas, J. Kazlauskaitė, J. Marcinkeviciene, J. B. Christensen, H. E. Hansen, *J. Mol. Catal.*, **1994**, *91*, 407.
- (10) E. A. Seddon, K. R. Seddon, *The chemistry of ruthenium*. Elsevier, Amsterdam, **1984**.
- (11) A.P.F. Turner, *Science*, **2000**, *290*, 1315.
- (12) L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *400*, 91.
- (13) J. C. Vidal, E. Garcia-Ruiz, J. R. Castillo, *Microchim. Acta*, **2003**, *143*, 93.
- (14) E. S. Ryabova, E. Csöregi, A. D. Ryabov, *J. Mol. Cat. B*, **2000**, *11*, 139.
- (15) A. Bentley, A. Atkinson, J. Jezek, D. M. Rawson, *Toxicol. Vitro*, **2001**, *15*, 469.
- (16) A. E. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E.V. Plotkin, L. D. Scott, A.P. Turner, *Anal. Chem.*, **1984**, *56*, 667.
- (17) A. Heller, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, 128.
- (18) A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1992**, *96*, 3579.
- (19) R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, *105*, 1161.
- (20) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, *811*, 265.
- (21) H. B. Gray, J. R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 537.
- (22) A. D. Ryabov, A. Amon, R. K. Gorbatova, E. S. Ryabova, B. B. Gnedenko, *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 14072.
- (23) A. D. Ryabov, V. N. Goral, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1997**, *2*, 182.

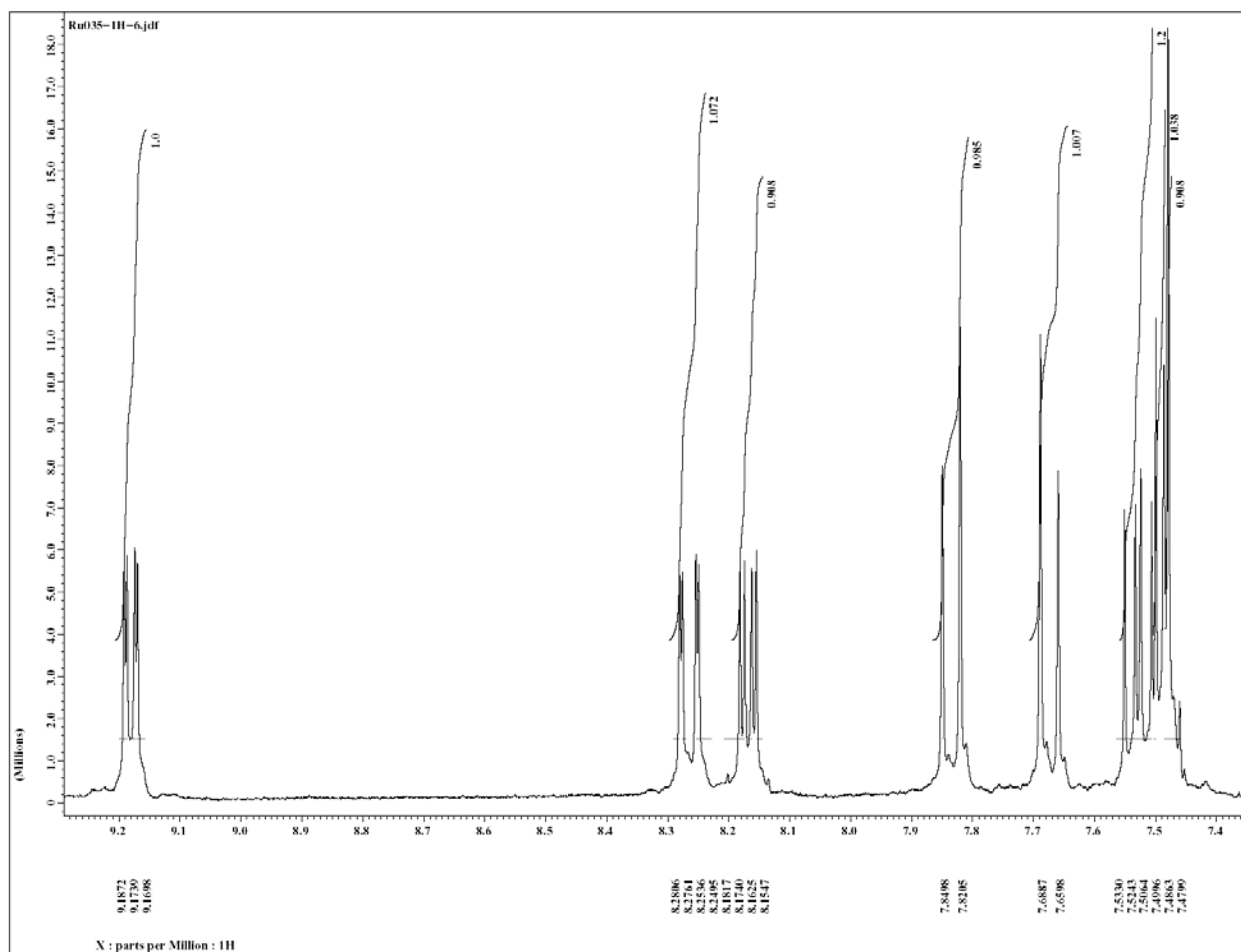
-
- (24) C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 2.
- (25) V. N. Goral, A. D. Ryabov, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1998**, *45*, 61.
- (26) A. D. Ryabov, Y. N. Firsova, A. Y. Ershov, I. A. Dementiev, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**, *4*, 175.
- (27) A. D. Ryabov, V. S. Soukharev, L. Alexandrova, R. Le Lagadec, M. Pfeffer, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6598.
- (28) A. D. Ryabov, V. S. Kurova, V. N. Goral, M. D. Reshetova, J. Razumiene, R. Simkus, V. Laurinavicius, *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 600.
- (29) J. Kulys, N. K. Cenas, *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, *744*, 57.
- (30) D. M. Fraser, *Anal. Lett.*, **1994**, *27*, 2039.
- (31) P. Atanasov, S. Yang, C. Salehi, A. L. Ghindilis, E. Wilkins, D. Schade, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 669.
- (32) C. D. T. Bratten, P. H. Cobbold, J. M. Cooper, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 1164.
- (33) J. P. Membreño, A. Z. Nacach, *Rev Med IMSS*, **2005**, *43*, 97.
- (34) M. S Akhtar, A. Ahmad, V. Bhakuni, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 7142.
- (35) M. D. Gouda, S. A. Singh, A. G. Rao, M. S. Thakur, N. G. Karanth, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24324.
- (36) T. Nakamura, Y. Ogura, *J. Biochem.*, **1962**, *52*, 214.
- (37) Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda, V. Massey, *J. Biol. Chem.*, **1964**, *239*, 3927.
- (38) F. R. Duke, M. Weibel, D.S. Page, V. G. Bulgrin, J. Luthy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 3904.
- (39) E. S. Ryabova, V. N. Goral, E. Csöregi, B. Mattiasson, A. D. Ryabov, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1999**, *38*, 804.
- (40) H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 153.
- (41) A. L. Crumbliss, H. A. O. Hill, D. J. Page, *J. Electroanal. Chem.* **1986**, *206*, 327
- (42) E. S. Ryabova, E. Csöregi, A. D. Ryabov, *J. Mol. Catal. B*, **2000**, *11*, 139.
- (43) N. A. Morris, M. F. Cardoso, B. J. Birch, A. P. F. Turner, *Electroanalysis*, **1992**, *4*, 1.
- (44) F. Battaglini, E. J. Calvo, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1994**, *90*, 987.
- (45) S. M. Zakeeruddin, D. M. Fraser, M. K. Nazeeruddin, M. Grätzel, *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, *337*, 253.
- (46) D. M. Fraser, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel, *J. Electroanal. Chem.*, **1993**, *359*, 125.
- (47) C. Zhang, T. Haruyama, E. Kobatake, M. Aizawa, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *408*, 225.

-
- (48) R. Le Lagadec, L. Rubio, L. Alexandrova, R. A. Toscano, E. V. Ivanova, R. Meskys, V. Laurinavicius, M. Pfeffer, A. D. Ryabov, *J. Organomet. Chem.*, **2004**, 689, 4820.
- (49) H. Le Bozec, D. Touchard, P. H. Dixneuf, *Adv. Organomet. Chem.*, **1989**, 29, 163.
- (50) E. O. Fischer, C. Elschenbroich, C. G. Kreiter, *J. Organomet. Chem.*, **1967**, 7, 481.
- (51) A. M. Bennett, T. N. Huang, T. W. Matheson, A. K. Smith, *Inorg. Synth.* **1982**, 21, 74.
- (52) H. C. L. Abbenhuis, M. Pfeffer, J. P. Sutter, A. de Cian, J. Fischer, H. Li Ji, J. H. Nelson, *Organometallics*. **1993**, 12, 4464.
- (53) M. Pfeffer, J. P. Sutter, E. P. Urriolabeitia, *Inorg. Chim. Acta.* **1996**, 249, 63.
- (54) S. Fernández, M. Pfeffer, V. Ritleng, C. Sirlin, *Organometallics*. **1999**, 18, 2390.
- (55) D. Mandon, D. Astruc, *J. Organomet. Chem.*, **1989**, 369, 383.
- (56) D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of laboratory chemicals*, fifth edition, Pergamon Press, Londres, **2003**.
- (57) D. F. Shriver, M. A. Dredzon, *The manipulation of air sensitive compounds*, John Wiley & Sons, New York, **1986**.
- (58) R. A. Zelanka, M. C. Band, *Can. J. Chem.*, **1972**, 50, 3063.
- (59) P. Kus, G. Knerr, L. Czuchajowski, *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, 27, 1161.
- (60) C. J. Chandler, L. W. Deady, J. A. Reiss, *J. Heterocyclic Chem.* **1981**, 18, 599.
- (61) E. C. Butterworth, J. M. Heilbron, B. H. Hey, *J. Chem. Soc.*, **1940**, 349, 356 .
- (62) A. D. Ryabov, H. Estevez, L. Alexandrova, M. Pfeffer, R. Le Lagadec, *Inorg. Chim. Acta*, **2006**, 359, 883 – 887.
- (63) A. D. Ryabov, R. Le Lagadec, H. Estevez, R. A. Toscano, S. Hernandez, L. Alexandrova, V. S. Kurova, A. Fisher, C. Sirlin, M. Pfeffer, *Inorg. Chem.*, **2005**, 44, 1626-1634
- (64) M. K. Weibel, H. J. Bright, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 2734.
- (65) C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J. M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 2.
- (66) F. M. J. Antonius, T. Van Der. E. M. Cornelus, K. Van Der, J. Van Koten, *J. Org. Chem.*, **1981**, 212, 283.
- (67) J. T. B. H. Jastrzebski, G. Van Koten, *Inorg. Synth*, **1988**, 26, 150.
- (68) L. Chassot, E. Müller, A. Zelewsky, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 4249.
- (69) A. D. Ryabov, Y. N. Firsova, V. N. Goral, E. S. Ryabova, A. N. Shevelkova, L. L. Troitskaya, T. V. Demeschik, V. I. Sokolov, *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 806.

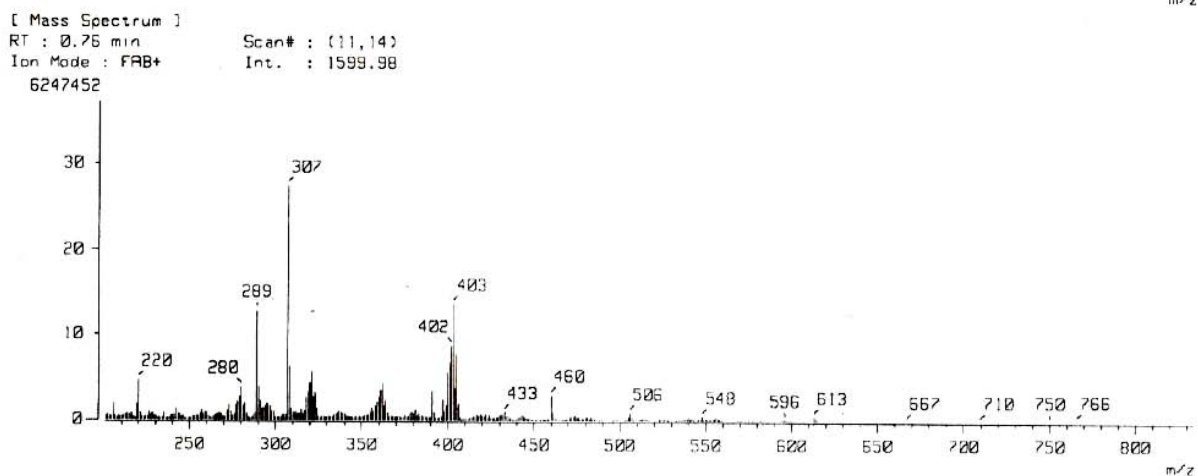
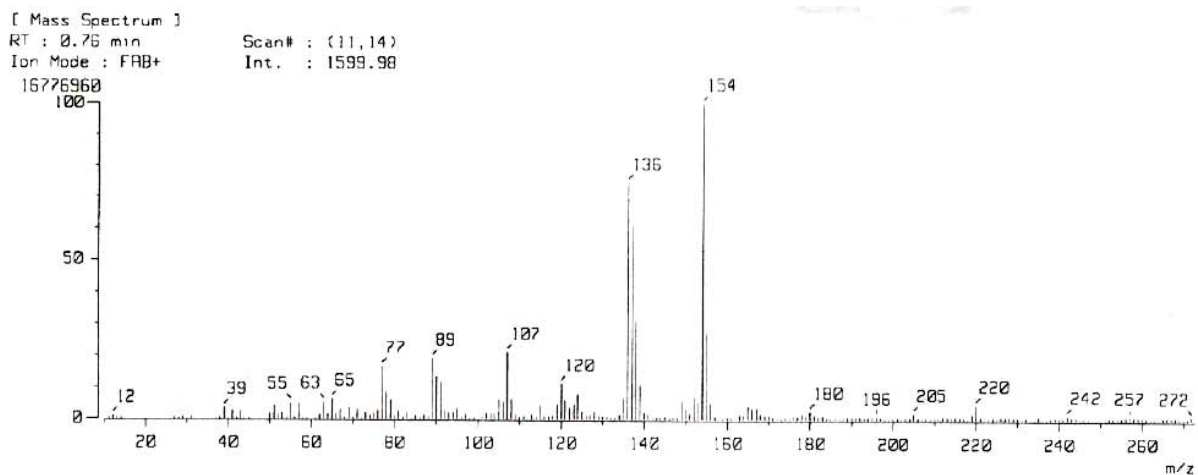
Anexo.



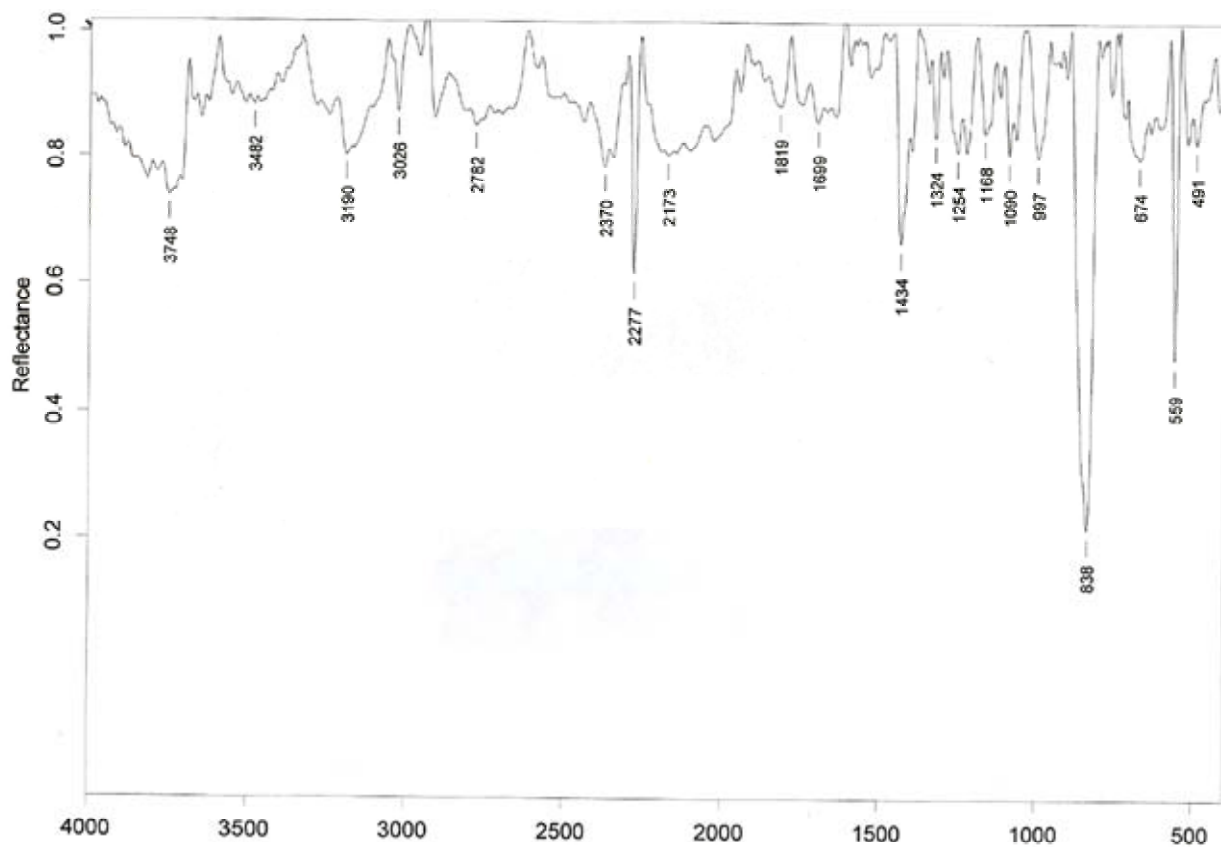
Espectro 1. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del **compuesto 1**.



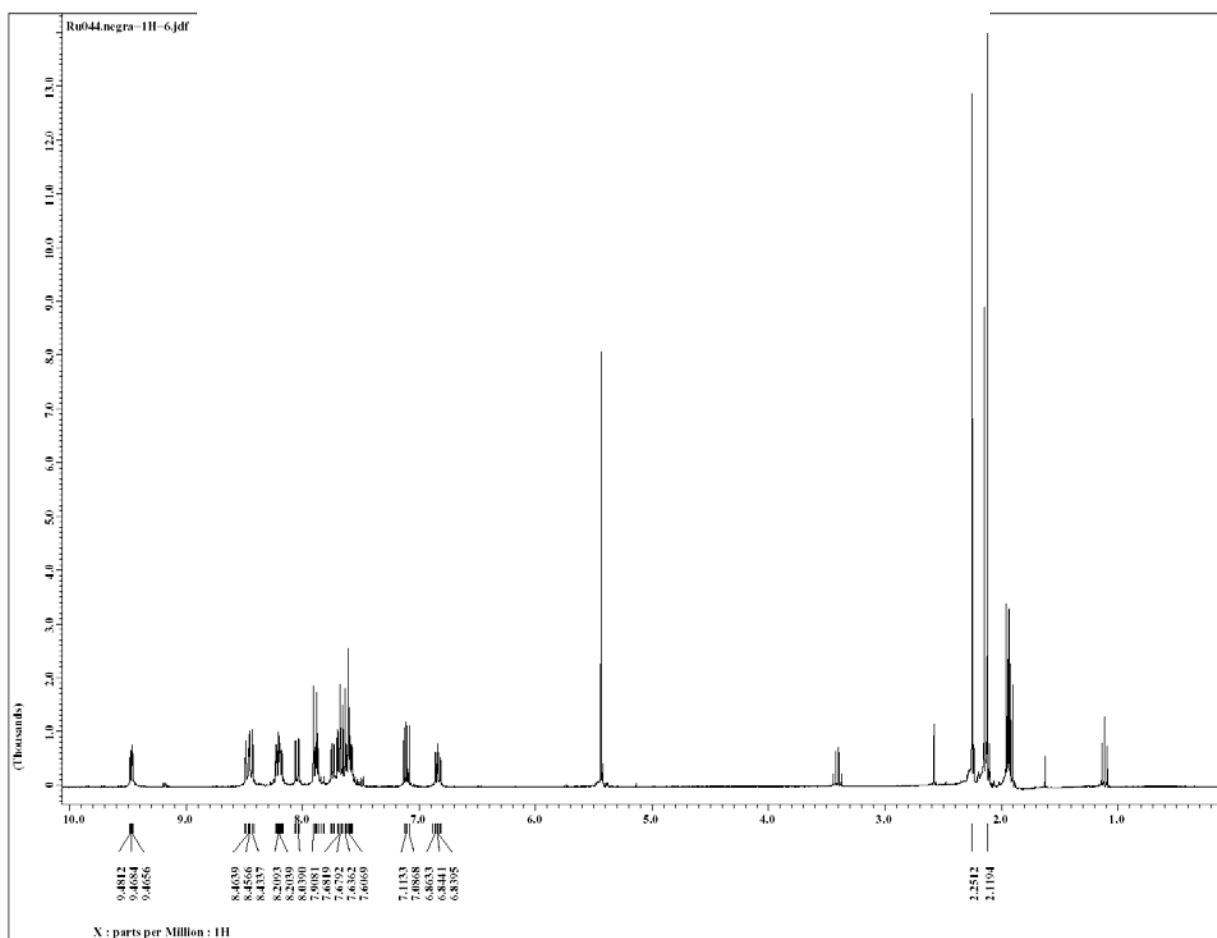
Espectro 2. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del **compuesto 1**.



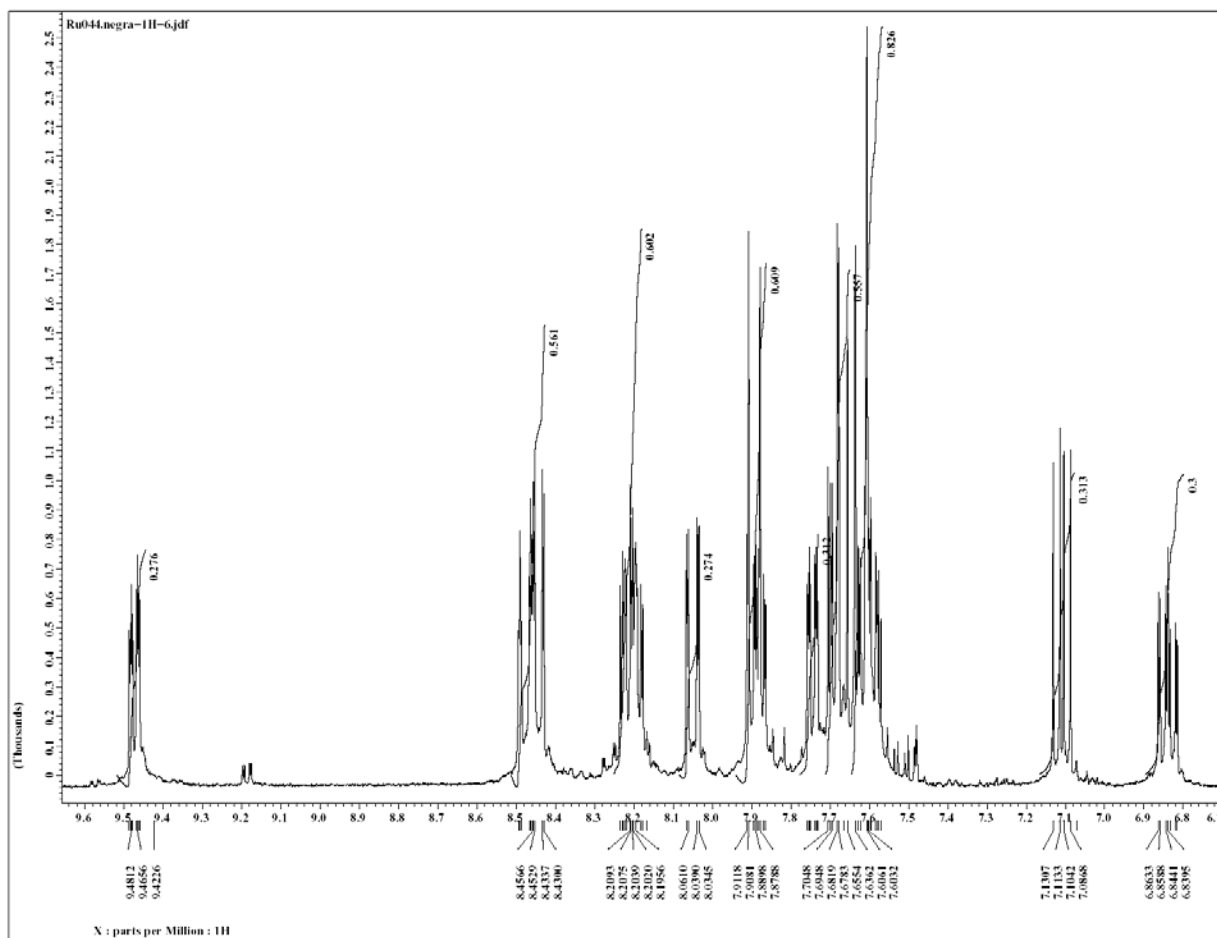
Espectro 3. Espectrometría de masas (FAB⁺) del compuesto 1.



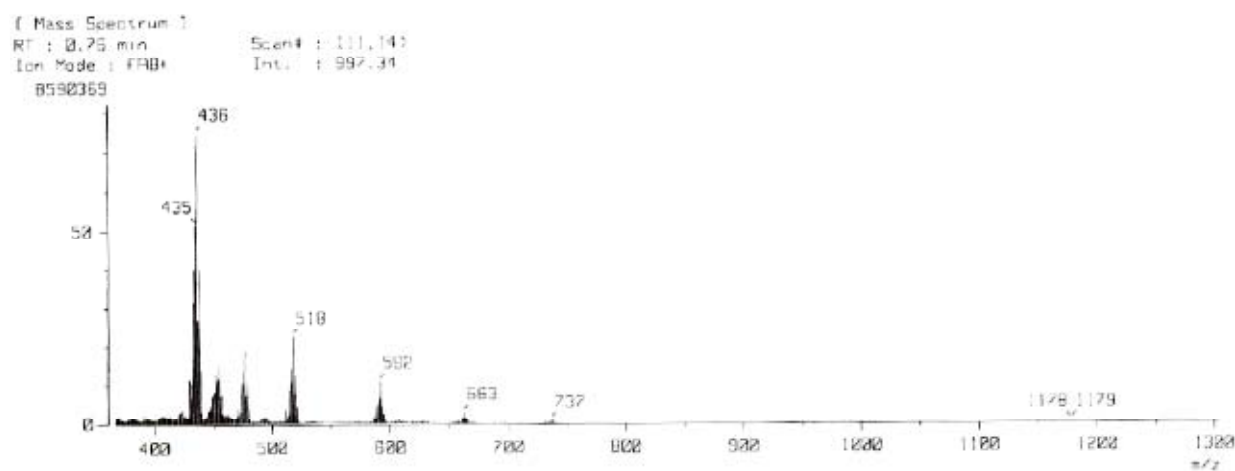
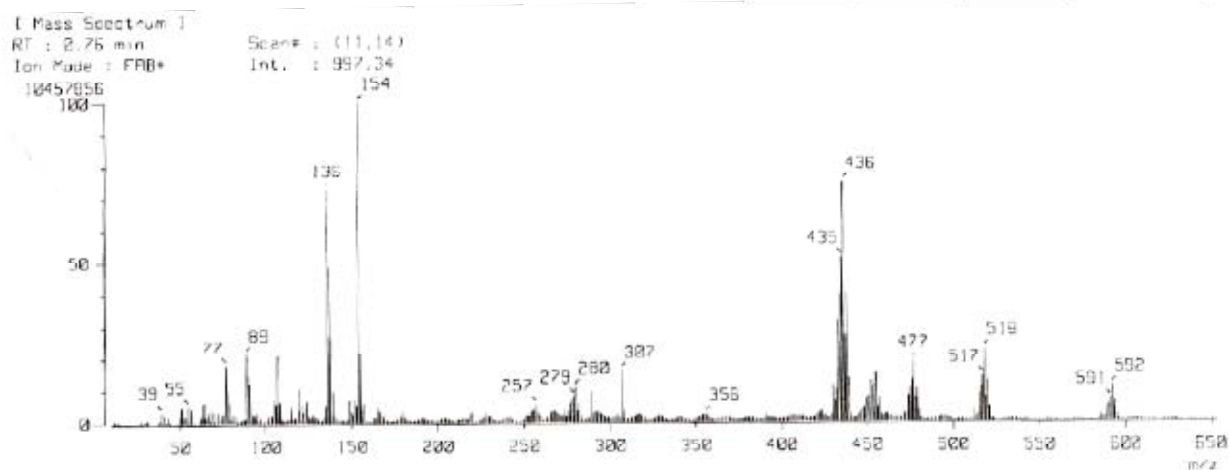
Espectro 4. IR ($\nu = \text{cm}^{-1}$, pastilla/ KBr) del compuesto 1.



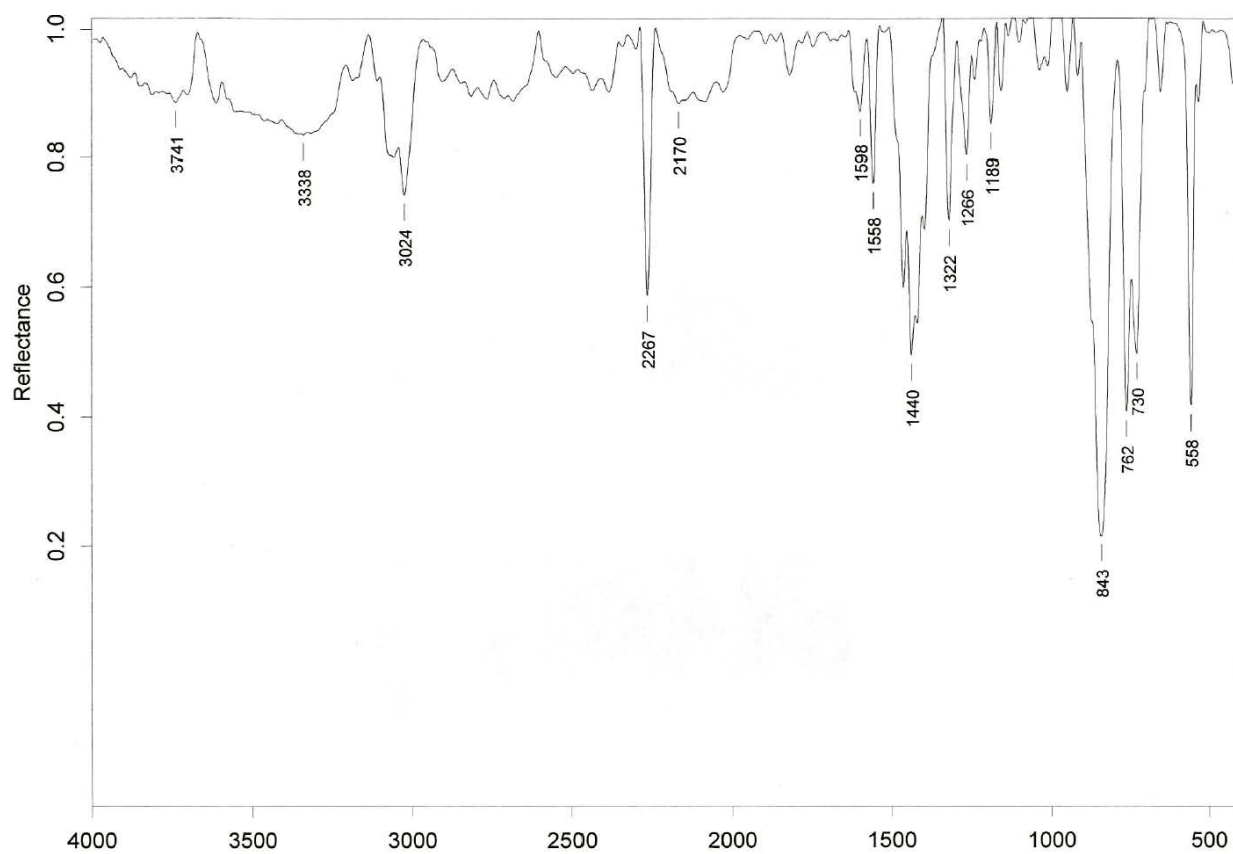
Espectro 5. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del **compuesto 2**.



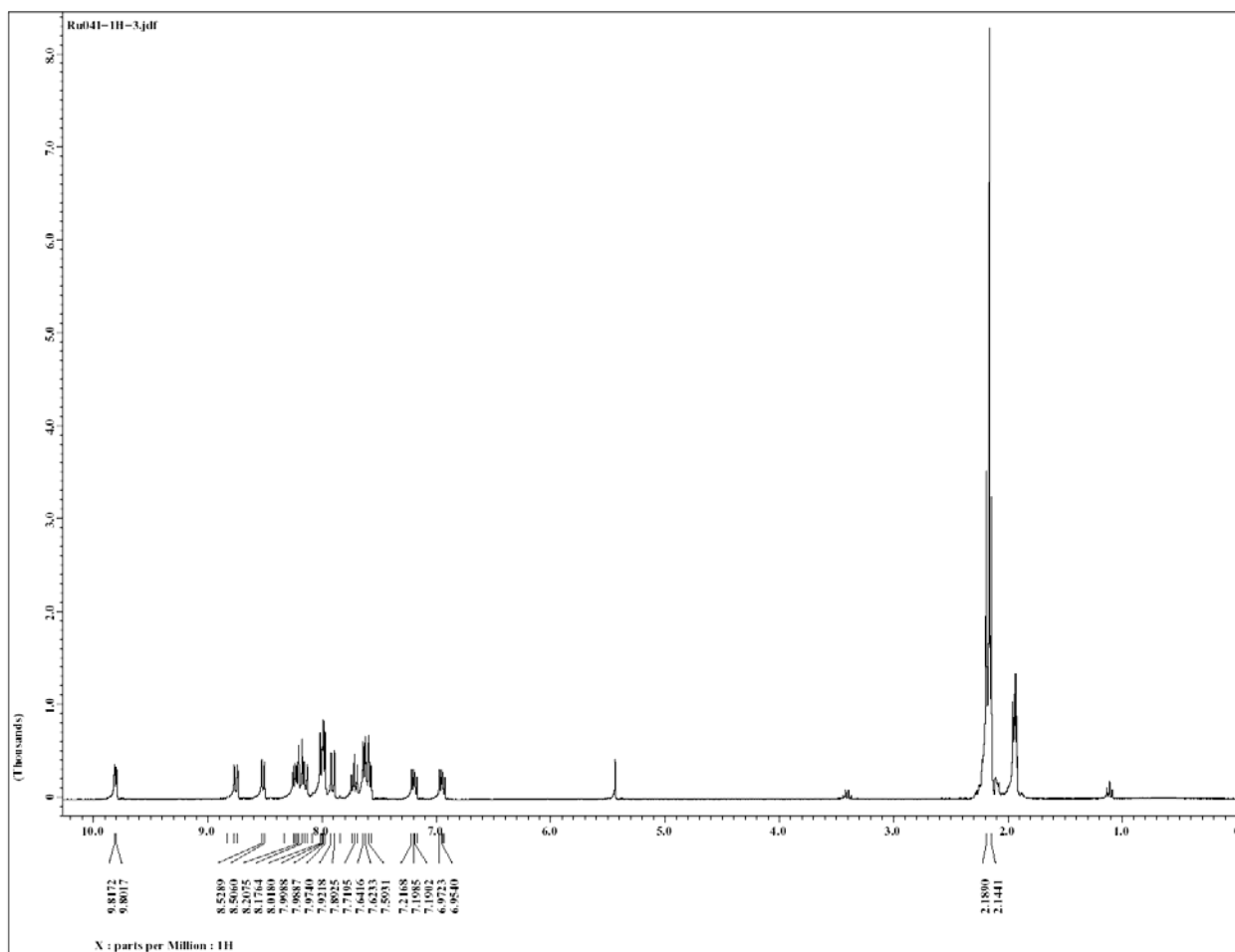
Espectro 6. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del **compuesto 2**.



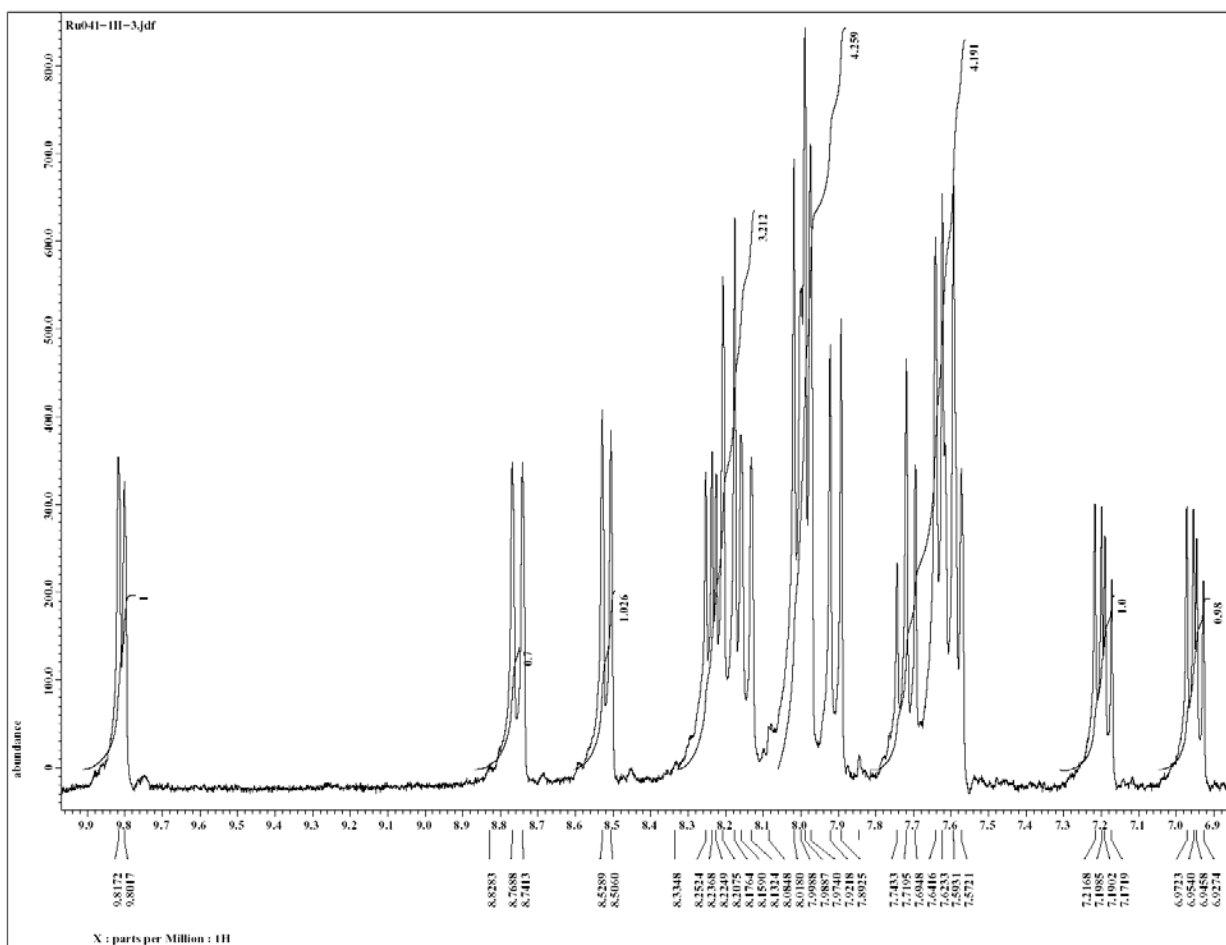
Espectro 7. Espectrometría de masas (FAB⁺) del **compuesto 2**.



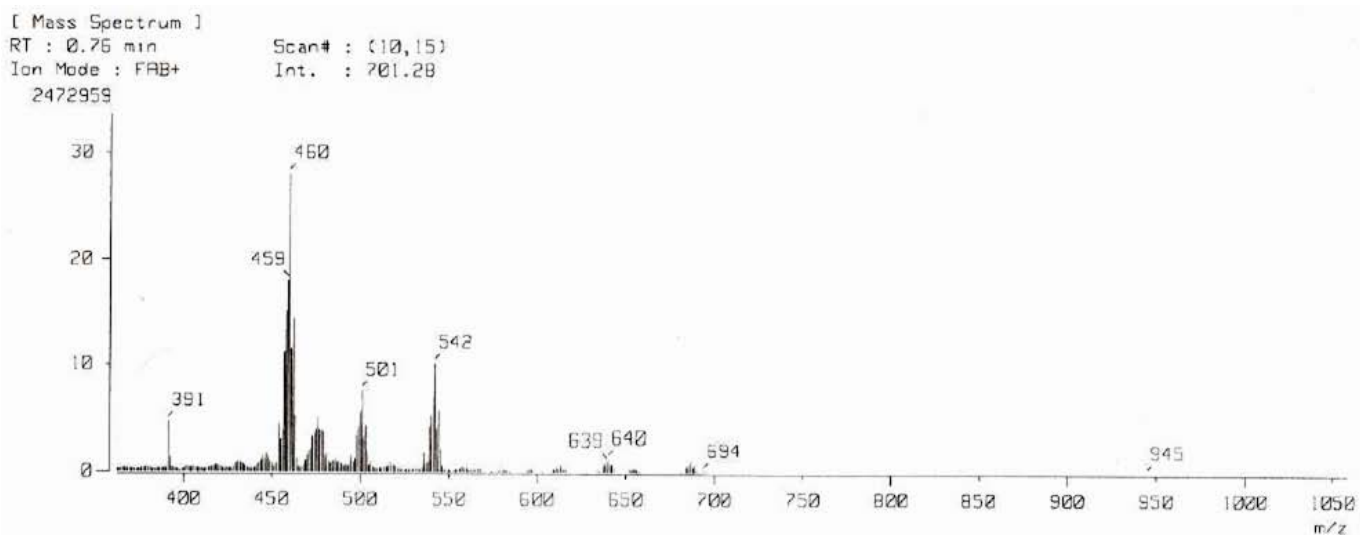
Espectro 8. IR ($\nu = \text{cm}^{-1}$, pastilla/ KBr) del **compuesto 2.**



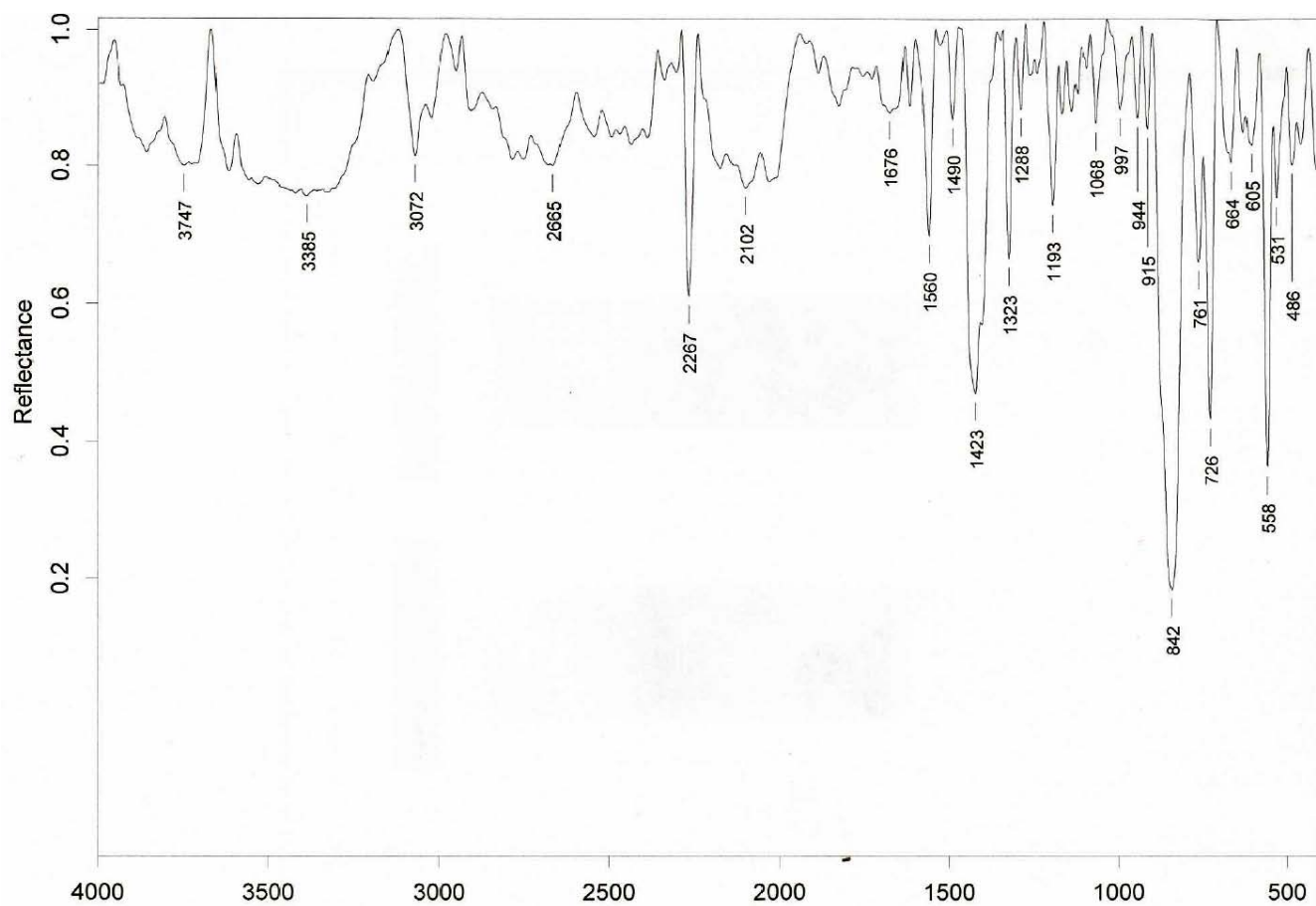
Espectro 9. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del compuesto **3**.



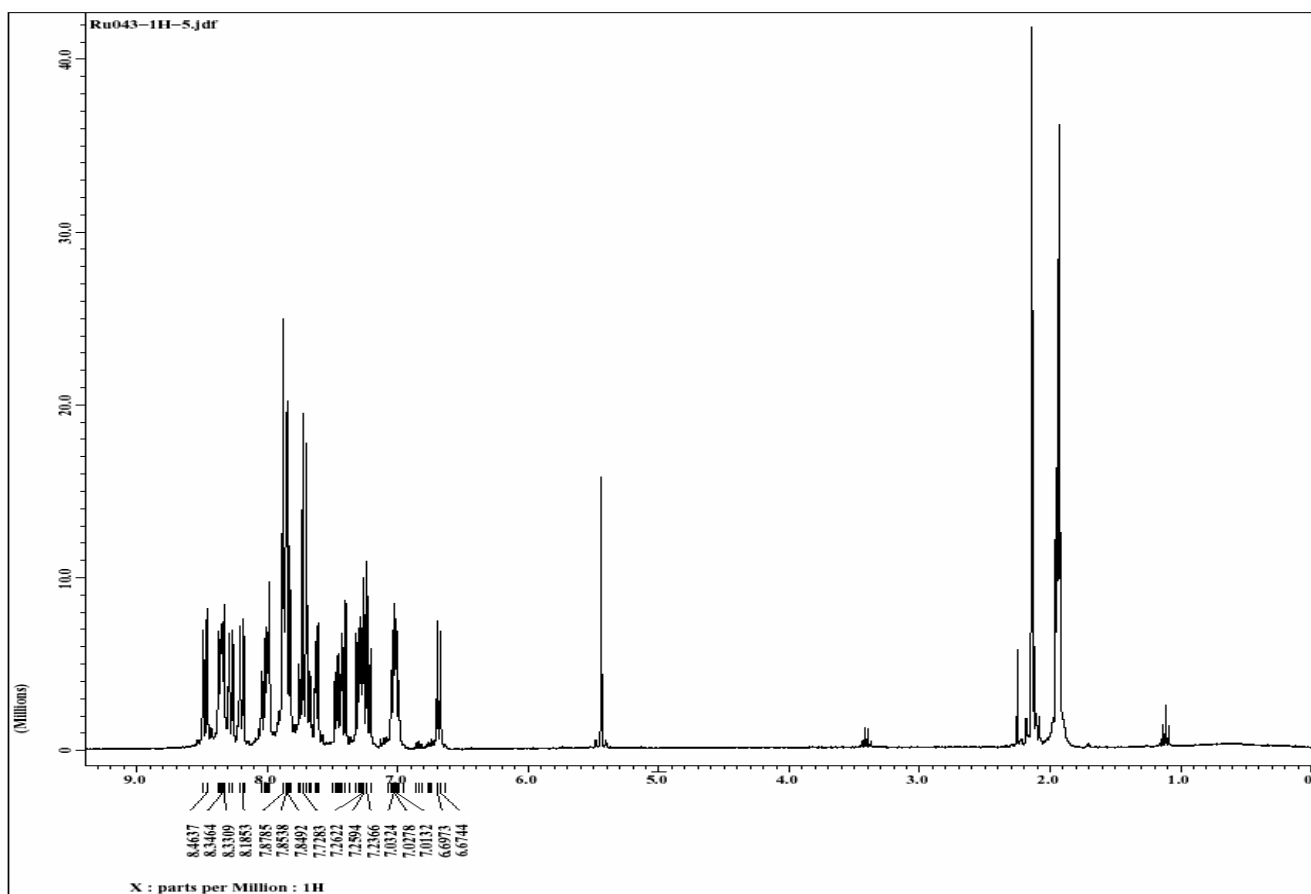
Espectro 10. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del compuesto **3**.



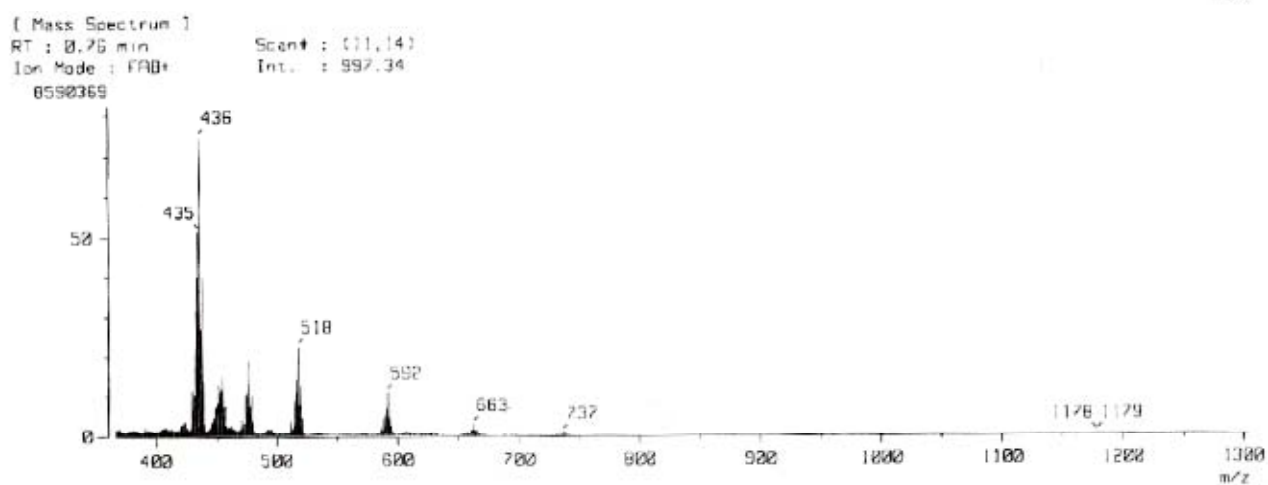
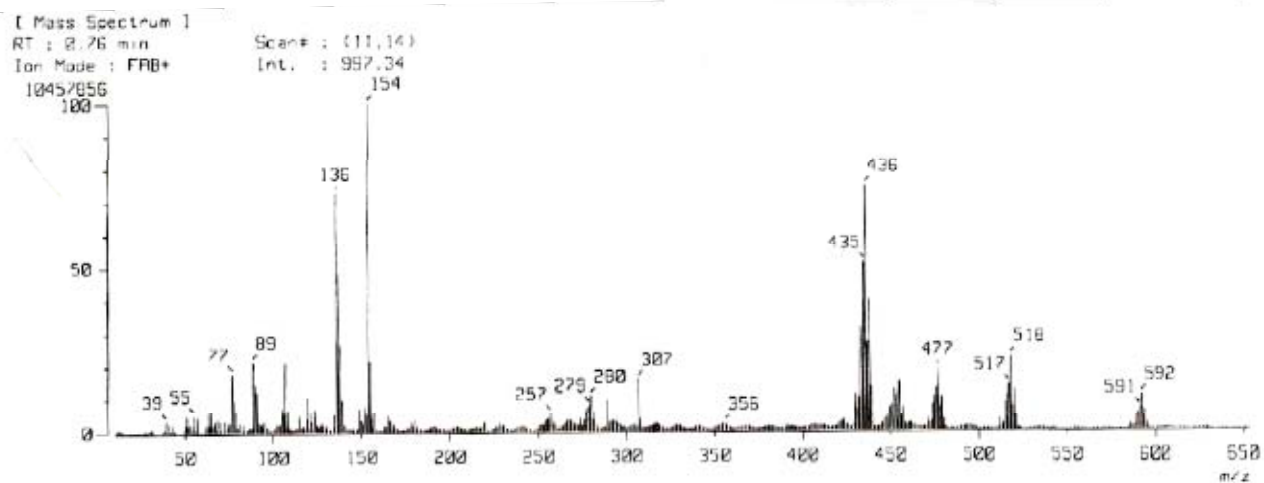
Espectro 11. Espectrometría de masas (FAB^+) del compuesto **3**.



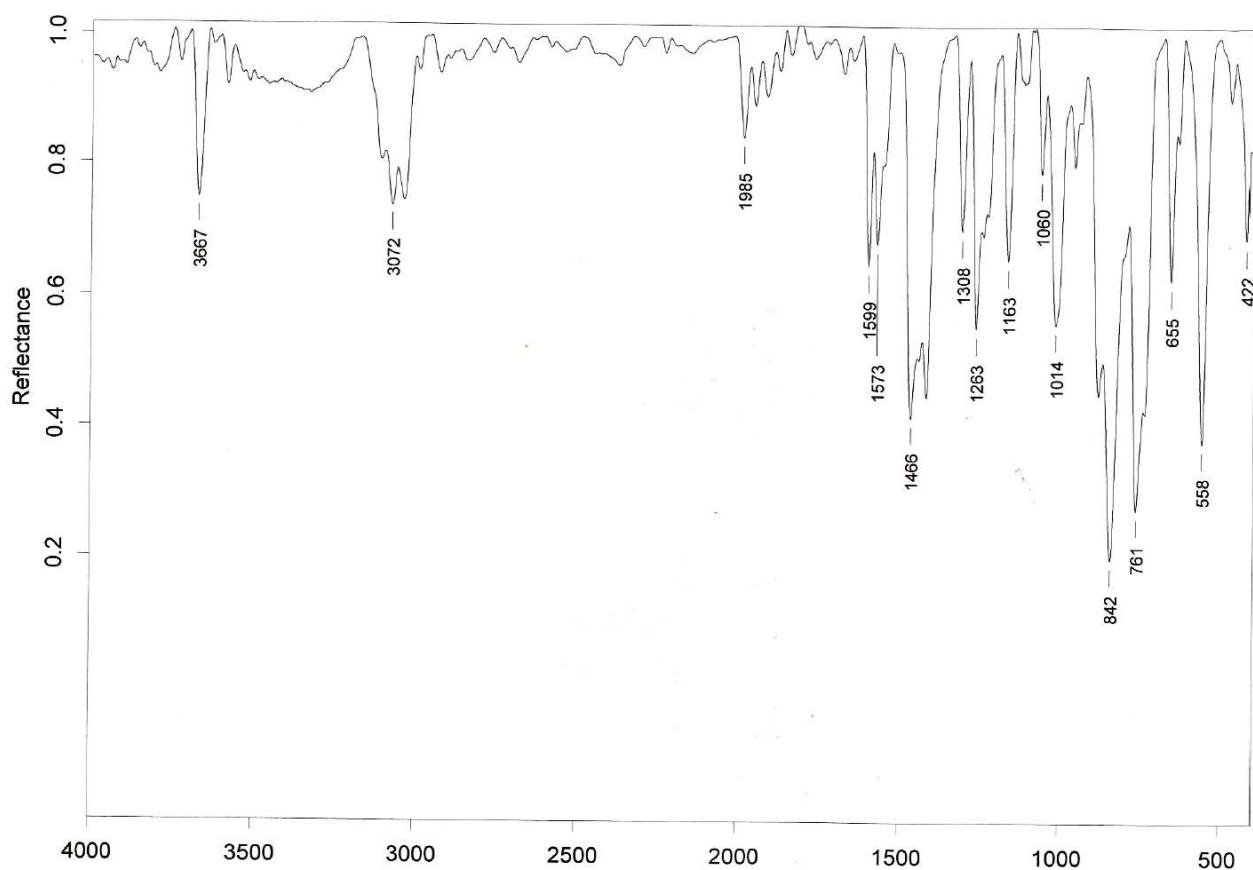
Espectro 12. IR ($\nu = \text{cm}^{-1}$, pastilla/ KBr) del **compuesto 3**.



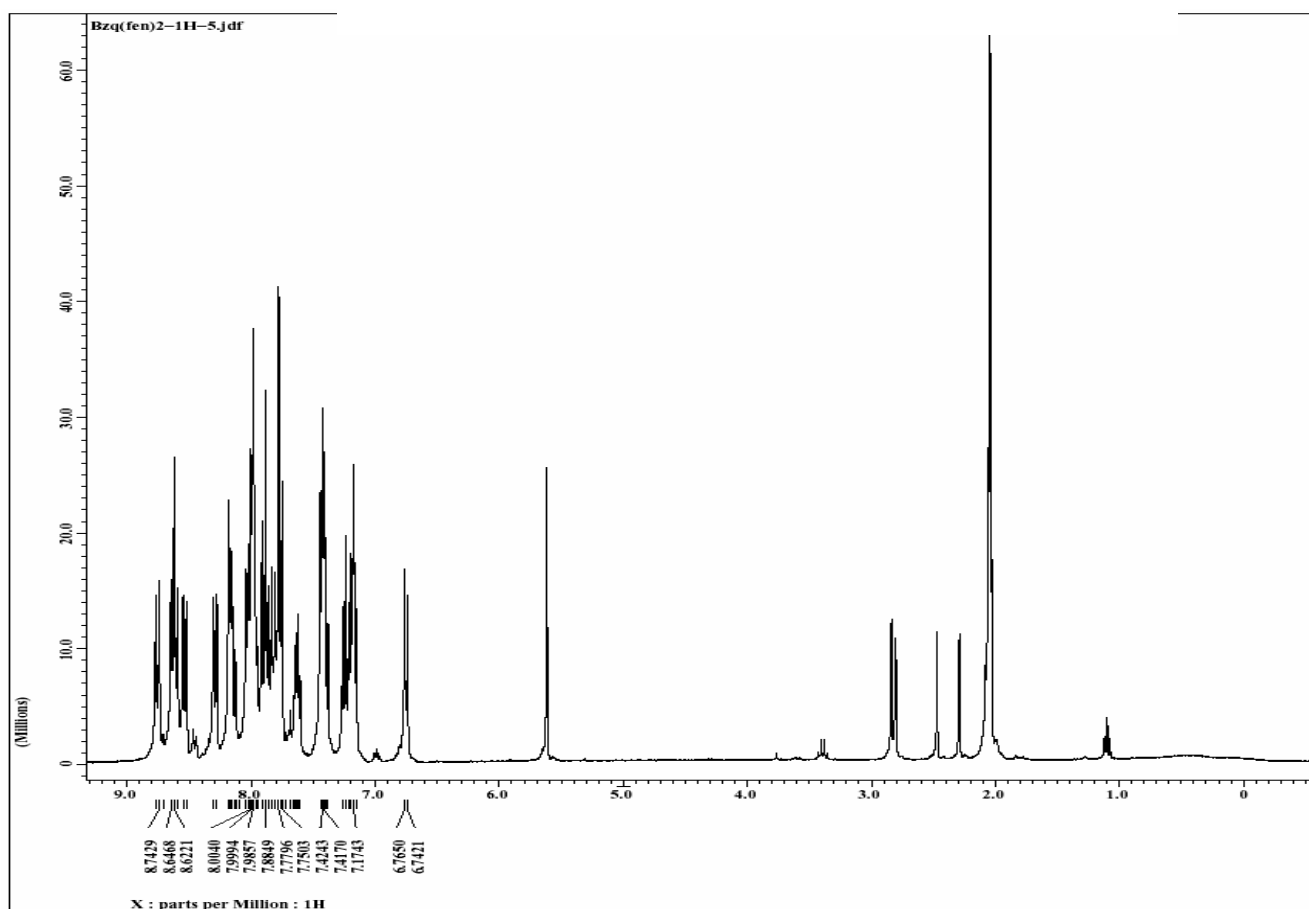
Espectro 13. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del **compuesto 4**.



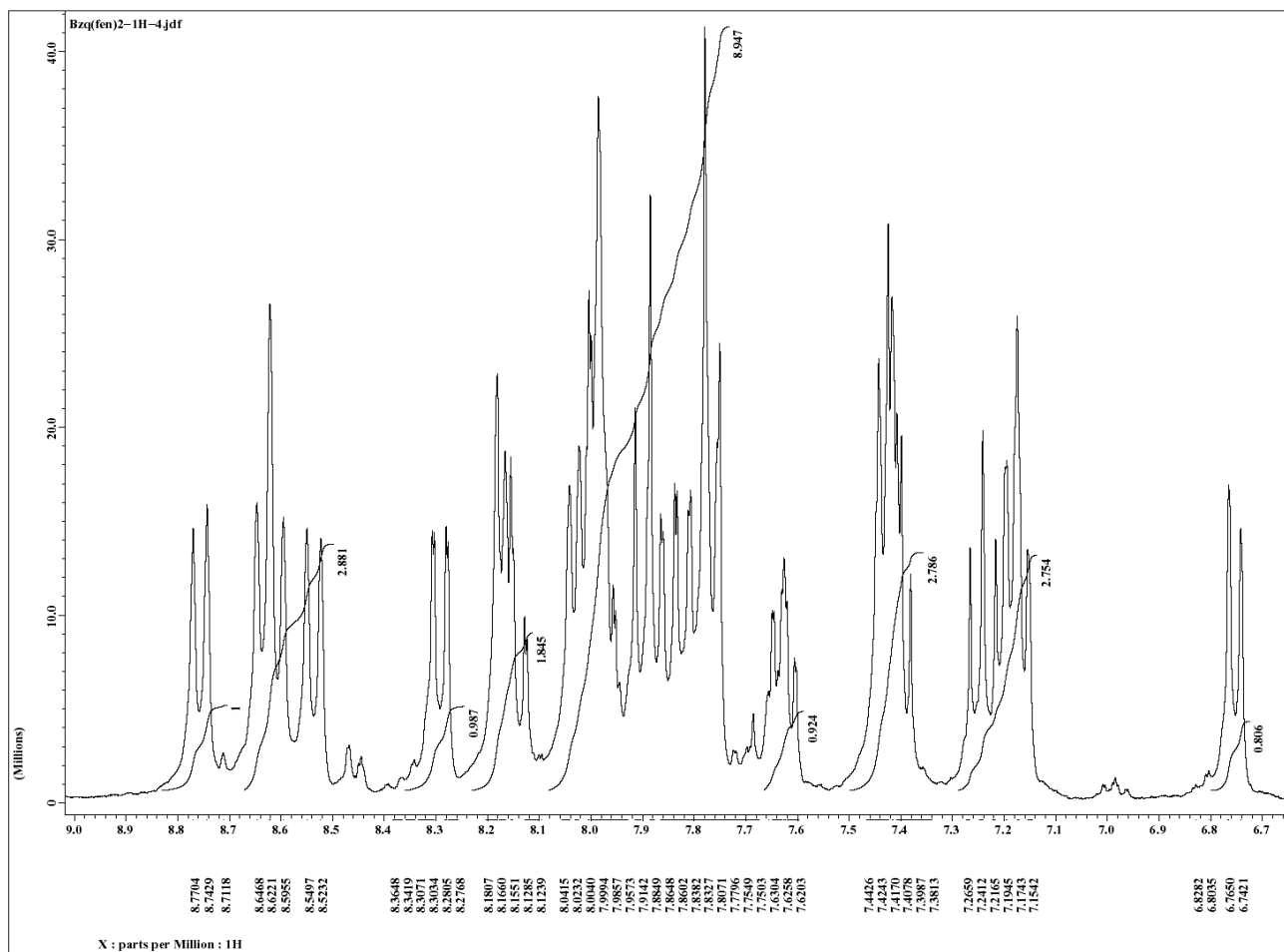
Espectro 15. Espectrometría de masas (FAB⁺) del compuesto 4.



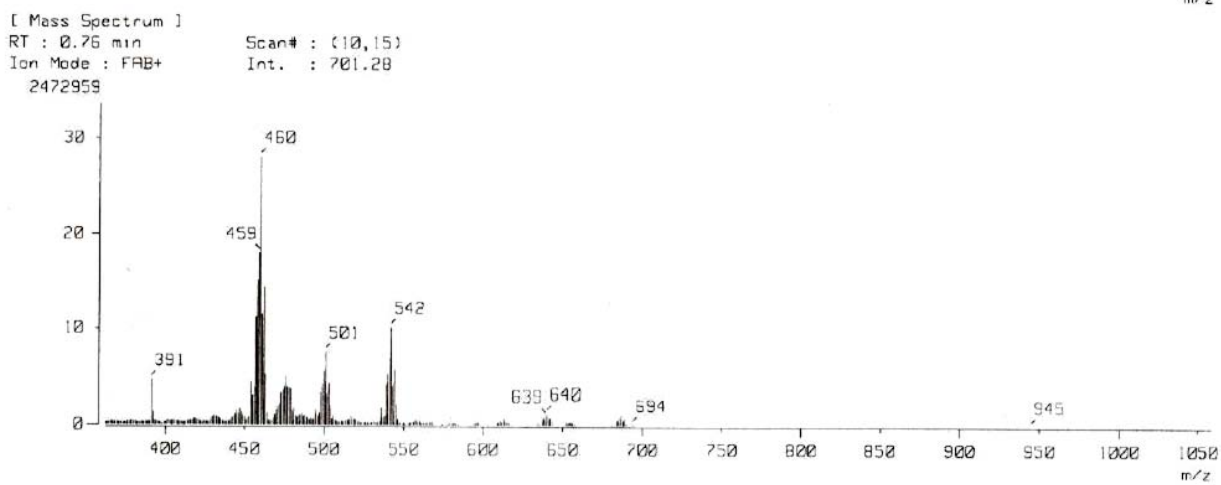
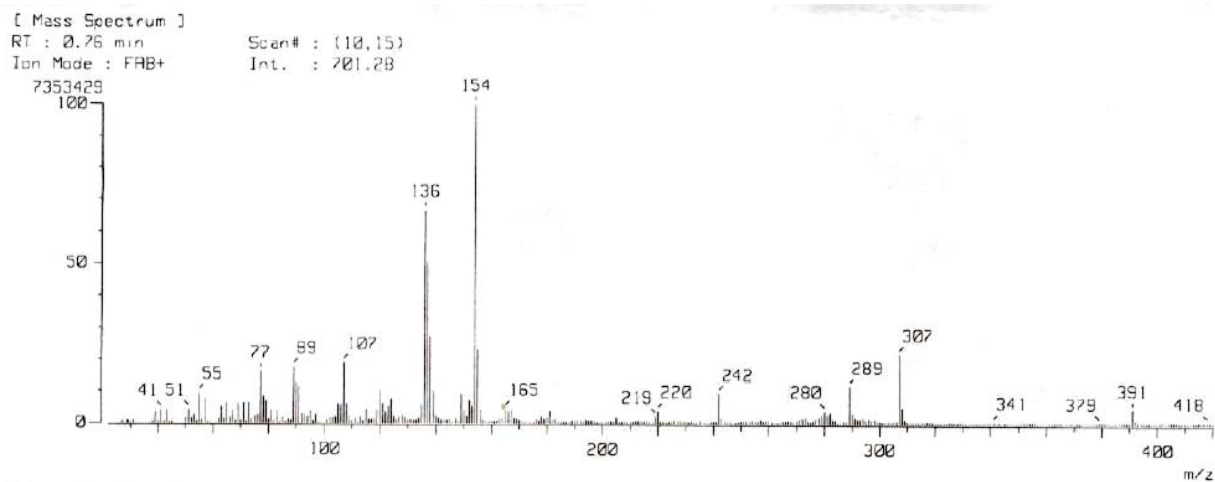
Espectro 16. IR ($\nu = \text{cm}^{-1}$, pastilla/ KBr) del compuesto **4**.



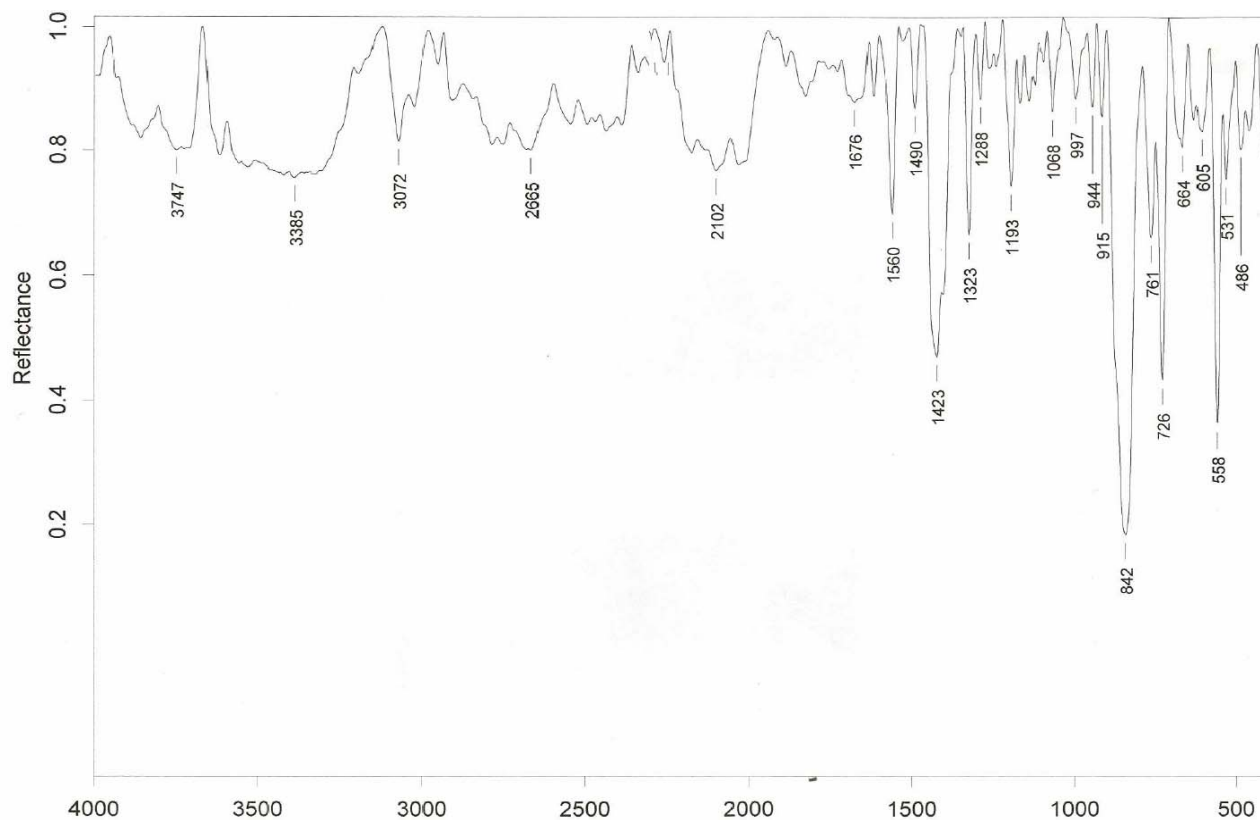
Espectro 17. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del compuesto 5.



Espectro 18. RMN ^1H [CD_3CN , 300.5311 MHz, δ (ppm)] del compuesto 5.



Espectro 19. Espectrometría de masas (FAB⁺) del compuesto 5.



Espectro 20. IR ($\nu = \text{cm}^{-1}$, pastilla/ KBr) del **compuesto 5**.