



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Estudio estructural, magnético y catalítico de sistemas
polinucleares de Cu con ligantes derivados
de imidazoles y aminoácidos**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Edgar Enrique Mijangos Aranda



TUTOR: Dra. Laura Ma. Gasque S.

AÑO: 2008



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	Dra. María de Jesús Rosales Hoz
Primer vocal	Dra. Silvia Elena Castillo Blum
Segundo vocal	Dr. Cecilio Álvarez Toledano
Tercer vocal	Dr. Juan Padilla Noriega
Secretario	Dr. Armando Cabrera Ortíz
Primer suplente	Dr. Alberto Rojas Hernández
Segundo suplente	Dr. Armando Marín Becerra

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 216, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM.

Asesora



Dra. Laura Ma. Gasque Silva

Sustentante



Q. Edgar E. Mijangos Aranda

*Como todo, como siempre,
por Él y para Él.*

A mis padres.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química y a la División de Estudios de Posgrado.

A la Dra. Laura Gasque, por todo su apoyo, enseñanzas, cariño y amistad.

Al Dr. Jan Reedijk, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo del cual aprendí tanto.

A la M. en C. Lucero González, con mucho cariño, por todas las discusiones y aprendizaje de diversas técnicas a lo largo de estos años.

Al Dr. Gibrán Pérez por su amistad y apoyo en la manutención y alojamiento.

Al Dr. Patrick Gamez y a todos los miembros del grupo CBAC de la Universidad de Leiden, Holanda, con especial agradecimiento al Dr. Christophe Boldron y al Dr. Manuel Quesada.

A mis compañeros del laboratorio 216, Lucero González, Ana Sosa, Ingrid Membrillo, Inés Monte, María Rosa Mendoza, Iván Tubert, Fabiola Barrios, Sergio Granados y Rosana Ferrari, por todo lo que he aprendido de cada uno.

A la Dra. Silvia Castillo y al Dr. Gerardo Ferrer por su apoyo en la elaboración de los experimentos de la actividad catalítica.

Al Dr. Guillermo Mendoza, por los estudios de RMN realizados en la universidad de Guanajuato.

A todo el personal de la USAI, en especial a la M. en C. Rosa I. del Villar.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias durante la revisión de este escrito.

Al CONACYT y a la DGEP por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Al PAPIIT por el apoyo otorgado al proyecto IN106003.

Parte del presente trabajo se presento en los siguientes foros:

“International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry”. Royal Society of Chemistry, Gales. Junio de **2001**.

“7th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry”. Royal Society of Chemistry, Guanajuato. Abril de **2003**.

“Dalton Discussion 5 – Ligand Design for Functional Complexes”. Royal Society of Chemistry, Holand. Abril de **2003**.

“36th International Conference on Coordination Chemistry” Mérida, México, Julio de **2004**.

“2° Encuentro de Química Inorgánica” Pachuca, México, Junio de **2005**.

“12th International conference on Biological Inorganic Chemistry” Ann Arbor, Michigan, USA, Agosto de **2005**.

Parte del presente trabajo fue publicado en las siguientes revistas:

L. Gasque, E. Mijangos y L. Ortiz-Frade, *Acta Cryst.* E61: M673-M676 **2005**.

L. Gasque, E. Mijangos y S. Bernès, *Acta Cryst.* E61: O284-O286 **2005**.

E. Mijangos, J. Reedijk y L. Gasque, *Dalton Trans.*, in press, DOI: 10.1039/b714283h.

L. Gasque, V. M. Ugalde-Saldívar, I. Membrillo, J Olguín, E. Mijangos, S. Bernès y I. González, *J. Inorg. Biochem.* in press, DOI:10.1016/j.jinorgbio.2007.12.032.

E. Mijangos, J. Sánchez Costa, O. Roubeau, S. J. Teat, P. Gamez, J. Reedijk y L. Gasque, *Cryst. Growth Des.*, Submitted.

Índice

Índice	xi
Abreviaturas y símbolos	xv
Resumen	xix
Abstract	xx
Introducción	xxi
1 Antecedentes	1
1.1 Metaloproteínas de cobre	1
1.2 Catecol oxidasa: estructura y función	8
1.2.1 Generalidades	8
1.2.2 Estructuras del sitio activo	9
1.2.2.1 Estado <i>met</i> ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$)	9
1.2.2.2 Estado reducido <i>deoxy</i> ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$)	10
1.2.2.3 El aducto de la catecol oxidasa con el inhibidor feniltiourea	11
1.2.3 Mecanismo enzimático de reacción	12
1.3 Sistemas modelo de la catecol oxidasa	18
1.3.1 Reseña histórica	18
1.3.2 Estudios mecanísticos: diferentes aproximaciones	22
1.3.2.1 General	22
1.3.2.2 Coordinación del sustrato	23
1.3.2.3 Relación estructura-reactividad	26
1.3.2.3.1 Distancia metal-metal <i>vs</i> actividad catecolasa	26
1.3.2.3.2 Propiedades electroquímicas <i>vs</i> actividad catecolasa	27
1.3.2.3.3 Influencia de ligantes exógenos en la actividad catecolasa	30
1.3.2.3.4 Influencia de la estructura de los ligantes en la actividad catecolasa	32
1.3.2.3.5 Influencia del pH en la actividad catecolasa	34
1.3.3 Nuestro grupo de trabajo	36
1.3.3.1 Ligantes	36
1.3.3.2 Complejos	37

2	Objetivos	41
2.1	Objetivo general	41
2.2	Objetivos particulares	41
3	Hipótesis y alcances	43
3.1	Hipótesis	43
3.2	Alcances del trabajo	43
4	Resultados y discusión	45
4.1	Síntesis y caracterización de los ligantes	45
4.1.1	Ligante H ₆ <i>Alabiim</i>	46
4.1.1.1	Análisis elemental	46
4.1.1.2	Espectroscopia infrarroja	47
4.1.1.3	Espectroscopia de RMN ¹ H y experimento COSY	48
4.1.1.4	Espectroscopia de RMN ¹³ C y experimento HETCOR	49
4.1.1.5	Espectrometría de masas	52
4.1.2	Ligante H ₆ <i>Valbiim</i>	53
4.1.2.1	Análisis elemental	53
4.1.2.2	Espectroscopia infrarroja	54
4.1.2.3	Espectroscopia de RMN ¹ H y experimento COSY	54
4.1.2.4	Espectroscopia de RMN ¹³ C y experimento HETCOR	56
4.1.3	Ligantes H ₆ <i>Metbiim</i> y H ₆ <i>Fenbiim</i>	58
4.1.3.1	Análisis elemental	59
4.1.3.2	Espectroscopia infrarroja	59
4.1.3.3	Espectroscopia de RMN ¹ H y ¹³ C	60
4.2	Síntesis y caracterización de los complejos polinucleares de Cu(II)	63
4.2.1	Síntesis	63
4.2.1.1	[Cu ₄ (H ₂ <i>Valbiim</i>)(H ₂ O) ₁₀](BF ₄) ₄ • 6H ₂ O (1)	64
4.2.1.2	[Cu ₄ (<i>Valbiim</i>)(μ-OH) ₂ (H ₂ O) ₄] • 5H ₂ O (2)	65
4.2.1.3	Bu ₄ N [Cu ₄ (<i>Valbiim</i>)(μ-OH) ₂ (OH)(H ₂ O) ₃] • 5H ₂ O (3)	66
4.2.2	Caracterización	67
4.2.2.1	Análisis elemental	67
4.2.2.2	Espectroscopia infrarroja	68
4.2.2.3	Refractancia difusa	69
4.2.2.4	Resonancia paramagnética electrónica	70
4.2.2.5	Susceptibilidad magnética	71

4.2.3	[Cu ₃ (H <i>Valbim</i>)(μ-OH)(H ₂ O)] • 4H ₂ O (4)	72
4.2.3.1	Síntesis	72
4.2.3.2	Caracterización	72
4.2.3.2.1	Análisis elemental	72
4.2.3.2.2	Reflectancia difusa	73
4.2.3.2.3	Resonancia paramagnética electrónica	73
4.2.3.2.4	Difracción de rayos-X (EXAFS)	74
4.2.3.2.5	Propiedades magnéticas (MAGSUS)	81
4.3	Estudios en disolución	85
4.3.1	Constantes de equilibrio	85
4.3.1.1	Constantes de acidez (pK _a s)	85
4.3.1.2	Asignación de las constantes de acidez	90
4.3.1.3	Constantes de formación (log β)	93
4.3.2	Estudios magnéticos	103
4.3.2.1	EPR en disolución congelada	103
4.3.3	Estudios de la actividad catalítica	113
4.3.3.1	Dependencia de la velocidad en la concentración del catalizador	114
4.3.3.2	Dependencia de la velocidad en el pH	116
4.3.3.3	Dependencia de la velocidad en la concentración del sustrato	118
4.3.3.4	Efecto del disolvente en la actividad catalítica	127
4.3.3.5	Comparación con sistemas reportados	130
5	Conclusiones y perspectivas	139
5.1	Conclusiones	139
5.2	Perspectivas	141
6	Sección experimental	143
6.1	Reactivos	143
6.2	Equipos	145
6.3	Síntesis	147
6.4	Difracción de rayos-X	152
6.5	Constantes de equilibrio	154
6.6	Estudios de EPR	158
6.7	Actividad catalítica	159
7	Referencias	165

Abreviaturas

y símbolos

H_n <i>Alabiim</i>	Distintos estados de protonación del ligante 4,5-(L-alanina- <i>N</i> -metil)-2-(4,5-(L-alanina- <i>N</i> -metil)-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol (H_6 <i>Alabiim</i>)
$[Cu_4(H_m$ <i>Alabiim</i>)]	Complejos tetranucleares con el ligante <i>Alabiim</i> en disolución acuosa
H_n <i>Valbiim</i>	Distintos estados de protonación del ligante 4,5-(L-valina- <i>N</i> -metil)-2-(4,5-(L-valina- <i>N</i> -metil)-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol (H_6 <i>Valbiim</i>)
$[Cu_4(H_m$ <i>Valbiim</i>)]	Complejos tetranucleares con el ligante <i>Valbiim</i> en disolución acuosa
H_n <i>Metbiim</i>	Distintos estados de protonación del ligante 4,5-(L-metionina- <i>N</i> -metil)-2-(4,5-(L-metionina- <i>N</i> -metil)-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol (H_6 <i>Metbiim</i>)
$[Cu_4(H_m$ <i>Metbiim</i>)]	Complejos tetranucleares con el ligante <i>Metbiim</i> en disolución acuosa
H_n <i>Fenbiim</i>	Distintos estados de protonación del ligante 4,5-(L-fenilalanina- <i>N</i> -metil)-2-(4,5-(L-fenilalanina- <i>N</i> -metil)-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol (H_6 <i>Fenbiim</i>)
$[Cu_4(H_m$ <i>Fenbiim</i>)]	Complejos tetranucleares con el ligante <i>Fenbiim</i> en disolución acuosa

k_B	Constante de Boltzmann
N	Número de Avogadro
μ_B	Magnetón de Bohr
g	Constante giromagnética
A	Constante de desdoblamiento hiperfino
TIP	Paramagnetismo independiente de la temperatura
MB	Magnetones de Bohr
J	Constante de acoplamiento
ϵ_0	Absortividad molar
KDa	Kilodaltones
v_0	Velocidad inicial
δ	Desplazamiento químico
$\log \beta$	Logaritmo de la constante de formación acumulativa
pK_a	Menos logaritmo de la constante de acidez
TCLM	Transferencia de carga ligante-metal
V_{max}	Velocidad máxima
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis
[Cat]	Concentración de catalizador
[Sust]	Concentración de sustrato
COx	Catecol oxidasa
met	Estado nativo de la catecol oxidasa (Cu ^{II} Cu ^{II})
desoxy	Forma reducida de la catecol oxidasa (Cu ^I Cu ^I)
oxy	Estado oxidado de la catecol oxidasa (Cu ^{II} Cu ^{II}) con un grupo peroxo puente $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$
PTU	Feniltiourea
H₂DTBC	3,5-Di- <i>tert</i> -butilcatecol
DTBQ	3,5-Di- <i>tert</i> -butil- <i>o</i> -benzoquinona

TCC	Tetraclorocatecol
TMS	Tetrametil silano
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'(2-etanosulfónico)
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
COSY	Experimento de correlación de desplazamiento químico homonuclear H-H
HETCOR	Experimento de correlación de desplazamiento químico heteronuclear C-H
XANES	X-ray absorption near edge structure
EXAFS	Extended X-ray absorption fine structure
DPPH	Radical 1,1'-difenil-2-picrilhidrazil (g = 2.0036)
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visible
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
TGA	Análisis termogravimétrico
IR	Espectroscopia de infrarrojo
MAGSUS	Estudio de susceptibilidad magnética en función de la temperatura
EPR	Resonancia paramagnética electrónica

Resumen

En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización por métodos químicos y espectroscópicos de cuatro ligantes potencialmente dodecadentados N_8O_4 obtenidos a partir de 2,2'-bisimidazol y L-aminoácidos y de sus respectivos complejos polinucleares de cobre(II) en diferentes estados de protonación. Los extensos estudios realizados en disolución revelan que el aumento del pH del medio conlleva a la formación sucesiva de puentes imidazolato ($pK_a^{(1)}$ y $pK_a^{(2)}$) e hidroxilo ($pK_a^{(3)}$ y $pK_a^{(4)}$). El estudio de EPR en disolución muestra que al aumentar la basicidad de la disolución se observa un decremento de la intensidad de la señal hasta llegar a un espectro de EPR silencioso. La actividad catalítica de la oxidación del 3,5-di-*tert*-butilcatecol a su respectiva quinona se estudio usando espectroscopia UV-Vis-NIR en mezclas CH_3N/H_2O y en CH_3OH/H_2O a pH = 7.5, 8.0 y 8.5. Los estudios mostraron un marcado incremento en la actividad a pH = 8.5 en ambas mezclas de disolventes, lo que coincide con la formación de las especies con grupos OH puente, siendo significativamente mayor la actividad catalítica en MeOH/H₂O. El ligante derivado de L-valina presenta un auto-ensamble con iones de cobre(II), llevando a la formación de una *M*-hélice infinita ópticamente pura, la cual fue caracterizada por difracción de rayos-X y estudios magnéticos.

Abstract

Four potentially dodecadentate N_8O_4 -donor ligands obtained from 2,2'-biimidazole and L-amino acids and its polynuclear Cu(II) complexes in different degrees of protonation were synthesized and characterized by chemical and spectroscopic methods. The extensive solution studies performed reveal that the rise in pH media leads successively to the formation of imidazolato ($pK_a^{(1)}$ and $pK_a^{(2)}$) and hydroxido ($pK_a^{(3)}$ and $pK_a^{(4)}$) bridges. A frozen solution EPR study shows a decrease in the signal intensity until an EPR silent spectrum is observed, upon increasing the basicity of the solution. The catalytic performance of the oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol to its corresponding quinone was studied using UV-Vis-NIR absorption spectroscopic methods in CH_3CN/H_2O and in CH_3OH/H_2O at pH = 7.5, 8.0 and 8.5. A marked increase in activity, consistent with the formation of the hydroxide bridged species, is observed at pH = 8.5 in both solvent mixtures, but the activity is significantly higher in CH_3OH/H_2O . The L-valine-base ligand shows a self-assembly with copper(II) ions leading to an optically pure, infinite *M*-helical chain, which has been characterized by X-ray diffraction analysis and magnetic studies.

Introducción

En años recientes la química inorgánica se ha vuelto un área multidisciplinaria, estrechando lazos con áreas como la química analítica, la bioquímica, la ciencia de los materiales o la fisicoquímica, entre otras. Esta unión ha permitido el desarrollo acelerado de áreas como la química bioinorgánica que han contribuido en gran medida al entendimiento de sistemas complejos como son las metaloproteínas. Estos sistemas conocidos por su alta selectividad y gran poder catalítico son un foco de gran interés, pero debido a su gran complejidad su estudio es complicado. Con el afán de entender más acerca de estos sistemas, la química bioinorgánica ha adoptado como estrategia el estudio de modelos sintéticos de bajo peso molecular, que imiten en cierto grado alguno de los aspectos presentados por las metaloproteínas. Con ello, ha logrado esclarecer algunas de las dudas acerca de las metaloproteínas y a su vez, se han logrado diseñar catalizadores más eficientes.

En el caso particular de las metaloproteínas de cobre, se conocen varios tipos encargados de diversas reacciones, donde destacan las cobre-proteínas del tipo III. Estas metaloproteínas, conocidas por su capacidad de fijar O_2 reversiblemente o emplearlo en reacciones de oxidación de sustratos orgánicos, contienen un sitio activo constituido por dos iones de $Cu(II)$, coordinados a residuos imidazólicos y puenteados entre sí por un grupo hidróxilo. Estas características estructurales han sido empleadas en el diseño de muchos sistemas biomiméticos lo cual ha permitido proponer distintas hipótesis acerca de la influencia de diversos factores en la actividad catalítica.

Hipótesis como las presentadas por Karlin¹ o Kao² acerca de la importancia de una distancia corta $Cu^{II}\cdots Cu^{II}$, o la propuesta de Torelli³ acerca de una correlación entre las propiedades redox de los complejos con su actividad, así como aquellas hechas por Reedijk⁴ en cuanto a la influencia de ligantes exógenos, o las observaciones de Belle⁵ acerca de la importancia de los grupos hidróxido puente en la actividad catalítica, son sólo

ejemplos del basto trabajo realizado en la última década para esclarecer los factores responsables de la actividad catalítica de este tipo de compuestos. Sin embargo, a pesar de todo este trabajo, sigue sin existir una claridad en este tema. Es por ello que el presente trabajo se inscribe en esta labor de esclarecimiento acerca de la influencia de diversos factores en la actividad catalítica.

En síntesis, este trabajo plantea la preparación de un nuevo sistema de ligantes derivados de bisimidazol y aminoácidos, capaces de hospedar hasta cuatro iones de cobre(II) en un ambiente y geometría propicios para la formación de grupos hidróxido puente. Se presenta la caracterización de estos compuestos de coordinación en estado sólido y en disolución, empleando diversas técnicas de análisis. Finalmente, se presentan los estudios de actividad catalítica en la reacción de oxidación del 3,5-di-*tert*-butilcatecol y se analizan los distintos factores que afectan dicha actividad, incluyendo un factor poco estudiado en la literatura actual en esta reacción, como es el efecto del disolvente.

1. Antecedentes

1.1. Metaloproteínas de cobre

Las metaloproteínas que contienen cobre en su sitio activo usualmente se encuentran involucradas como catalizadores redox, tales como transferencia de electrones u oxidación de sustratos orgánicos. En general, se pueden distinguir cuatro funciones principales de estas proteínas: (i) fijación, almacenamiento y transporte de iones metálicos; (ii) transferencia de electrones; (iii) fijación, almacenamiento y transporte de oxígeno; (iv) catálisis.

En un principio, todas las proteínas de cobre fueron clasificadas con base en sus propiedades espectroscópicas, lo que llevó a distinguirlas en tres tipos de sitios activos: tipo I, tipo II y tipo III. Sin embargo, el desarrollo reciente de las técnicas espectroscópicas y cristalográficas ha permitido el descubrimiento de otros tipos de sitios activos de enzimas de cobre. En una clasificación actual⁶ se distinguen siete diferentes tipos de sitios activos en el estado oxidado de las enzimas, cuyos nombres fueron asignados de manera arbitraria. Estos siete tipos son descritos brevemente a continuación:

Sitio activo tipo I

Las proteínas de cobre que contienen un sitio activo de tipo I son comúnmente conocidas como proteínas “azules” de cobre debido a su intenso color azul. Esta intensa coloración es causada por una fuerte absorción en 600 nm, que corresponde a una transición de una transferencia de carga ligante-metal (**TCLM**) del azufre de una cisteína hacia el ion de cobre(II)⁷. Estas proteínas participan usualmente en procesos de transferencia de electrones, y sus ejemplos mejor conocidos son la plastocianina y la

azurina⁸. El sitio activo de tipo I se encuentra también en algunas multicobre oxidasas, las cuales contienen más de un sitio de cobre, como la ascorbato oxidasa y la nitrito reductasa. La esfera de coordinación alrededor del átomo de cobre en los sitios activos de tipo I, está constituida por dos átomos de nitrógeno provenientes de dos residuos de histidina, un átomo de azufre de una cisteína y un átomo de azufre coordinado débilmente, que en la mayoría de los casos, proviene de un residuo de metionina (Figura 1.1). Se conocen algunos casos en los que en lugar de metionina se encuentra glutamina.

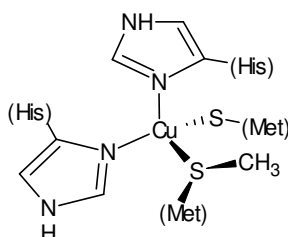


Figura 1.1. Representación esquemática del sitio activo de la plastocianina, una proteína de cobre del tipo I.⁹

Sitio activo tipo II

Las proteínas de cobre que contienen un sitio activo de tipo II son comúnmente conocidas como proteínas de cobre “normales”, nombre basado en sus propiedades en EPR (**R**esonancia **P**aramagnética **E**lectrónica) las cuales son similares a las presentadas por compuestos comunes de Cu(II) que contienen un cromóforo N, O con geometría tetragonal. La esfera de coordinación del átomo de cobre en estas proteínas está constituida por cuatro átomos de N y/u O en una geometría cuadrada o tetragonal distorsionada (con moléculas de agua en las posiciones axiales)^{10, 11}. Entre algunas de las enzimas que contienen este tipo de sitio activo encontramos a la superóxido dismutasa, la dopamina- β -hidroxilasa, la fenilalanina hidroxilasa y la galactosa oxidasa (Figura 1.2)¹². La mayoría de estas metaloproteínas se encuentran comúnmente involucradas en procesos catalíticos, como la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilación selectiva de sustratos aromáticos, activación del enlace C-H de sustratos benzóicos y oxidación de alcoholes primarios.

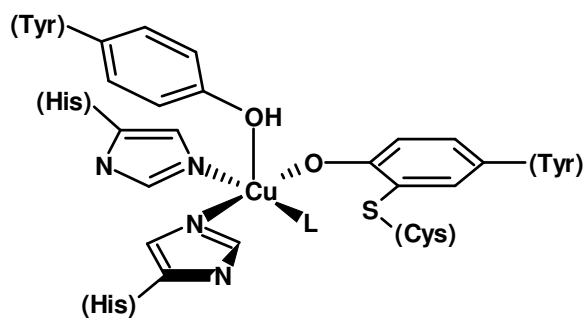


Figura 1.2. Representación esquemática del sitio activo de la galactosa oxidasa, una proteína de cobre del tipo II.¹³

Sitio activo tipo III

Las proteínas de cobre que contienen un sitio activo de tipo III son comúnmente conocidas como proteínas de cobre “silenciosas” en EPR. Este grupo es representado por tres enzimas, la hemocianina, la tirosinasa y la catecol oxidasa. El sitio activo de estas enzimas está constituido por un centro dimetálico de cobre, en el cual ambos iones metálicos se encuentran coordinados por tres átomos de N provenientes de residuos de histidina.¹⁰ Uno de los rasgos más característicos de estas proteínas es su capacidad de fijar O₂ reversiblemente o emplearlo en reacciones de oxidación bajo condiciones ambientales. La hemocianina (Figura 1.3) es responsable del transporte de oxígeno en algunos moluscos y artrópodos, mientras que la tirosinasa y la catecol oxidasa utilizan dioxígeno para realizar la oxidación de sustratos fenólicos a catecoles (tirosinasa) con la subsiguiente oxidación a *o*-quinonas (tirosinasa y catecol oxidasa), lo que lleva posteriormente a la polimerización de estos productos para la formación de la melanina. En el estado *oxy* de la enzima, ambos átomos de cobre se encuentran fuertemente acoplados antiferromagnéticamente, lo que da un comportamiento silencioso en EPR de donde deriva su nombre. Por el momento se han determinado las estructuras cristalinas de la hemocianina¹⁴ y de la catecol oxidasa¹⁵, mientras que la estructura de la tirosinasa se desconoce todavía.

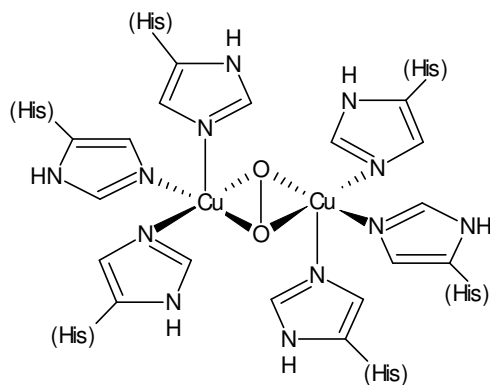


Figura 1.3. Representación esquemática del sitio activo de la oxy hemocianina, una proteína de cobre del tipo III.¹⁴

Sitio activo tipo IV

El sitio activo en las proteínas de tipo IV está constituido, usualmente, por un sitio activo tipo II y uno tipo III, formando un sitio trinuclear. En algunos casos, estas proteínas también incluyen uno o más sitios activos tipo I y son catalogadas como multicobre oxidasas u oxidasas azules.¹⁰ El cúmulo trinuclear se encuentra conectado al sitio tipo I a través de una vía de transferencia electrónica formada por residuos de Cys-His. Algunos ejemplos de este tipo de proteínas son la laccasa (polifenol oxidasa),¹⁶⁻¹⁸ la ascorbato oxidasa (Figura 1.4)¹⁹ y la ceruloplasmina,²⁰ la cual cataliza una amplia gama de oxidaciones de sustratos orgánicos.

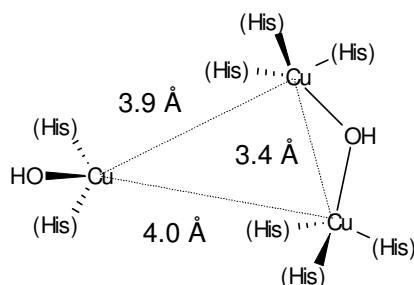


Figura 1.4. Representación esquemática del sitio activo de la ascorbato oxidasa, una proteína de cobre del tipo IV (o sitio multicobre).¹⁹

Recientemente, Lieberman y Rosenzweig²¹ publicaron la estructura cristalina de la metano oxigenasa con una resolución de 2.8 Å; esta enzima es encontrada en metamórfos, bacterias que catalizan la transformación de metano a metanol. En la estructura de la enzima se encontraron tres centros de cobre: un centro mononuclear parecido a un sitio activo tipo II y un sitio inusual, refinado como un sitio dinuclear con una distancia Cu...Cu muy corta de 2.6 Å (Figura 1.5). En comparación con otras multicobre oxidasas, el sitio mononuclear se encuentra a una distancia de 21 Å del sitio dinuclear. Por el momento no está claro el estado de oxidación de los tres átomos de cobre, pero se cree que el centro mononuclear es un centro típico tipo II por la señal de EPR encontrada. Sin embargo la presencia de Cu¹⁺ en la estructura cristalina fue confirmada por espectroscopia XANES (X-ray Absorption Near Edge Spectra), la cual sugiere que en el sitio dinuclear al menos uno o ambos iones de cobre tienen estado de oxidación 1+.

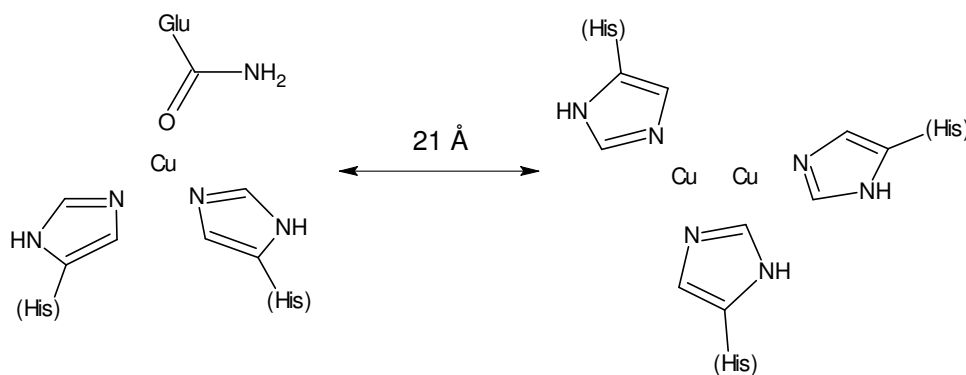


Figura 1.5. Representación esquemática del sitio activo de la metano monooxigenasa, una proteína de cobre del tipo IV (sitio multicobre).²¹

Sitio activo Cu_A

El sitio activo Cu_A también es conocido como sitio activo de cobre de valencia mixta. Éste contiene un centro dinuclear de cobre en el cual, en promedio, los iones metálicos tienen una carga de 1.5+ en el estado oxidado. Ambos iones de cobre se encuentran en una geometría tetraédrica y están puenteados por dos grupos tiolato de dos residuos de cisteína. Cada ion de cobre también se encuentra coordinado por un átomo de

nitrógeno proveniente de un residuo de histidina. Este sitio exhibe un patrón característico de siete líneas en espectroscopia de EPR y tiene una coloración morada. Su función es la transferencia electrónica a larga distancia, y este sitio puede ser encontrado, por ejemplo, en la citocromo *c* oxidasa²²⁻²⁴ y la óxido de nitrógeno reductasa²⁵ (Figura 1.6).

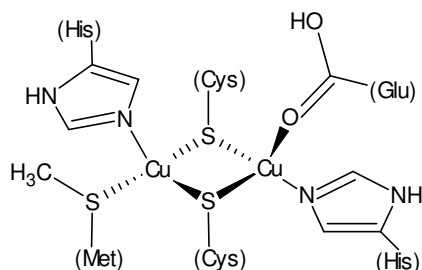


Figura 1.6. Representación esquemática del sitio activo de la óxido de nitrógeno reductasa, una proteína de cobre del tipo Cu_A .²⁵

Sitio activo Cu_B

El sitio activo Cu_B fue detectado cerca de un centro de hierro en la citocromo *c* oxidasa²⁶ (Figura 1.7). En este sitio, un ion de cobre se encuentra coordinado por tres residuos de histidina en una geometría de pirámide trigonal, con el cuarto sitio de coordinación desocupado. Esta posición vacante en la esfera de coordinación del ion de cobre apunta directamente a la posición vacante en la esfera de coordinación del ion de hierro en el grupo hemo. Los dos iones metálicos se encuentran fuertemente acoplados antiferromagnéticamente en el estado oxidado de la enzima. Se encontró que la distancia entre los iones de cobre y hierro es de 5.3 Å en la *Paracoccus denitrificans* y de 4.5 Å en la citocromo *c* oxidasa de corazón de bovino. La función del sitio Cu_B es la reducción de dioxígeno a agua por la transferencia de cuatro electrones.

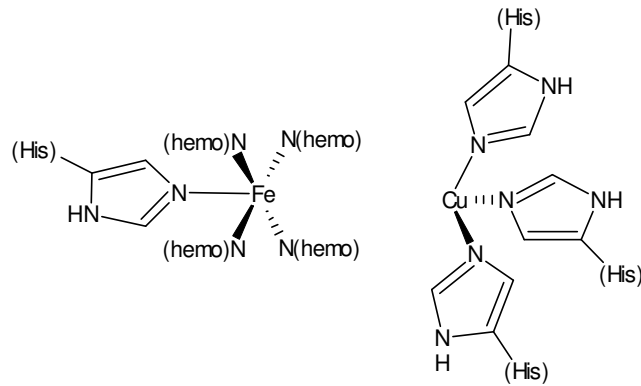


Figura 1.7. Representación esquemática del sitio activo de la citocromo c oxidasa, una proteína de cobre del tipo Cu_B .²⁶

Sitio activo Cu_Z

El sitio activo Cu_Z está constituido por cuatro iones de cobre en un arreglo tetraédrico distorsionado y coordinados por siete residuos de histidina y un grupo hidróxido. Este sitio fue detectado en la óxido de nitrógeno reductasa (Figura 1.8) y está involucrado en la reducción de N_2O a N_2 . Las estructuras cristalinas de la óxido de nitrógeno reductasa para *Pseudomonas nautica* y *Paracoccus denitrificans* fueron resueltas con una resolución de 2.4 Å y 1.6 Å, respectivamente.^{27, 28} Los iones de cobre en el cúmulo tetranuclear se encuentran puenteados por un ion sulfuro inorgánico,²⁷ el cual, hasta hace poco, se creía que era un ion hidroxilo. La distancia entre los iones metálicos Cu_2-Cu_4 y Cu_2-Cu_3 es muy corta (2.5-2.6 Å) por lo que puede ser vista como un enlace metal-metal, mientras que la distancia con el otro núcleo de cobre es sustancialmente mayor (3.0-3.4 Å).²⁷ Tres de estos iones de cobre están coordinados por dos residuos de histidina, mientras que el cuarto se encuentra coordinado sólo por uno, formando así el sitio de enlace con el sustrato. El estado de oxidación de los iones metálicos en el estado oxidado no es claro aún, ya que los patrones de EPR para este sitio se pueden explicar de dos maneras diferentes, por ejemplo, $Cu^I Cu^I Cu^I Cu^I$ y $Cu^I Cu^I Cu^II Cu^II$, ambos resultando en el patrón de cuatro líneas observado.

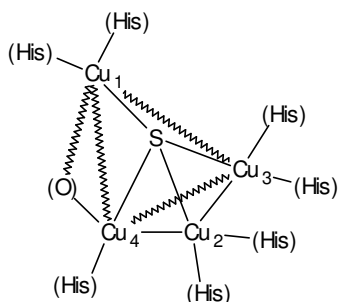


Figura 1.8. Representación esquemática del sitio activo de la óxido de nitrógeno reductasa de *Pseudomonas nautica*, una proteína de cobre del tipo Cu_2 .²⁷

1.2. Catecol oxidasa: estructura y función

1.2.1 Generalidades

La catecol oxidasa (COx) es una enzima que contiene un sitio activo tipo III que cataliza la oxidación de una amplia gama de *o*-difenoles (catecoles), como el ácido caféico, a sus correspondientes quinonas en un proceso conocido como actividad catecolasa. Estas quinonas llevan a cabo una auto-polimerización llevando a la formación de pigmentos cafés constituidos por polifenoles, por ejemplo la melanina, proceso que se cree sirve para proteger el tejido dañado contra agentes patógenos e insectos.²⁹ Las COx son encontradas en tejidos de plantas y crustáceos. En el año de 1937 fue aislada por primera vez una COx.³⁰ Subsecuentemente, se han purificado COx de una amplia gama de frutas y vegetales (*e.g.* papa, espinaca, manzana, frambuesa),³⁰ sin embargo la pureza alcanzada no es siempre satisfactoria debido a la gran cantidad de isómeros y conformeros, por lo que continuamente se trabaja en mejorar los protocolos de purificación.³⁰

El peso molecular de las COx varía dependiendo del tejido y la fuente de extracción. Se pueden encontrar dos intervalos de peso molecular, incluso en la misma muestra: uno en el intervalo de 38-45 KDa, y otro en el intervalo de 55-60 KDa.³¹ También se han encontrado enzimas con pesos moleculares alrededor de 30 KDa, pero se cree que son derivadas de una proteólisis en el proceso de purificación.

En 1998, Krebs y colaboradores publicaron la estructura cristalina de la catecol oxidasa aislada de *Ipomoea batatas* (camote) en tres estados catalíticos: el estado nativo *met* ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$), el forma reducida *desoxy* ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$), y en un complejo con el inhibidor feniltiourea (PTU).¹⁵

1.2.2 Estructuras del sitio activo

1.2.2.1 Estado *met* ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$)

En el estado nativo *met* los dos iones de cobre se encuentran a una distancia de 2.9 Å. En la estructura del estado *met* se determinó, además de seis residuos de histidina, un ion hidroxilo puente el cual se encuentra a una distancia muy corta de los iones metálicos (CuA-O 1.9 Å y CuB-O 1.8 Å), completando la esfera de coordinación de éstos en una geometría de pirámide trigonal. Estos descubrimientos están de acuerdo con los datos obtenidos de EXAFS para las COx oxidadas de *Lycopus europaeus* y *Ipomoea batatas*, confirmando la presencia de cuatro átomos donadores por N/O y una distancia $\text{Cu}^{\text{II}}\cdots\text{Cu}^{\text{II}}$ de 2.9 Å en ambas enzimas.^{32, 33} La posición apical se encuentra ocupada por los residuos His109 y His240 para el CuA y CuB, respectivamente (Figura 1.9). Los datos de EPR revelan un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los iones de cobre, por lo que se propuso la presencia del puente OH^- entre los átomos de cobre en el estado *met* de la enzima.

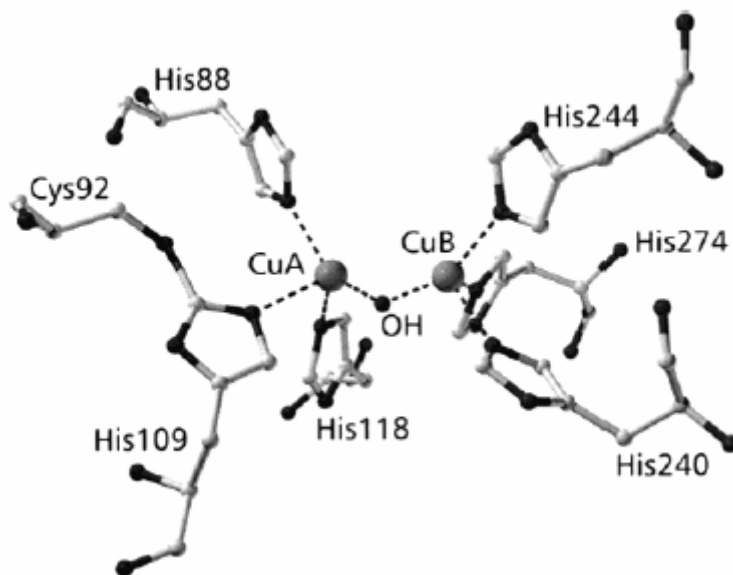


Figura 1.9. Esfera de coordinación del centro dinuclear de cobre(II) en el estado met de la catecol oxidasa.³¹

1.2.2.2 Estado reducido *desoxy* ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$)

En la reducción de los centros de cobre(II) al estado de oxidación 1+, la distancia entre ellos aumenta a 4.4 Å, mientras que los residuos de histidina sólo se mueven ligeramente y no se encuentran cambios significativos en el resto de los residuos de la proteína.¹⁵ Con base en el mapa de densidad electrónica residual, se propone la presencia de una molécula de agua colocada a una distancia de 2.2 Å del ion de CuA. Así, la esfera de coordinación alrededor del ion de CuA es de una pirámide trigonal distorsionada, con los tres nitrógenos de los residuos de histidina en el plano base, mientras que la esfera de coordinación del CuB es mejor descrita como un plano cuadrado con un sitio de coordinación vacante.

1.2.2.3 El aducto de la catecol oxidasa con el inhibidor feniltiourea

La feniltiourea (PTU) se une a la catecol oxidasa reemplazando el puente hidroxilo presente en el estado *met*. El átomo de azufre de la PTU se coordina a ambos iones de cobre(II), incrementando la distancia entre ellos a 4.2 Å (Figura 1.10). El átomo de nitrógeno interactúa débilmente con el centro de CuB (distancia Cu-N de 2.6 Å), completando su geometría de pirámide de base cuadrada. El centro dimetálico se encuentra en medio de un arreglo hidrofóbico constituido por los residuos de los aminoácidos Ile241, Phe261, His244 y Ala264.¹⁵ Al adicionar la feniltiourea el anillo aromático de la Phe261 y el anillo imidazólico de la His244 presentan un cambio conformacional para formar interacciones hidrofóbicas con el anillo aromático del inhibidor. Estas interacciones de van der Waals contribuyen fuertemente a la gran afinidad de la enzima hacia el inhibidor ($IC_{50} = 43 \mu M$, $K_M = 2.5 mM$ para catecol como sustrato³²).

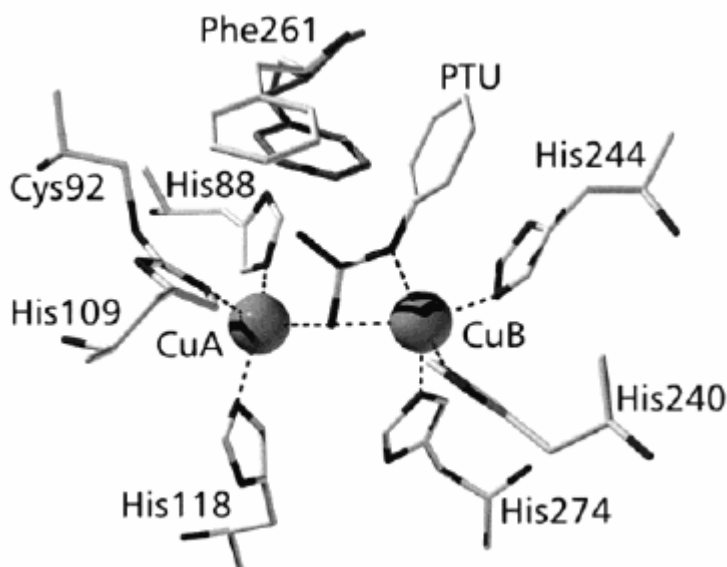


Figura 1.10. Estructura cristalina del complejo inhibidor de la catecol oxidasa con feniltiourea. Se muestra la orientación de la Phe261 en la COx nativa (en color oscuro) para indicar la rotación que presenta en el complejo inhibidor (en color claro).³¹

1.2.3 Mecanismo enzimático de reacción

La enzima catecol oxidasa cataliza la oxidación de *o*-difenoles (catecoles) a sus respectivas quinonas a través de una reducción de cuatro electrones del dioxígeno a agua. Krebs y colaboradores propusieron un mecanismo para el proceso catalítico, basado en datos bioquímicos,^{10, 34} espectroscópicos,³² y estructurales¹⁵ el cual se muestra en la Figura 1.11. El mecanismo comienza con la forma *met* de la catecol oxidasa, la cual es la forma de reposo de la enzima. Ya que el estado *oxy* (ver, Figura 1.13) de la COx se puede obtener sólo después de agregarle H₂O₂, esta forma fue descartada como el estado inicial. En el primer paso una molécula de catecol se desprotona de uno de los grupos hidróxido y se coordina únicamente al Cu_B(II) del estado *met*; esto fue propuesto con base en la estructura de la catecol oxidasa con el inhibidor PTU^{15, 31}. Posteriormente, el centro dimetálico reacciona con el equivalente de catecol, llevando a la formación de un equivalente de quinona y al estado reducido de Cu_A(I)Cu_B(I) de la enzima, llamado estado *desoxy*. Este paso se apoya en la observación de la conversión estequiométrica e inmediata de un equivalente de catecol al ser mezclado con la enzima, sucediendo aún en ausencia de dioxígeno.^{15, 35} Después, una molécula de dioxígeno se une al sitio activo de dicobre(I) reemplazando la molécula de disolvente enlazada al Cu_A en la forma reducida de la enzima, seguido de la coordinación de otra molécula de catecol desprotonado nuevamente al núcleo de Cu_B. La previa coordinación del sustrato al sitio *desoxy* antes de la unión del dioxígeno no parece muy factible, ya que en una titulación del estado reducido de la enzima, libre de O₂, con un exceso alto de catecol no se observó unión del sustrato, lo que reveló una baja afinidad del catecol al sitio de dicobre(I). Datos espectroscópicos de UV-Vis y Raman sugieren que la molécula de dioxígeno se coordina de forma $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ con una distancia Cu...Cu de 3.8 Å, tal como fue determinada por espectroscopia EXAFS.³² La rotación que presenta la cadena de la Phe261 en la enzima abre el centro dimetálico para permitir la unión del catecol. El modo de coordinación del inhibidor PTU sugiere que es posible la unión simultánea del dioxígeno y el catecol. En este complejo ternario COx-O₂²⁻-catecol, se pueden transferir dos electrones del sustrato hacia el grupo peroxo, seguido de la protonación del mismo, la ruptura del enlace O-O, la pérdida de una molécula de agua y la

salida del producto, junto con la restauración del estado *met*, completando el ciclo catalítico.

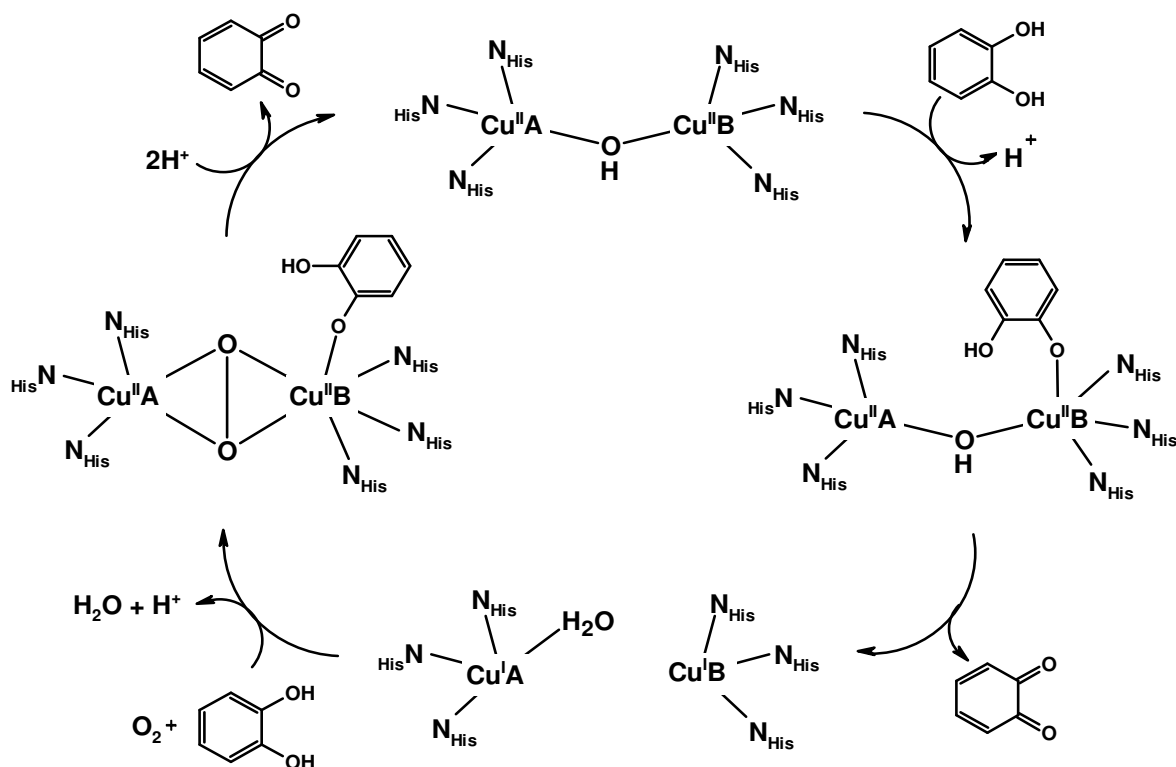


Figura 1.11. Ciclo catalítico de la catecol oxidasa de *Ipomoea batatas* propuesto por Krebs y colaboradores, basados en datos espectroscópicos, estructurales y bioquímicos. Dos moléculas de catecol son oxidadas acompañadas de la reducción de una molécula de dioxígeno a agua.³⁵

Un mecanismo totalmente diferente fue propuesto por Siegbahn,³⁶ el cual aplicó una teoría de funcionales de la densidad híbrida a un estudio mecánico cuántico del ciclo catalítico. De acuerdo con este autor, el creciente número de estudios teóricos³⁷ y experimentales^{38, 39} sugieren que el sitio activo de una enzima, el cual se encuentra profundamente inmerso en un medio de baja constante dieléctrica de la proteína, como se observa en la catecol oxidasa, no debe de cambiar su carga durante el ciclo catalítico. Sin

embargo, en el mecanismo propuesto por Krebs *et al.*, la carga del sitio activo cambia de 3+ en el estado *met* a 1+ en el aducto COx-O₂²⁻-catecol. Según Siegbahn, las propiedades ácido-base de muchos sitios cercanos, permiten que éstos almacenen temporalmente los protones liberados durante el ciclo catalítico. El mecanismo propuesto basado en cálculos de DFT se presenta en la Figura 1.12. El mecanismo comienza con la forma *desoxy* de dicobre(I). Con el fin de mantener una carga total de 1+ durante todo el ciclo catalítico, el autor propone la presencia de un grupo hidroxilo puente entre los dos iones de cobre(I),³⁷ en contraposición a los hallazgos cristalográficos,¹⁵ los cuales sugieren la presencia de una molécula de agua, enlazada asimétricamente a uno solo de los centros metálicos. En la primera etapa, el catecol se une a la forma *desoxy*, transfiriendo un protón al grupo hidroxilo puente con la consecuente generación de una molécula de agua puenteando a los dos átomos de cobre. Posteriormente, una molécula de dióxígeno desplaza a la molécula de agua, enlazándose como radical aniónico superóxido y dando como resultado un compuesto de valencia mixta Cu(II)Cu(I). Entonces el radical superóxido extrae un átomo de hidrógeno (un protón y un electrón) del sustrato enlazado. Para liberar a la molécula de quinona, un electrón es transferido del radical quinona al ion de cobre(II), llevando a la restauración del estado de dicobre(I). El siguiente paso involucra la ruptura del enlace O-O, el cual está acompañado de la transferencia de dos protones (de una nueva molécula de sustrato) y dos electrones (uno del sustrato y otro de uno de los iones de Cu(I)) hacia el grupo peroxo. Todo lo anterior, en conjunto, lleva a la formación de una nueva especie de valencia mixta Cu(II)Cu(I) la cual contiene un radical aniónico quinona. La segunda transferencia electrónica del radical quinona al centro de Cu(II) concluye con la restauración del estado inicial de dicobre(I) puenteado por un grupo hidróxido.

Existe otro mecanismo propuesto para la actividad catecolasa. Este mecanismo fue propuesto por Solomon y colaboradores¹⁰ para la enzima tirosinasa, la cual cataliza, tanto la hidroxilación de monofenoles, llamada actividad cresolasa, como la oxidación de *o*-difenoles (actividad catecolasa). Dado que la estructura de la tirosinasa es aún desconocida, el autor se basa en datos estructurales y electrónicos de la hemocianina,³⁴ la cual presenta propiedades espectroscópicas muy similares a la tirosinasa y de la cual sí se conoce su estructura. El mecanismo propuesto se muestra en la Figura 1.13 y tiene mucha semejanza con el propuesto por Krebs y colaboradores, donde la diferencia principal radica en el tipo de coordinación del sustrato. El punto de partida de este mecanismo es también el estado *met* de la enzima, que es el estado de reposo de la tirosinasa. El primer paso contempla la desprotonación de los dos grupos hidroxilo del catecol y la coordinación de éste a los dos iones de Cu(II) formando un puente catecolato entre ambos. Esta propuesta de coordinación se basa en el hecho de que sólo los *o*-difenoles y no los *m*- o *p*-difenoles son oxidados por la tirosinasa, a pesar de que los *o*- y los *p*-difenoles tienen aproximadamente el mismo potencial de reducción. Esta propuesta también es apoyada en el tipo de coordinación de algunos complejos dinucleares de cobre con tetraclorocatecol. Karlin *et al*¹ publican un compuesto dinuclear de cobre con una molécula de tetraclorocatecol coordinado a los dos iones de cobre en una conformación *syn-syn*. En el segundo paso se contempla la protonación del grupo hidroxilo puente y la transferencia de dos electrones del catecolato al sitio dicobre(II), llevando a la liberación de la quinona y de la molécula de agua dejando el sitio dimetálico en el estado *desoxy*, que a diferencia del propuesto por Krebs, no mantiene la molécula de agua coordinada al Cu_A. Posteriormente, una molécula de dioxígeno se coordina de forma $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ al sitio dinuclear de cobre(I), generando el estado *oxy* de la enzima. A continuación, otra molécula de sustrato desprotonado se coordina nuevamente a ambos átomos de cobre. Finalmente, la transferencia de dos electrones del sustrato hacia el grupo peroxo a través de los núcleos de cobre, lleva a la protonación del grupo peroxo y la ruptura del enlace O-O y la inmediata liberación de la molécula de quinona y una molécula de agua, regenerando así el estado de partida del ciclo.

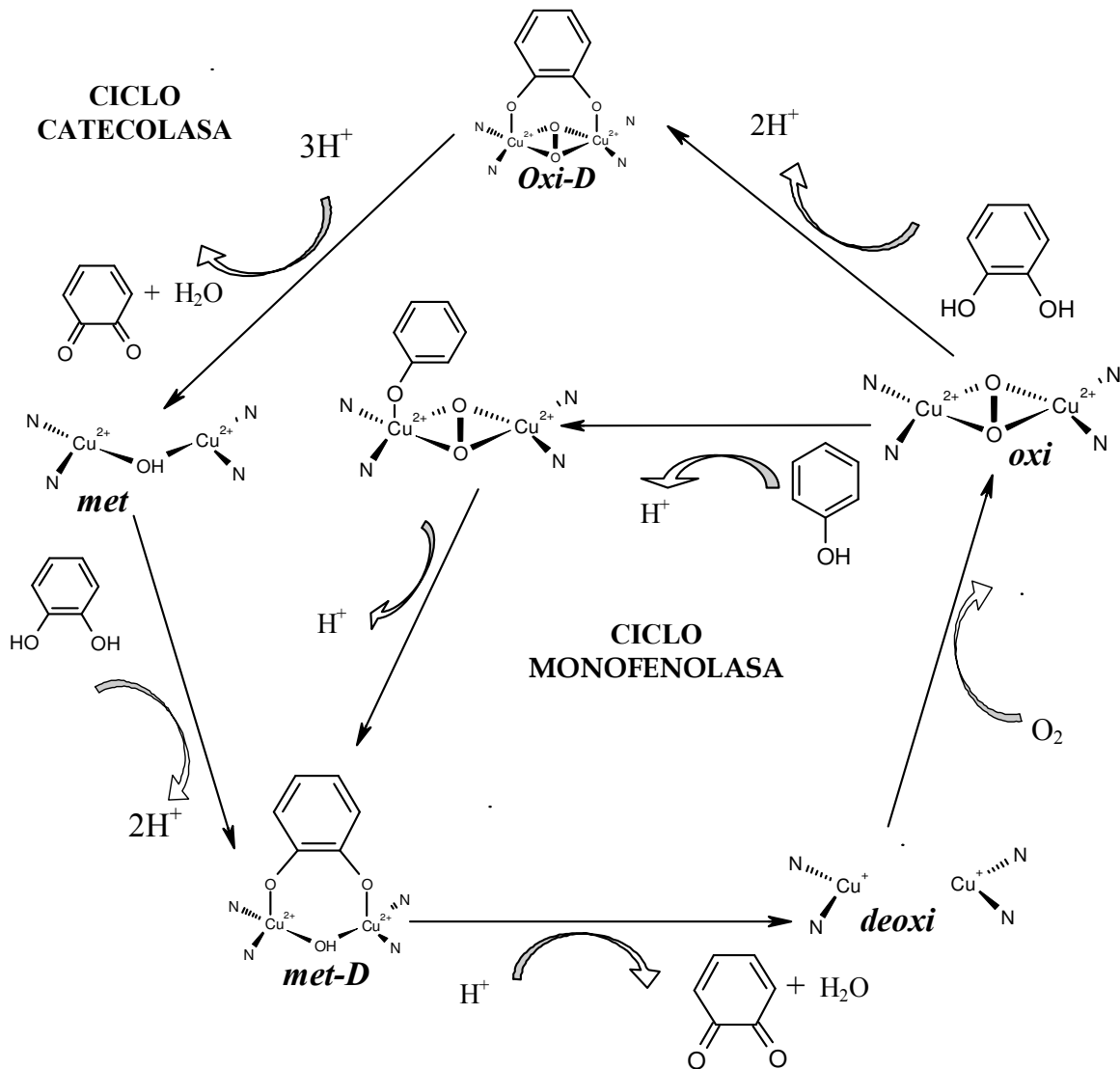


Figura 1.13. Ciclo catalítico de la tirosinasa propuesto por Solomon y colaboradores, basados en datos estructurales y electrónicos de la hemocianina.¹⁰ La tirosinasa cataliza tanto la hidroxilación de monofenoles (actividad cresolasa) como la oxidación de catecoles (actividad catecolasa).

1.3 Sistemas modelo de la catecol oxidasa

1.3.1 Reseña histórica

La capacidad presentada por los complejos de cobre de oxidar fenoles a catecoles se conoce desde hace 40 años. En 1964, Grinstead informa de la oxidación del 3,5-di-*tert*-butilcatecol (H_2DTBC) a su respectiva 3,5-di-*tert*-butil-*o*-benzoquinona ($DTBQ$) con un rendimiento del 55 % en una mezcla acuosa de metanol al 75 % en presencia de 1 % de cloruro de cobre(II).⁴⁰ En 1974, Thuji y Takayanagi informan la ruptura oxidativa del catecol, llevando a la formación del ácido *cis-cis*-mucónico, en una disolución acuosa de cloruro de cobre(I) en presencia de oxígeno molecular.⁴¹ Rogić y Demmin también estudiaron la oxidación de catecol con cloruro de cobre(I) y dióxigeno en varios disolventes.⁴²

Uno de los primeros estudios mecanísticos de la oxidación del catecol con complejos de cobre(II) fue presentado por Lintvent y Thuruya.⁴³ En su estudio de la cinética de reacción del H_2DTBC con dióxigeno catalizada por el complejo bis(1-fenil-1,3,5-hexanotriolato)dicobre(II), los autores mostraron que la reacción global es de primer orden con respecto al sustrato y de segundo orden con respecto al cobre(II), confirmando así, que el intermediario activo que interviene en el paso determinante era una especie dicobre(II)-catecolato. Otro interesante estudio mecanístico es el trabajo presentado por Demmin, Swerdloff y, Rogić⁴⁴ en donde los autores destacan los principales pasos en el proceso catalítico: (i) formación del intermediario dicobre(II)-catecolato; (ii) transferencia electrónica del anillo aromático hacia los dos centros de cobre(II), dando como resultado la formación de la *o*-benzoquinona y dos centros de cobre(I); (iii) reacción irreversible de la especie recién formada de cobre(I) con dióxigeno, formando un aducto dicobre(II)-dióxigeno, y (iv) la reacción de este aducto con catecol, regenerando el intermediario dicobre(II)-catecolato y formando agua como subproducto.

Oishi y colaboradores observaron una mayor actividad de los complejos dinucleares de cobre(II) en comparación a sus análogos mononucleares,⁴⁵ esto confirma la hipótesis previa de Lintvent y Thuruya acerca de la formación del intermediario dicobre(II)-catecolato en el proceso catalítico.⁴³ Además, los autores informan de una oxidación estequiométrica del H₂DTBC en condiciones anaeróbicas para formar la DTBQ por varios de los complejos dinucleares y mononucleares lo cual es consistente con el segundo paso del mecanismo propuesto por Demmin, Swerdloff y, Rogić.⁴⁴ Los autores también hacen otra observación interesante, y es que los complejos mononucleares de cobre(II) planos no pueden ser reducidos por el H₂DTBC y que muestran una actividad catecolasa muy baja en comparación con los complejos no planos, que son más fácilmente reducibles. De este modo, la actividad catalítica parece correlacionar con el potencial de reducción de los complejos. Otra conclusión interesante presentada es que la actividad catalítica de los compuestos dinucleares parece depender de la distancia Cu...Cu; así, los complejos para los cuales se estima una distancia entre los núcleos metálicos mayor a 5 Å, mostraron una actividad catalítica muy baja. Por lo tanto, los autores sugirieron la hipótesis de que la actividad catecolasa está regulada por un reconocimiento espacial entre el centro de dicobre(II) y el sustrato. La mayor actividad presentada por los complejos dinucleares de cobre(II) en comparación a sus análogos mononucleares fue señalada por algunos otros autores, *e.g.* Malachowski⁴⁶ y Casellato *et al.*⁴⁷

En 1985, la hipótesis acerca la formación de un intermediario dicobre(II)-catecolato como estado inicial en la reacción catalítica fue apoyada ampliamente por Karlin y colaboradores,¹ quienes lograron cristalizar el aducto de tetraclorocatecol (TCC) con el complejo dinuclear de cobre(II) con un ligante dinucleante derivado de fenol (Figura 1.14, ver sección 1.3.2.2 para mayor detalle). Sin embargo, casi al mismo tiempo Thompson y Calabrese⁴⁸ proponen que la reacción catalítica procede vía la transferencia de un electrón del catecol hacia el ion de cobre(II), dando como resultado la formación de una semiquinona como especie intermediaria. Los autores prepararon y caracterizaron el complejo bis(3,5-di-*tert*-butil-*o*-semiquinolato) de cobre(II) mediante la reacción de [Cu₂(py)₂(MeO)₂](ClO₄)₂ con H₂DTBC en condiciones anaeróbicas. Interesantemente, no observan la transferencia simultánea de dos electrones formando la DTBQ y dos centros de

cobre(I). Posteriormente, otros autores informaron la formación de la especie semiquinona en el sitio catalítico.⁴⁹⁻⁵¹

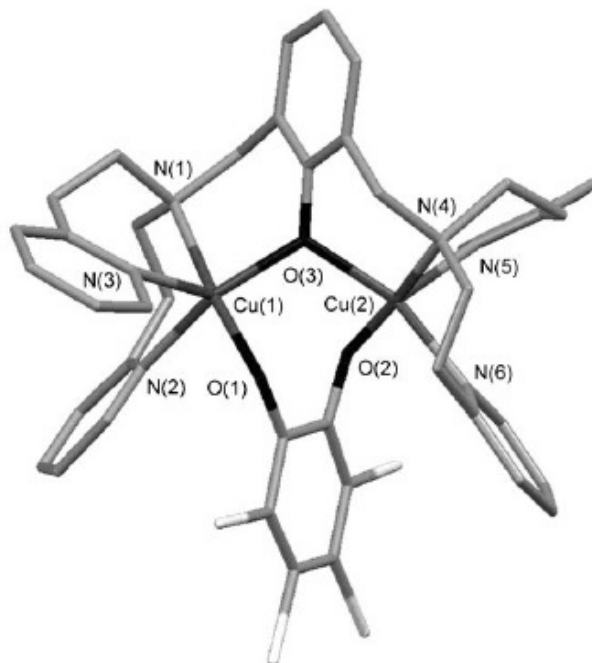
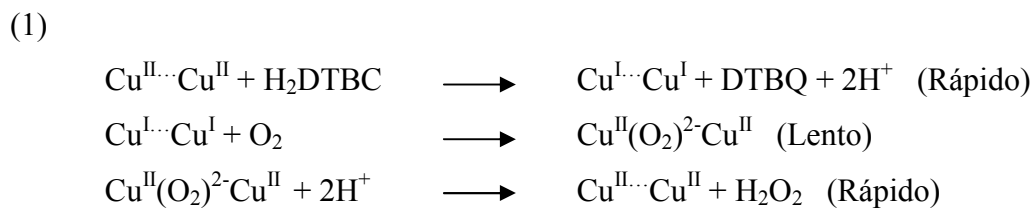


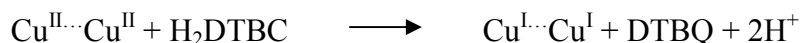
Figura 1.14. Estructura cristalina del complejo cationico $[Cu_2(LO)(TCC)]^+$. LOH: 2,6-bis(N,N-bis(2-metilpiridil)aminometil)fenol. La distancia Cu...Cu es de 3.248 Å.¹

La determinación de la estructura de la hemocianina, otra proteína con el sitio activo de tipo III, en 1989,¹⁴ y los extensos estudios de tirosinasa, impulsaron los estudios extensos de sistemas sintéticos del sitio activo de tipo III y su reactividad. A principios de los años 90, algunos grupos de investigación informaron la formación de peróxido de hidrógeno en vez de agua como producto de la reducción de oxígeno molecular en la oxidación catalítica del H₂DTBC por complejos de cobre(II).^{52, 53} Para explicar sus resultados experimentales, Chyn y Urbach propusieron dos distintos mecanismos para el ciclo catalítico, como se muestra en el Esquema 1.1.⁵³

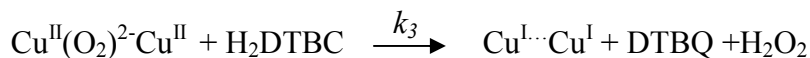
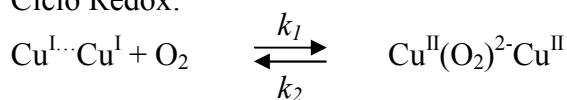


(2)

Paso inicial:

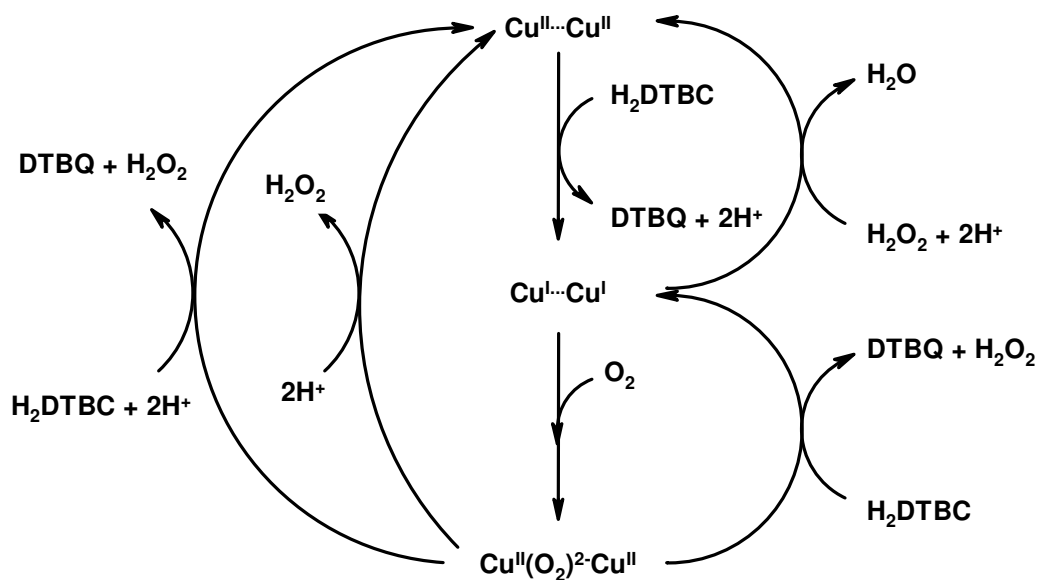


Ciclo Redox:



Esquema 1.1. *Dos posibles mecanismos de reacción en los que se obtiene H_2O_2 como subproducto propuestos por Chyn y Urbach.⁵³*

Rockcliffe y Martell publicaron numerosos estudios sobre la oxidación de catecol por complejos dicobre(II) y peroxo-dicobre(II).⁵⁴⁻⁶⁰ La relación entre la estructura y la reactividad tomó gran interés. Casella y colaboradores publicaron muchos estudios mecanísticos detallados sobre la actividad catecolasa de una serie de compuestos dinucleares de cobre(II) relacionados estructuralmente,⁶¹⁻⁶⁴ donde informan que la reacción catalítica procede vía un mecanismo bifásico, en el cual una reacción estequiométrica rápida entre el centro dicobre(II) con el catecol es seguida de una reacción catalítica lenta. Ellos también agrupan diferentes mecanismos previamente propuestos para la actividad catalítica de complejos de dicobre(II), como se muestra en el Esquema 1.2.



Esquema 1.2. Propuesta de Casella y colaboradores de los posibles mecanismos de reacción del ciclo catalítico de la oxidación de catecol por compuestos dinucleares de cobre(II).⁶⁴

Desafortunadamente, a pesar del gran interés mostrado por este tema y a la gran cantidad de publicaciones referentes a la actividad catalítica de compuestos de cobre(II), los estudios mecanísticos detallados son escasos.^{52, 53, 62, 64-67} Como consecuencia, los mecanismos propuestos por los diferentes autores son a menudo especulativos y en algunas ocasiones controversiales. Además, los diferentes grupos de investigación han diseñado diversos métodos para explorar la actividad catecolasa y estudiar el mecanismo de reacción, lo que hace que los resultados sean difíciles de comparar entre sí.

1.3.2 Estudios mecanísticos: diferentes aproximaciones

1.3.2.1 General

Las aproximaciones empleadas por los diferentes grupos de investigación para estudiar el mecanismo de la actividad catecolasa se pueden dividir en cuatro grupos

principales. El primero estudia el tipo de unión del sustrato al centro metálico. Este grupo incluye la caracterización cristalográfica y/o espectroscópica de aductos de complejos de cobre con catecol(ato) y compuestos estructuralmente relacionados y estudios de la interacción de los complejos con catecol en condiciones anaeróbicas. El interés en este tema es incrementado por la actual disputa acerca del modo de enlace del sustrato en el sitio activo de la catecol oxidasa.^{10, 15, 35}

El segundo grupo incluye estudios de la relación entre la estructura y la reactividad. Este incluye la correlación entre la actividad catecolasa de los complejos con la distancia metal-metal en el centro de cobre(II), sus potenciales redox, propiedades del ligante (propiedades electrónicas, basicidad, impedimento estérico) y la naturaleza del ligante puente entre los dos átomos de cobre. Este grupo también incluye la dependencia de la actividad con el pH, ya que cambios en el pH inducen cambios en la actividad catalítica de los complejos usualmente causados por cambios estructurales en el centro dimetálico.^{2, 68, 69}

La tercera aproximación incluye estudios cinéticos de la reacción catalítica; se estudia la influencia de varios factores (*e.g.* concentración de sustrato, catalizador y dioxígeno, adición de peróxido de hidrógeno, *etc.*) en la rapidez de reacción, y se propone un mecanismo con base en estos datos.^{3, 63, 64, 68-74}

Finalmente, el cuarto grupo incluye ejemplos de oxidación estequiométrica de sustratos por complejos oxo-dicobre o peroxo-dicobre, los cuales son casi siempre propuestos como especies intermediarias en la oxidación catalítica de catecol por compuestos de cobre(II).^{15, 57, 58, 62, 64}

1.3.2.2 Coordinación del sustrato

La Figura 1.15 muestra un compendio de los diversos modos posibles de enlace del catecol a los centros de cobre.

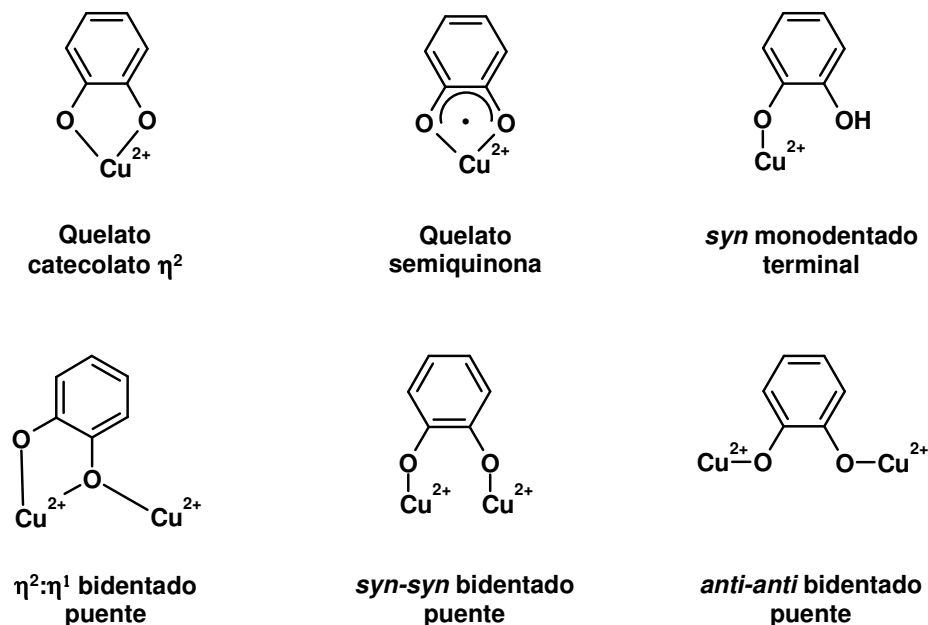


Figura 1.15. Distintos modos de coordinación del catecol desprotonado a los centros de cobre(II).

El primer aducto caracterizado cristalográficamente de un complejo de dicobre(II) con tetraclorocatecol (TCC) fue descrito por Karlin y colaboradores desde 1985.¹ El aducto fue preparado haciendo reaccionar tetracloro-1,2-benzoquinona con el complejo precursor de dicobre(I) en diclorometano. El anión catecolato se coordina como ligante puente en una conformación *syn-syn* a ambos iones de Cu(II) adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada, con el átomo de oxígeno del grupo catecolato ocupando una de las posiciones de la base, como se observa en la Figura 1.14

Otros ejemplos de aductos de catecol con complejos dinucleares de cobre(II) caracterizados estructuralmente fueron publicados más tarde. Así, Comba y colaboradores⁷⁵ publicaron la estructura cristalina de cuatro diferentes aductos Cu-TCC, con tres diferentes modos de coordinación del sustrato a los centros metálicos (Figura 1.16): como ligante monoprotonado y monodentado (**1**), como ligante totalmente desprotonado y quelato bidentado (**2** y **4**), y como ligante totalmente desprotonado y puenteadando a ambos centros de cobre(II), en conformación *anti-anti* (**3**). Cabe mencionar que los autores informaron que

la mayor actividad catalítica la presentaron los complejos en los que el catecolato se enlazaba como grupo puente bidentado, mientras que los complejos mononucleares de cobre(II) resultaron ser completamente inactivos.

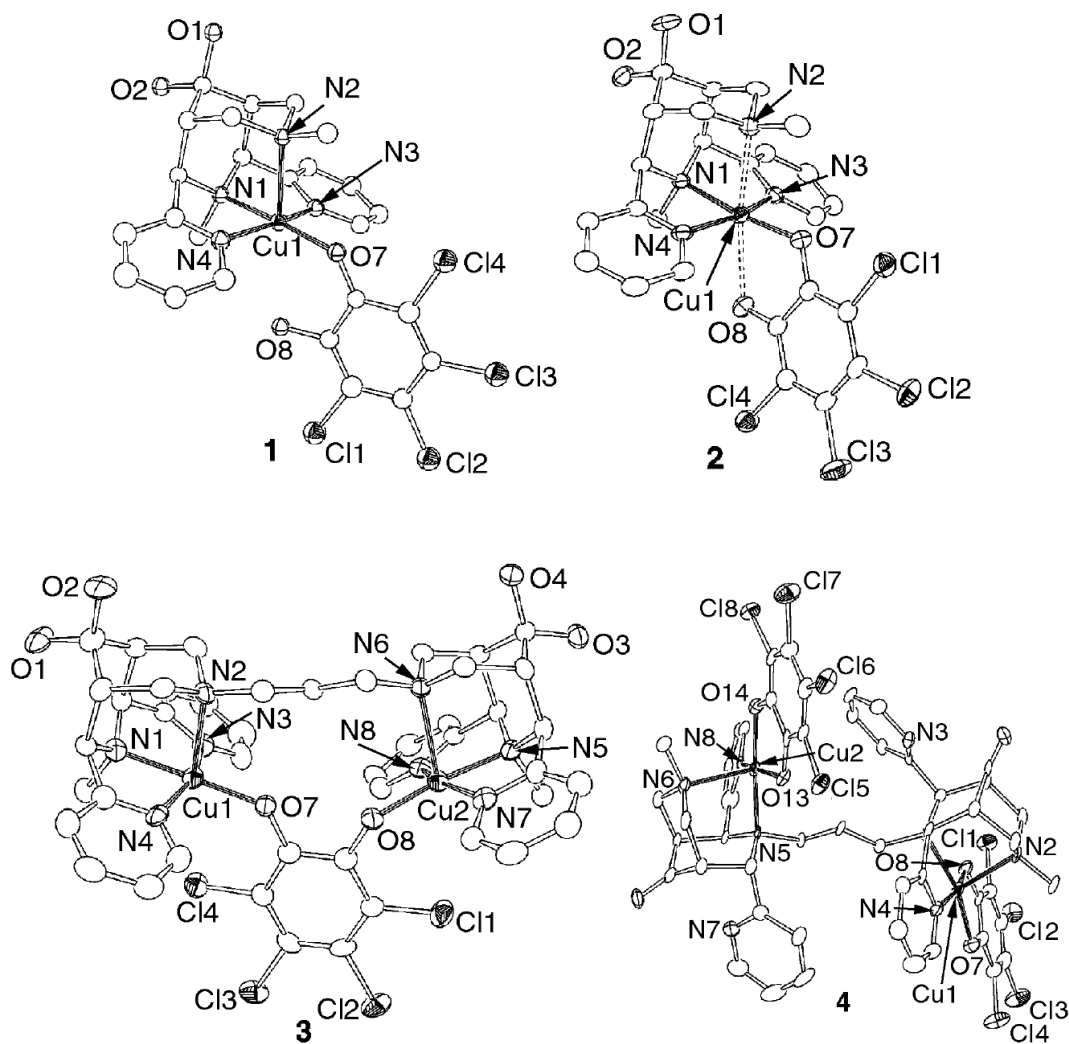


Figura 1.16. Estructura cristalina de los compuestos $[Cu(L^1)(HTCC)]^+ 1$, $[Cu(L^1)(TCC)] 2$, $[Cu_2(L^3)(TCC)]^{2+} 3$ y $[Cu_2(L^4)(TCC)_2] 4$.⁷⁵

Meyer y colaboradores⁶⁸ presentaron la estructura de tres complejos dinucleares de cobre(II), en la cual el TTC desprotonado se coordina sólo a uno de los dos iones de cobre(II) como quelato bidentado (Figura 1.17). Es interesante observar que la separación

cobre-cobre en el complejo precursor dicobre(II) excede los 4 Å, lo cual probablemente impide que el catecolato puente a ambos átomos de cobre.

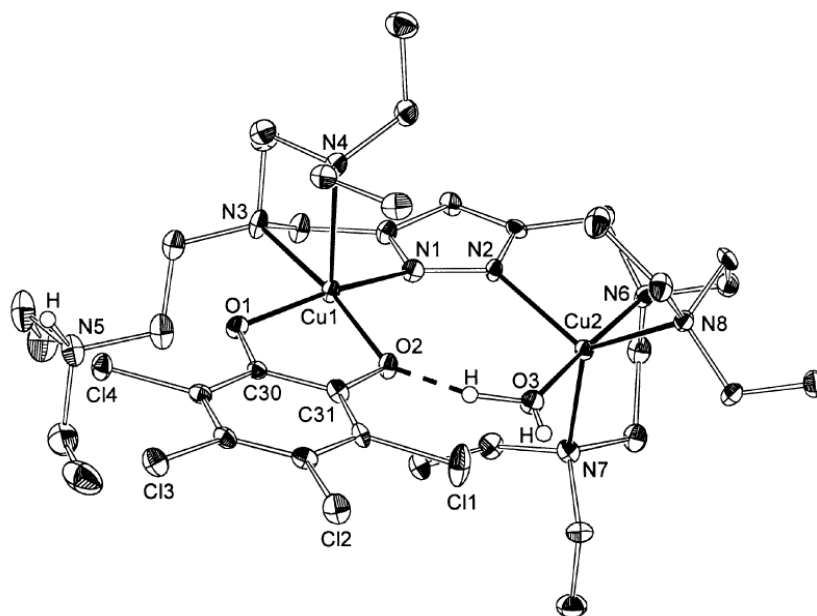


Figura 1.17. Estructura cristalina de uno de los aductos dicobre(II)-catecolato cristalizados por Meyer y colaboradores. La distancia Cu...Cu es de 4.4388 Å.⁶⁸

Además de la caracterización cristalográfica, muchos autores^{69, 72-82} han estudiado la unión del catecol a los centros metálicos por métodos espectroscópicos, principalmente por espectroscopia UV-Vis.

1.3.2.3 Relación estructura-reactividad

1.3.2.3.1 Distancia metal-metal vs actividad catecolasa

La suposición de que se requiere un reconocimiento espacial entre el centro dinuclear de cobre(II) y el sustrato para la actividad catecolasa fue publicado desde los años 80.⁴⁵ Consecuentemente, cuando se cuenta con las estructuras cristalinas, la mayoría de los

autores usan una comparación entre la distancia metal-metal dentro de una serie de complejos relacionados estructuralmente para interpretar la diferencia de sus actividades catalíticas.^{2, 68, 69}

Tomando en cuenta que la distancia $\text{Cu}^{\text{II}} \cdots \text{Cu}^{\text{II}}$ en el estado *met* de la enzima es muy corta (tan solo 2.9 Å),^{32, 33} y comparando este valor con el informado por Karlin *et al.*¹ del complejo *o*-catecolato-dicobre(II) (*ca.* 3.25 Å), se puede suponer que la distancia $\text{Cu}^{\text{II}} \cdots \text{Cu}^{\text{II}}$ óptima para la actividad catecolasa está en el intervalo de 2.9-3.2 Å. Kao y colaboradores² estudiaron la actividad catecolasa en una serie de complejos μ -oxy-dicobre(II) y mostraron que los compuestos con la distancia $\text{Cu}^{\text{II}} \cdots \text{Cu}^{\text{II}}$, más cercana a la observada en el estado *met* de la catecol oxidasa, exhibían la mejor actividad catalítica.

Sin embargo, una separación metal-metal grande no necesariamente prohíbe la actividad catecolasa. Por ejemplo, Meyer y colaboradores⁶⁸ informaron la oxidación catalítica del H_2DTBC por dos complejos dinucleares con una distancia $\text{Cu}^{\text{II}} \cdots \text{Cu}^{\text{II}}$ de 4.09 y 4.55 Å. Además, Selmeczi *et al.* publican la actividad catecolasa de un complejo dicobre(II) con una distancia entre ambos iones de cobre de 7.84 Å,⁶⁶ resultando ser uno de los mejores catalizadores que se encuentran descritos en la literatura.

1.3.2.3.2 Propiedades electroquímicas vs actividad catecolasa

Muchos grupos de trabajo han intentado correlacionar las propiedades electroquímicas de los complejos de cobre(II) con su actividad catalítica.^{3, 5, 62, 68, 69, 74, 80, 83} Sin embargo, la correlación entre ambas no es fácil de establecer. Por ejemplo, Torelli *et al.*³ informan que el complejo catalíticamente inactivo bis-acua-dicobre(II) con el ligante HL_{CH_3} es más fácil de reducir que su análogo catalíticamente activo μ -hidroxo-dicobre(II) (Figura 1.18), lo que está en desacuerdo con la observación hecha por Oishi *et al.*⁴⁵ Por otro lado, los mismos autores señalan la existencia de una correlación entre el primer potencial de reducción de una serie de compuestos μ -hidroxo-dicobre(II) con ligantes isoestructurales, HL_{R} (Figura 1.18), y su actividad catalítica.⁵ En este trabajo se intercambia el sustituyente *para* en el anillo fenólico de los ligantes y se muestra que la presencia de un

grupo fuertemente electroattractor, como el CF_3 , da como resultado un compuesto completamente inactivo. Los compuestos con sustituyentes $p\text{-CH}_3$, $p\text{-OCH}_3$ y $p\text{-F}$ mostraron actividad catalítica; más aún, tomando el complejo con el sustituyente metilo como referencia, la mayor actividad fue presentada por el complejo con el grupo electrodonador OCH_3 , mientras que la presencia del grupo electroattractor como lo es el átomo de flúor disminuye la actividad, por lo que es claro observar una relación entre el potencial redox y su actividad catecolasa.

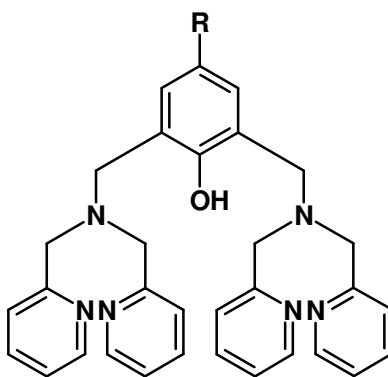


Figura 1.18. Representación general de los ligandos dinucleantes HL_R usados en la preparación de compuestos con cobre(II) por Belle y colaboradores: $R = \text{CH}_3$ (HL_{CH_3}), F (HL_{F}), CF_3 (HL_{CF_3}) y OCH_3 (HL_{OCH_3}).⁸¹

Reim y Krebs^{73, 80} estudiaron el comportamiento electroquímico de una serie de complejos dinucleares de cobre(II) con ligandos derivados de fenol (Figura 1.19) en acetonitrilo, y observaron señales de reducción irreversibles poco definidas. Encontraron que el potencial de reducción era sensible al grado de protonación y/o al número de electrones intercambiados pero no fue posible establecer una relación clara entre las propiedades redox y la actividad catalítica.

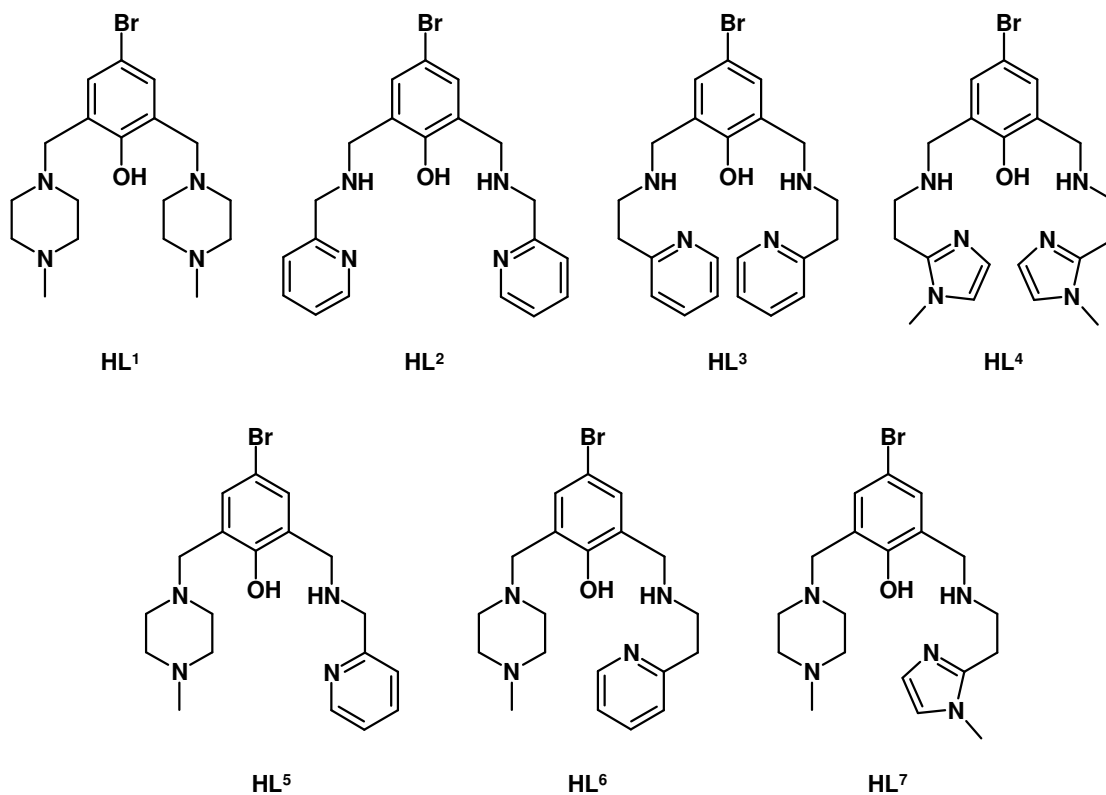


Figura 1.19. Ligantes dinucleantes pentadentados derivados de fenol preparados por Reim y Krebs. Sólo los complejos con los ligandos HL^1 , HL^5 , HL^6 y HL^7 presentan actividad catecolasa.⁷³

Mukherjee *et al.*⁶⁹ publicaron también la falta de una correlación clara entre las propiedades redox de una serie de complejos dinucleares doblemente puenteados con distintos ligandos y su actividad catalítica. Sin embargo, Casella y colaboradores⁶² tuvieron éxito en determinar las velocidades de reacción de los dos pasos sucesivos del proceso catalítico (una reacción rápida estequiométrica entre el sustrato y el complejo y un proceso catalítico lento) y observaron una correlación clara entre el potencial de reducción Cu(II)/Cu(I) y la reacción de oxidación estequiométrica del catecol.⁶² Esta observación es completamente comprensible, ya que este paso involucra la transferencia electrónica del catecolato coordinado al centro de dicobre(II). Por otro lado, la velocidad global de la reacción depende de varios factores, *e.g.* la velocidad de reoxidación de las especies de dicobre(I) por el dióxígeno, la velocidad de oxidación del catecol por las especies intermediarias peroxo-dicobre, *etc.*, por lo que se puede esperar que en la mayoría de los

casos no se pueda establecer una correlación directa entre la actividad y los potenciales redox de los complejos.

1.3.2.3.3 Influencia de ligantes exógenos en la actividad catecolasa

La naturaleza de los ligantes puente entre los centros de cobre de los complejos juega un papel importante en su actividad catalítica. Los ligantes puente pequeños pueden favorecer distancias Cu•••Cu cortas en el centro dimetálico, requeridas para coordinación del catecol en forma de quelato bidentado puente, lo que se piensa es benéfico para la actividad catecolasa. Por otro lado, el sustrato debe de unirse efectivamente al centro dimetálico, y por tanto debe de ser capaz de desplazar al ligante puente. Además, algunos ligantes puente, *e.g.* el ion OH⁻, pueden facilitar la desprotonación del catecol debido a su capacidad de extraer un protón con la subsiguiente liberación de una molécula de agua. En general, se puede decir que ligantes puente como el hidróxido,^{3, 68, 69} alcohóxido o fenóxido,^{2, 69, 74, 82} imidazolato⁸⁴ y carboxilato^{68, 70-72} pueden ser removidos fácilmente por el catecolato entrante y así promover la actividad catecolasa.

Neves *et al.* estudiaron la actividad catecolasa de complejos dicobre(II) con ligantes acetato puente en presencia de diferentes cantidades de acetato de sodio.⁷² Los autores observaron la disminución de la actividad catalítica al incrementar la cantidad de acetato de sodio añadido, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que el acetato compite con el grupo catecolato por el sitio de unión en la esfera de coordinación de los iones de cobre, llevando a un efecto de inhibición.

Por otro lado, Reedijk y colaboradores⁴ informaron sobre la interacción de complejos dinucleares de cobre(II) con un ligante derivado de fenol puenteados por iones cloruro y bromuro (Figura 1.20) con catecoles. En estos complejos, ambos iones de cobre se encuentran pentacoordinados, con tres posiciones de la esfera de coordinación ocupadas por los átomos donadores del ligante y las otras dos por iones halogenuro, uno en forma de ligante puente y otro como ligante monocoordinado terminal. Ambos complejos son

inactivos en la oxidación de catecol; sin embargo, al titularlos con TCC se encontró que en el complejo con cloruro, uno de los cloruros monocoordinados puede ser desplazado por el sustrato, mientras que el cloruro puente no se intercambia. En el caso del complejo con bromuro, ninguno de los halogenuros coordinados puede ser sustituido por el TCC.

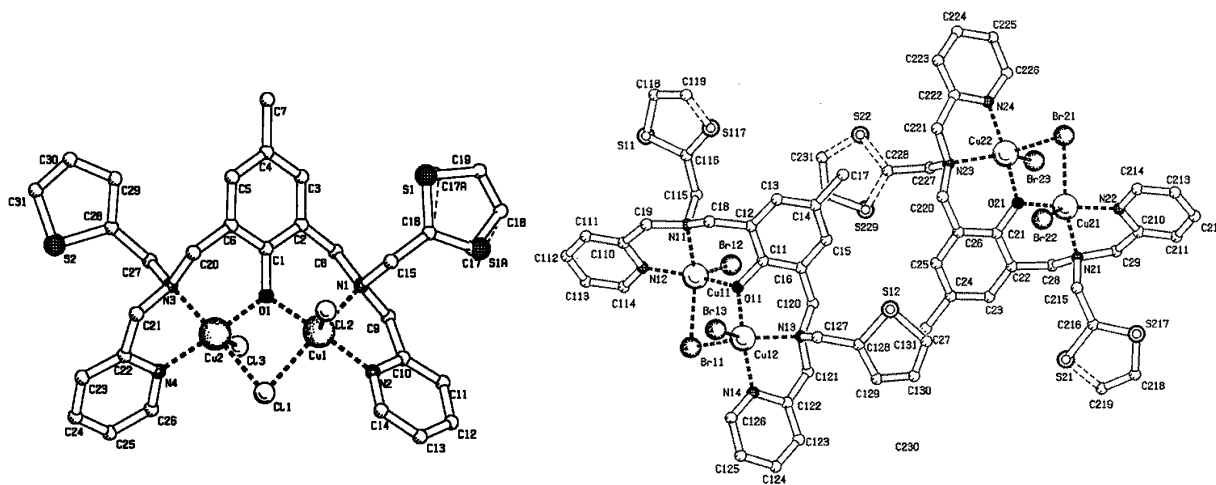


Figura 1.20. Estructura cristalina de los complejos dinucleares de cobre(II) con el ligante 2,6-bis[N-(2-piridilmetil)-N-(2-tiofenilmetil)aminometil]-4-metilfenol (*Hpy*₂*th*₂*s*). [*Cu*₂(*py*₂*th*₂*s*)(μ -Cl)Cl₂] · CH₃OH (izquierda) y [*Cu*₂(*py*₂*th*₂*s*)(μ -Br)Br₂] (derecha).⁴

Sólo algunos autores señalan que la presencia de dos puentes hidroxilo, alcohólico o fenólico pueden llevar a la formación de complejos catalíticamente inactivos. Así, Mukherjee *et al.*⁶⁹ explican la inactividad del complejo [*Cu*₂(L⁵-O)₂(ClO₄)₂] (L⁵-OH = 4-metil-2,6-bis(pirazolil-1-ilmetil)fenol) por la presencia de dos grupos fenólicos puente en la estructura. De forma similar, Casella y colaboradores⁶¹ mostraron que la especie activa en la oxidación del catecol por el complejo dicobre(II) en el ligante L55 (Figura 1.21) es la especie con un solo puente hidroxilo, mientras que la especie bis(μ -hidroxilo) es esencialmente inactiva. Sin embargo, estas observaciones no son concluyentes dados los casos descritos de compuestos doblemente puenteados por grupos hidroxilo^{50, 69}, alcohólico^{2, 74, 82} y fenólico.²

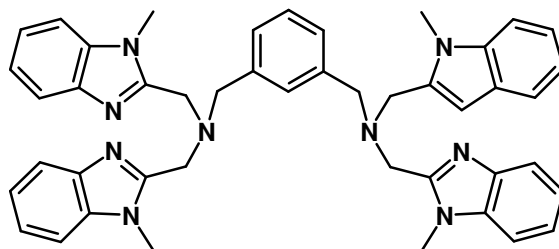


Figura 1.21. Representación esquemática del ligantes L55 preparado por Casella y colaboradores.⁶¹

1.3.2.3.4 Influencia de la estructura de los ligantes en la actividad catecolasa

A pesar de que muchos autores hacen referencia a las propiedades de los ligantes para explicar los resultados de la actividad catecolasa de los complejos de cobre, hasta ahora sólo se han publicado pocos estudios detallados de la influencia de la estructura del ligante en la actividad de los complejos.

Krebs y colaboradores⁷¹ prepararon tres ligantes asimétricos derivados de fenol, de los cuales uno de los brazos del ligante contiene un grupo heterocíclico piperidina (L1), morfolina (L2) o tiomorfolina (L3) (Figura 1.22) y estudiaron la actividad catecolasa de sus complejos dicobre(II) con dos grupos acetato puente entre los centros metálicos. Los autores encontraron que el complejo con el sustituyente tiomorfolina muestra la mayor actividad catalítica, probablemente debido a que el átomo de azufre puede desplazar a uno de los grupos acetato puente, dejando así una posición de coordinación libre para unión del sustrato. Esta hipótesis se apoyó mediante cálculos de DFT presentados en la misma publicación.

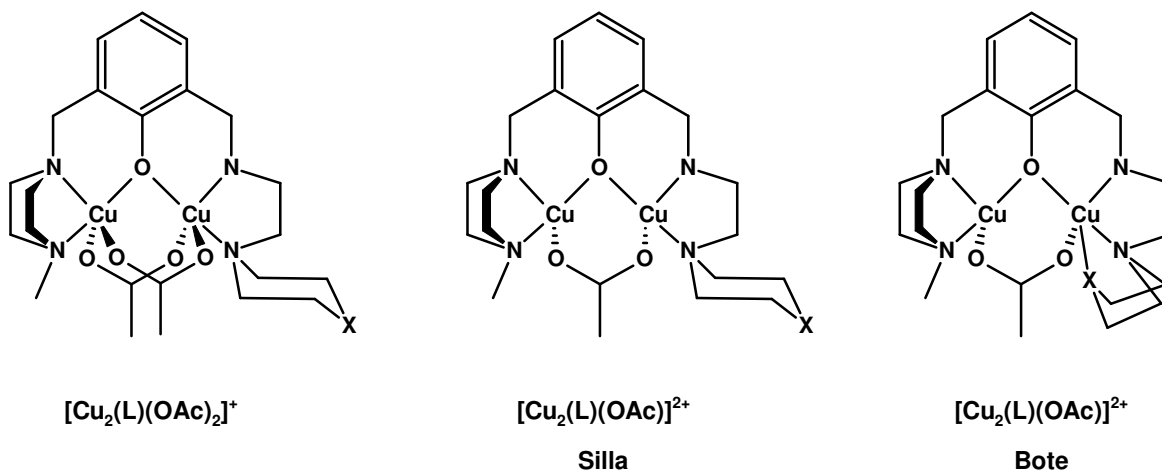


Figura 1.22. Estructura de los complejos $[Cu_2(L)(OAc)_2]^+$ y $[Cu_2(L)(OAc)_2]^{2+}$ en conformación de silla y bote (con $X = CH_2, O$ ó S) reportados por Krebs y colaboradores.⁷¹

La flexibilidad del ligante también juega un papel importante en la actividad de los complejos de cobre. Kandaswamy y colaboradores⁸⁵ estudiaron la actividad catecolasa de una serie de complejos de cobre(II) con ligantes dinucleantes macrocíclicos (Figura 1.23) y observaron incrementos de la actividad con el aumento del tamaño del anillo macrocíclico. El incremento en el tamaño del anillo hace al sistema más flexible y favorece el fenómeno catalítico.

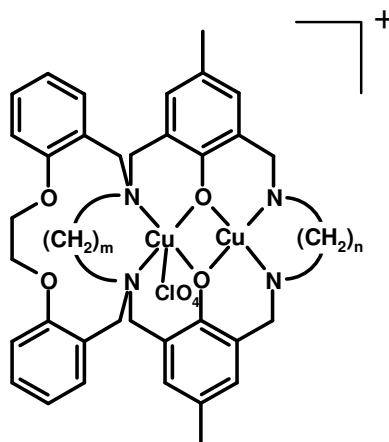


Figura 1.23. Representación esquemática general de los compuestos dicobre(II) con ligantes macrocíclicos publicados por Kandaswamy y colaboradores.⁸⁵

1.3.2.3.5 Influencia del pH en la actividad catecolasa

La enzima en estado natural presenta actividad catecolasa sólo en un intervalo de pH muy limitado (pH 5-8), con una actividad óptima a pH 8, y una pérdida irreversible de actividad en valores de pH menores a 4.0 y mayores a 10.0.⁸⁶ Algunos autores han estudiado la influencia del pH en la actividad catecolasa de complejos modelo de cobre(II).^{3, 61, 62, 70, 72} Es necesario señalar que los cambios en el pH frecuentemente se encuentran acompañados de cambios en la estructura de los complejos, llevando a diferentes comportamientos catalíticos. Así, Torelli *et al.*^{3, 5} estudiaron la interconversión mediada por el pH de complejos dicobre(II) con una serie de ligantes derivados de fenol (Figura 1.18) y encontraron que el complejo μ -fenoxo- μ -hidroxo-dicobre(II), el cual es estable en pH neutro, se puede interconvertir reversiblemente en las especies μ -fenoxo-bis(acua)-dicobre(II) y μ -fenoxo-bis(hidroxo)-dicobre(II) en niveles bajos y altos de pH, respectivamente, como se muestra en la Figura 1.24. De estas especies, sólo el complejo μ -fenoxo- μ -hidroxo-dicobre(II) presenta actividad catecolasa. La posible razón de esto puede ser la corta distancia Cu...Cu (2.89 Å) en este complejo y la capacidad del grupo hidroxilo puente de asistir en la desprotonación del sustrato, facilitando la coordinación de éste al centro dimetálico, como se discutió anteriormente.

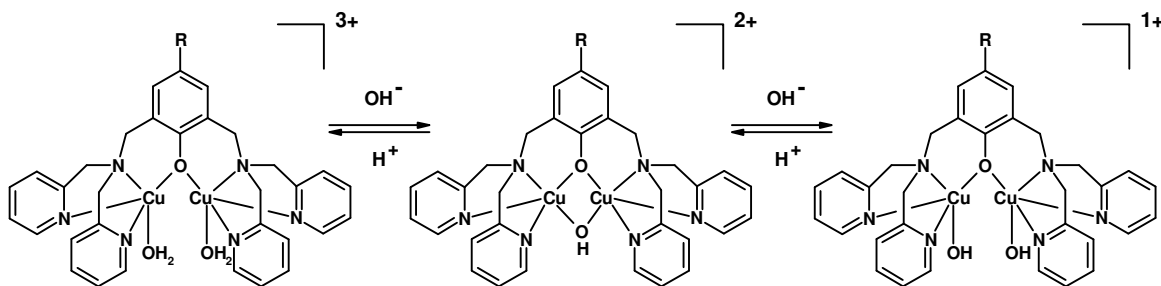


Figura 1.24. Interconversión guiada por el pH de los complejos dicobre(II) con los ligantes derivados de fenol (HL_R) reportados por Belle y colaboradores.³

Fernandes *et al.* estudiaron la actividad catalítica del complejo dicobre(II) con el ligante asimétrico HTPPNOL (N,N,N'-tris-(2-piridilmetil)-1,3-diaminopropan-2-ol) a

diferentes valores de pH.⁷⁰ Una titulación de este complejo indicó que a valores de pH superiores a 8.0, la molécula de agua, coordinada a uno de los iones de cobre(II) en disolución, presenta una desprotonación llevando a la formación de un grupo hidroxilo (Figura 1.25). A un pH de 8.05 se observó un incremento de la actividad catalítica, cuando la especie hidroxilo se encuentra presente en disolución. Los autores sugieren que el entorno hidroxilado ayuda a la desprotonación del catecol, facilitando su unión al centro dimetálico. Esta suposición es consistente con lo propuesto por Belle *et al.*,⁸¹ a pesar de la propuesta de Fernandes de una coordinación del grupo hidroxilo en la coordinación apical, en contraste con una coordinación tipo puente determinada por Belle.

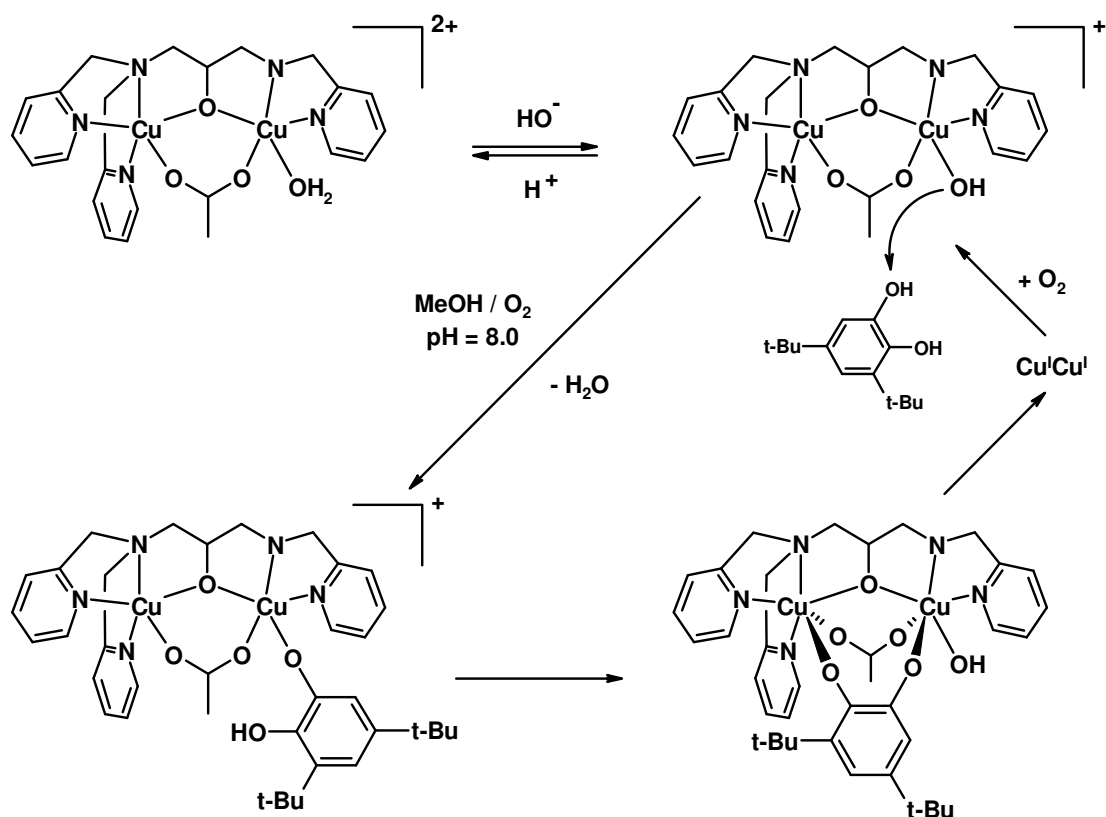


Figura 1.25. Mecanismo de la interacción entre el complejo dinuclear de cobre(II) con el ligante asimétrico HTPPNOL y 3,5-di-tert-butilcatecol como fue propuesto por Fernandes y colaboradores.⁷⁰

1.3.3 Nuestro grupo de trabajo

La investigación realizada en nuestro grupo se inscribe en el esfuerzo colectivo por comprender los factores estructurales y electrónicos de los complejos de cobre que afectan su actividad catalítica en la oxidación del H₂DTBC. Con este objetivo, en un principio, se diseñaron y sintetizaron dos series de ligantes dinucleantes derivados de imidazol y aminas (tipo “*cerrado*”⁸⁷⁻⁹³) o aminoácidos (tipo “*abierto*”^{83, 94-96}) y se estudió la actividad catecolasa de sus complejos de dicobre(II). A continuación se presenta un resumen de estos trabajos.

1.3.3.1 Ligantes

Los ligantes de ambas series, tanto de tipo *abierto* como de tipo *cerrado*, fueron sintetizados usando la reacción de Mannich⁹⁷ en imidazoles en medio básico. En un solo paso, esta reacción permite la condensación de un grupo aminometil al anillo imidazólico. Usando como materias primas el 2-metilimidazol, formaldehído y a una serie de aminas (*i.e.* N-propilamina, N,N-dimetiletilendiamina, 2-aminometilpiridina y glicina), se obtiene la serie de los ligantes de tipo *cerrado* (Figura 1.26, izquierda). Esta reacción da como producto la doble adición de dos aminas a dos anillos imidazólicos en las posiciones 4 y 5, formando un anillo heterocíclico de 10 miembros; 1,6-diazecina.⁸⁷⁻⁹³

Por otro lado, si se usan L- α -aminoácidos como aminas (*i.e.* alanina, leucina, metionina y fenilalanina) se obtienen los ligantes de tipo *abierto* (Figura 1.26, derecha). En estos ligantes sólo se observa la condensación de dos aminoácidos a un solo imidazol.^{83, 94-96}

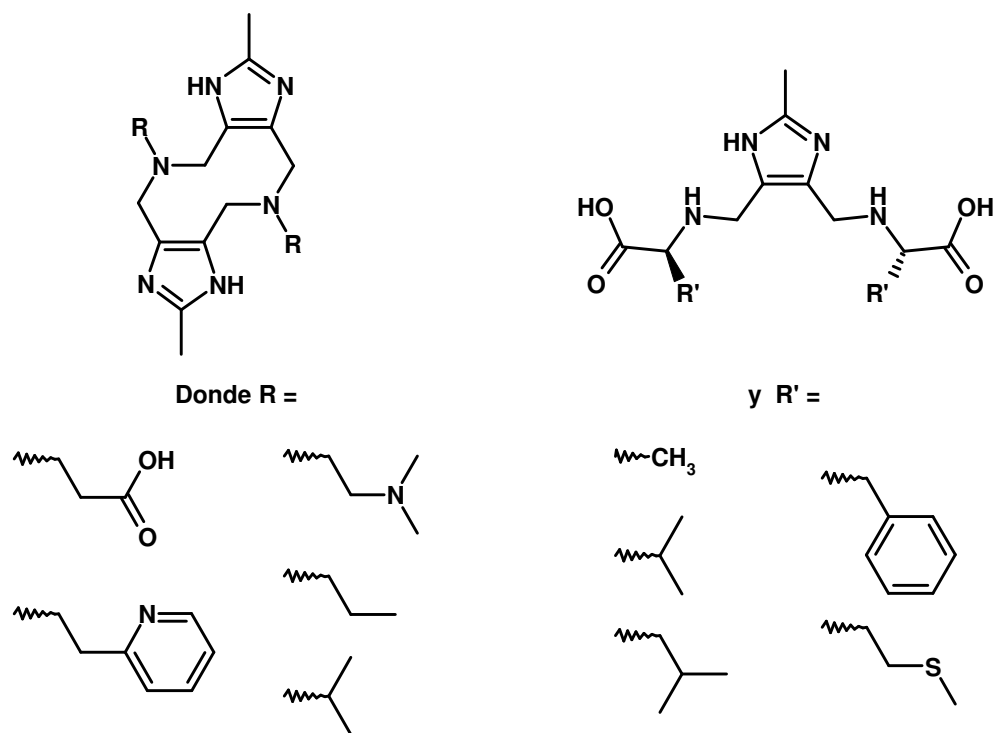


Figura 1.26. Ligantes dinucleantes derivados de 2-metilimidazol sintetizados previamente en el grupo de trabajo. Ligantes tipo “cerrado” (izquierda)⁸⁷⁻⁹³ y ligantes tipo “abierto” (derecha).^{83, 94-96}

1.3.3.2 Complejos

Tanto los ligantes de tipo *abierto* como de tipo *cerrado* son capaces de alojar a dos iones de cobre(II) en su estructura. Con los ligantes de tipo *cerrado* se aislaron dos tipos de estructuras: *i.e.* con el ligante en conformación de bote (Figura 1.27, derecha) y en conformación de silla (Figura 1.27, izquierda). De estas dos conformaciones, la de silla es la más común y sólo en un caso se observó la conformación de bote. En todos los complejos, los iones de cobre(II) presentan un número de coordinación de cuatro o cinco, y éstos se encuentran coordinados por uno de los nitrógenos del anillo imidazólico, uno de los nitrógenos del anillo diazecínico y por el átomo donador del residuo de la amina, el resto de las posiciones de coordinación se encuentran ocupadas por moléculas de disolvente

o contraiones coordinados. Cabe mencionar que en el caso del complejo dicobre(II) con el ligante Promeim, el cual es el único compuesto en el que se observó conformación de bote, el ligante no contiene un átomo donador en el residuo de la amina, ya que éste es un grupo *n*-propilo.

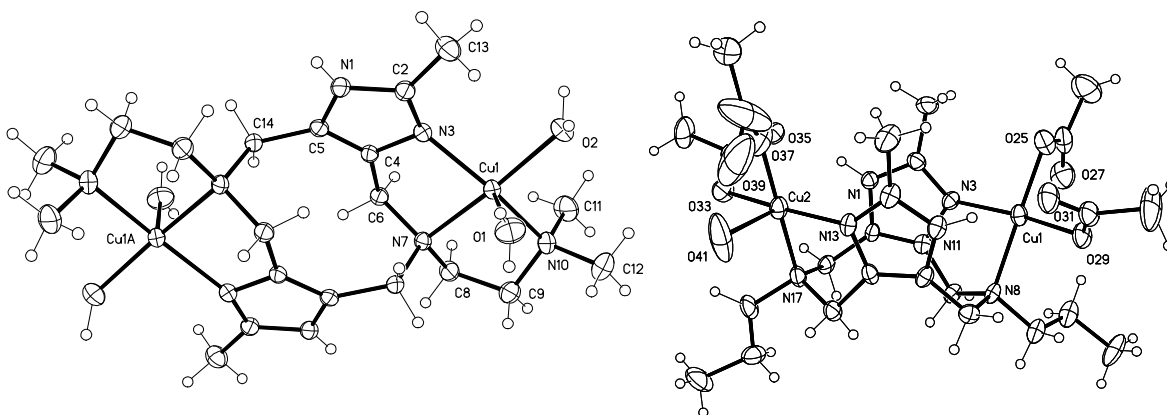


Figura 1.27. Estructura cristalina de dos compuestos dinucleares de cobre(II) con los ligantes tipo “cerrado” en donde se aprecian las distintas conformaciones presentadas por este sistema. (izquierda) $[Cu_2(\text{Dimeim})(H_2O)_4](ClO_4)_4$ ⁹³ en conformación de silla y (derecha) $[Cu_2(\text{Promeim})(OAc)_4(H_2O)]$ en conformación de bote.

Por otro lado, con los ligantes de tipo *abierto* se obtienen dos tipos de estructuras para los complejos dinucleares de Cu(II). Con el ligante Leumeim, se logró aislar un complejo dicobre(II) en medio ácido,⁹⁵ en el cual se observa una estructura con dos sitios de coordinación no equivalentes; uno en el cual el ion de cobre(II) se encuentra coordinado tanto al átomo de nitrógeno como al átomo de oxígeno del residuo del aminoácido, y otro en el cual el ion metálico, además de estar coordinado por el aminoácido, se encuentra coordinado a un átomo de nitrógeno del anillo imidazólico (Figura 1.28, izquierda). El otro tipo de estructura fue observado con el ligante Fenmeim.^{83, 98} Incrementando el pH del medio de reacción, fue posible aislar un complejo dicobre(II) con este ligante, en el cual ambos iones de cobre se encuentran coordinados por el residuo del aminoácido y por el grupo imidazólico, el cual se desprotona, formando un grupo imidazolato puente (Figura 1.28, derecha).

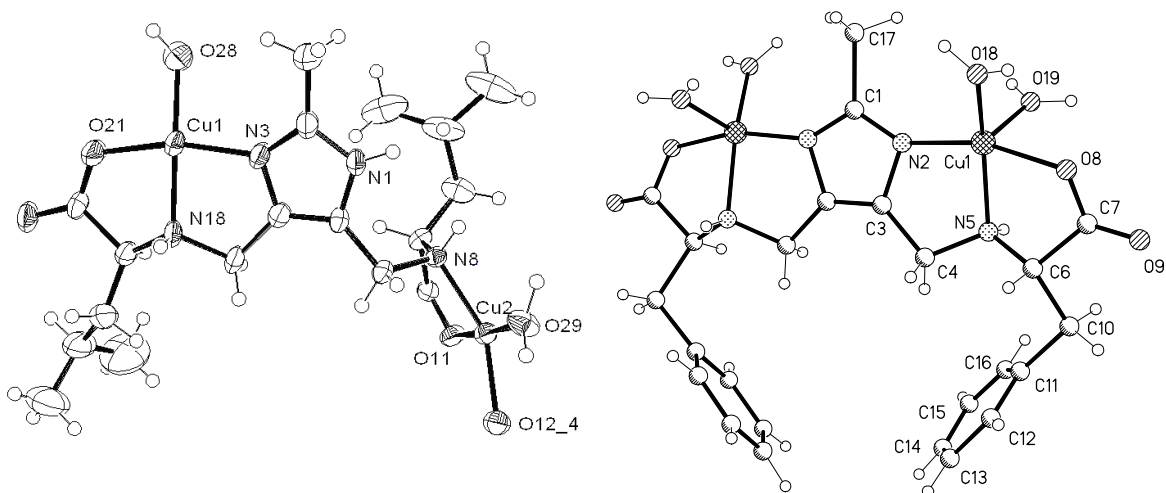


Figura 1.28. Estructura cristalina de dos complejos dinucleares de cobre(II) con ligantes de tipo “abierto”. Estructura de $[Cu_2(\text{Leumeim})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (izquierda)⁹⁵ en la cual el grupo imidazol se encuentra protonado y estructura del compuesto $[Cu_2(\text{Fenmeim})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (derecha)⁹⁸ en donde se observa la formación de un grupo imidazolato puente.

Tanto los ligantes de tipo *abierto* como de tipo *cerrado* forman compuestos dicobre(II), sin embargo dada la estructura de éstos, los centros metálicos no se encuentran en una distribución adecuada para formar grupos hidroxilo puente entre ellos. Lo que conlleva a los objetivos de este trabajo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar un nuevo sistema de compuestos tetranucleares de cobre(II) y determinar los aspectos estructurales que definen su actividad catalítica en la reacción de oxidación de catecoles.

2.2. Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar un nuevo tipo de ligantes tetranucleantes derivados de bisimidazol y aminoácidos.
- Sintetizar y caracterizar compuestos tetranucleares de cobre(II) con los ligantes obtenidos.
- Determinar las constantes de protonación (pK_a s) y de formación ($\log\beta$ s) tanto de los ligantes como de los complejos por medio de métodos potenciométricos.
- Caracterizar magnéticamente los sistemas por medio de estudios de EPR en disolución.
- Determinar los parámetros cinéticos de la actividad catalítica de los sistemas en la reacción de oxidación de catecoles.

3. Hipótesis y alcances

3.1. Hipótesis

- Los ligantes sintetizados podrán formar compuestos tetranucleares de Cu(II) y éstos a su vez serán capaces de formar grupos puente entre los núcleos metálicos.
- Los complejos obtenidos presentarán actividad catalítica en la reacción de oxidación de catecoles.
- La presencia de grupos puentes será un factor fundamental tanto en las propiedades magnéticas como en la actividad catalítica de los sistemas.

3.2. Alcances del trabajo

Desde un inicio, el proyecto global del cual forma parte este trabajo tuvo como objetivo identificar efectos electrónicos y estéricos en el comportamiento espectroscópico, magnético, electroquímico y catalítico de un grupo de compuestos con propiedades comunes a las enzimas de cobre de tipo III.

Debido que los ligantes sintetizados con anterioridad en el grupo de trabajo no permiten la formación de grupos ligante puente, en este trabajo se diseñó una nueva serie de ligantes capaces de albergar en su estructura dos sitios dimetálicos en los cuales, por la cercanía de los iones metálicos, se favorece la formación de grupos ligante puente.

En la primera parte de este trabajo se describirá la síntesis y caracterización de los nuevos ligantes tetranucleantes y de sus respectivos compuestos tetranucleares de cobre(II). Posteriormente, se analizarán los resultados de la caracterización en disolución de los complejos, tanto por métodos potenciométricos (determinación de constantes de formación) como por métodos espectroscópicos (UV-Vis y EPR), destacando la formación de grupos imidazolato e hidroxio puentes. Finalmente, se describirán los estudios cinéticos en la reacción de oxidación del 3,5-di-*tert*-butil-*o*-catecol y se discutirán las principales características estructurales de los complejos que afectan la actividad catalítica, alcanzando así el objetivo principal de este trabajo.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis y caracterización de los ligantes

En la síntesis de estos sistemas se empleó la reacción de Mannich,⁹⁷ en la cual se realiza una amino-metilación del anillo imidazólico por la condensación de formaldehído y aminoácidos.

Como ya se mencionó (ver sección 1.3.3.2), esta reacción es de gran utilidad y permite la obtención de los ligantes en una síntesis de un solo paso. La reacción general se presenta en el siguiente esquema (Figura 4.1). Cabe mencionar que un exceso del 50 % en el volumen de formaldehído empleado, conlleva a un incremento en el rendimiento de la reacción.

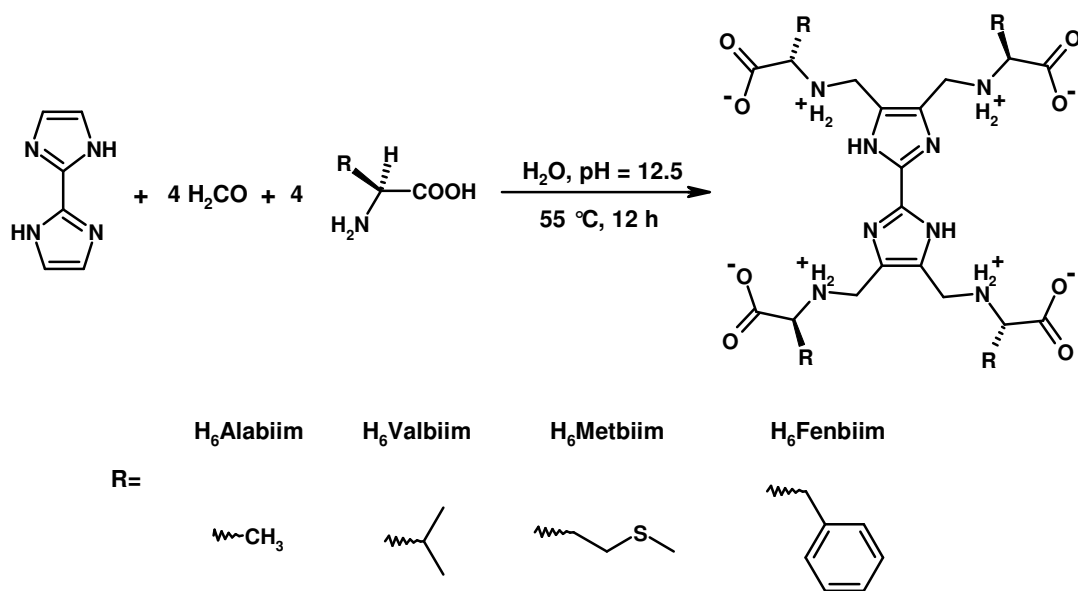


Figura 4.1. Representación esquemática de la reacción de Mannich usada en la obtención de los ligantes tetranucleantes. El residuo R depende del L-aminoácido usado.

4.1.1. Ligante $H_6Alabiim$

Para la obtención del ligante 4,5-(L-alanina-*N*-metil)-2-(4,5-(L-alanina-*N*-metil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-imidazol ($H_6Alabiim$), se disolvieron 4 eq de L-alanina en agua y se le agregaron, gota a gota, 6 eq (exceso del 50 %) de formaldehído también disuelto en agua. Esta mezcla se ajustó a un pH de 12.5 con KOH y posteriormente se le agregó 1 eq de Biimidazol (Biim). El resultado es una suspensión, de la cual al dejar en agitación a 55 °C por 12 h, se obtiene una disolución amarillenta pálida. Esta disolución se deja agitando a temperatura ambiente por 2 días más y se obtiene una disolución con una tonalidad naranja tenue. Trascurrido el tiempo de reacción, la disolución se ajusta a un pH de 7.5 por adición de ácido acético glacial, a este pH se espera se encuentre presente la especie zwitteriónica (especie eléctricamente neutra). Una vez alcanzado el valor de pH deseado, la disolución se concentra a una cuarta parte del volumen inicial en un rotavapor. El precipitado obtenido se filtra y las aguas madres se enfrían y filtran nuevamente. El producto obtenido se purifica con tres lavados sucesivos con ~ 2 mL de agua a 0 °C y metanol obteniendo un polvo blanco estable al aire y a la humedad con un rendimiento del 23 %.

4.1.1.1 Análisis elemental

En la tabla siguiente se muestra el análisis elemental obtenido para el ligante $H_6Alabiim$. Este análisis concuerda con que el ligante se encuentra heptahidratado lo cual se entiende dada la afinidad de los sistemas zwitteriónicos por el agua.

Tabla 4.1. Análisis elemental para el ligante $H_6Alabiim \cdot 7H_2O$ ($C_{22}H_{34}N_8O_8 \cdot 7H_2O$)

Elemento	% Exp	% Cal	% Error
C	39.6	39.7	0.25
N	16.7	16.9	1.20
H	7.1	7.3	2.81

La cantidad de moléculas de agua de hidratación fue corroborada mediante análisis termogravimétrico (TGA), en el cual se observa una pérdida de masa del 19 % de la inicial a una temperatura de 170 °C. Esta pérdida concuerda con 7 moléculas de agua en el ligante.

4.1.1.2 Espectroscopia infrarroja

En el espectro de infrarrojo del ligante $H_6Alabiim \cdot 7H_2O$, mostrado en la Figura 4.2, se observa una banda muy ancha en 3400 cm^{-1} característica de los estiramientos O–H de las moléculas de agua presentes en el ligante y de la vibración N–H de las aminas secundarias. Es posible observar las vibraciones C=O de los carbonilos en 1609 cm^{-1} y la vibración C–O en 1404 cm^{-1} . También es posible observar una señal en 1452 cm^{-1} asignada a la vibración C–N del bisimidazol.

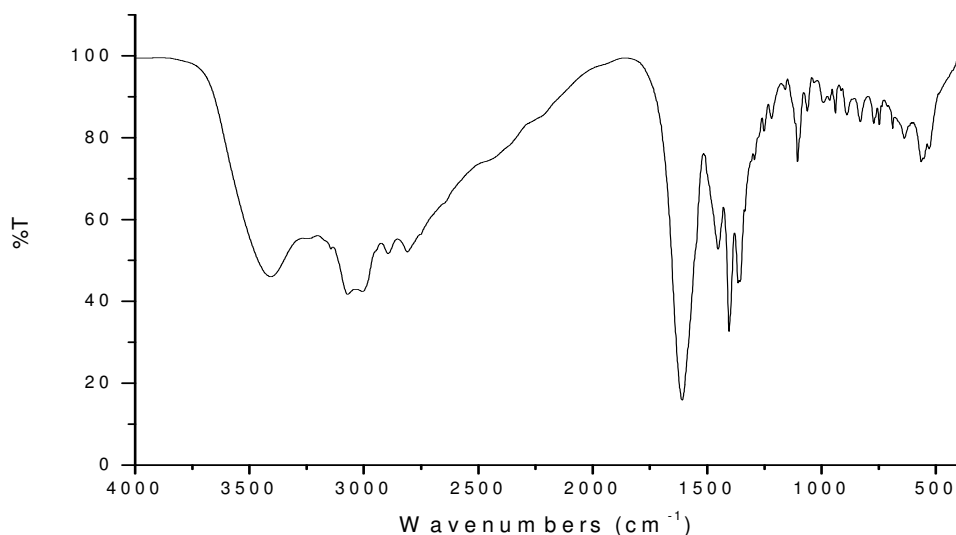


Figura 4.2. Espectro de infrarrojo del ligante $H_6Alabiim \cdot 7H_2O$ obtenido en pastilla de KBr.

Al secar la muestra por 2 h a 170 °C es posible observar con claridad en el IR las señales del estiramiento N–H en 3390 cm⁻¹ y las señales del estiramiento C–H en 2809 y 2893 cm⁻¹ de los metilos y metilenos.

4.1.1.3. Espectroscopia de RMN ¹H y experimento COSY

El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y el experimento de correlación de desplazamiento químico homonuclear H-H (COSY) se realizaron en D₂O acidulada con DCl a un pD ≈ 1.

En la Figura 4.3 se muestra el espectro de RMN ¹H del ligante H₆Alabiim. En este espectro se observan tres señales debidas a los tres tipos de protones presentes en la molécula. Tanto la multiplicidad como las integrales concuerdan con lo esperado. Cabe mencionar que los protones de las aminas y de los grupos imidazólicos no se observan, ya que se intercambian por deuterio. En la Tabla 4.2 se enlistan los valores de desplazamiento químico, multiplicidad, constante de acoplamiento e integración para cada una de las señales presentes.

Tabla 4.2. Señales observadas en RMN ¹H para el ligante H₆Alabiim. Las señales están referenciadas con la señal del TMS.

Protón	δ (ppm)	J (Hz)	Integral	Multiplicidad	COSY
a	4.24	--	2	Singulete	
b	4.04	7.5	1	Cuadruplete	Acoplamiento con c
c	1.38	7.5	3	Doblete	Acoplamiento con b

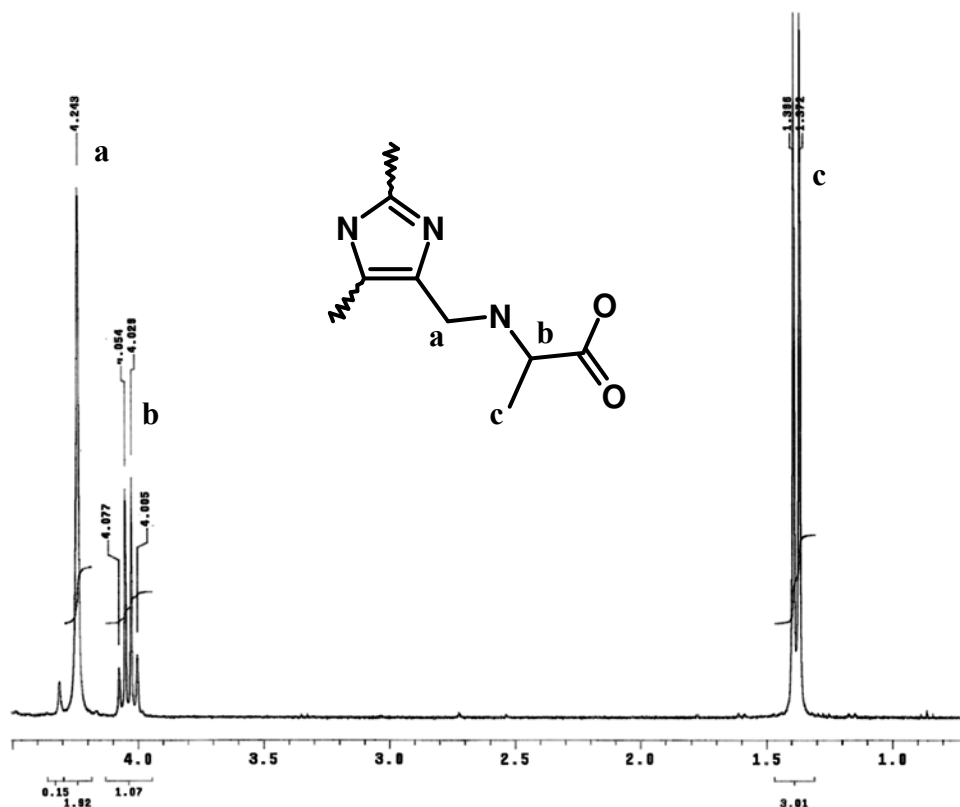


Figura 4.3. Espectro de RMN ^1H del ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$ obtenido en D_2O a $\text{pD} \approx 1$ en un equipo de 300.2 MHz.

En el experimento de correlación de desplazamiento químico homonuclear H-H (COSY) es posible observar cuáles son las señales que se encuentran acopladas. En el experimento COSY del ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$ sólo es posible observar una correlación, como es de esperarse, entre el protón del CH- α y los protones del metilo.

4.1.1.4. Espectroscopia de RMN ^{13}C y experimento HETCOR

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C y el experimento de correlación de desplazamiento químico heteronuclear C-H (HETCOR) se realizaron en D_2O acidulada con DCl a un $\text{pD} \approx 1$. Las señales fueron referenciadas con la señal del tetrametil silano (TMS).

En la Figura 4.4 se muestra el espectro de RMN ^{13}C del ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$. Dada la gran simetría del ligante, en este espectro se observan sólo seis señales. La señal del carbono 1 en el imidazol presenta una baja intensidad ya que es un carbono cuaternario que se relaja muy lentamente, además de presentar una abundancia relativa de la mitad con respecto al resto de los carbonos, por lo que es necesaria una larga adquisición para poder detectarlo. En la Tabla 4.3 se muestran los desplazamientos químicos para cada una de las señales observadas.

Tabla 4.3. Señales observadas en RMN ^{13}C para ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS.

Carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono	HETCOR
1	138.3	Cuaternario	
2	128.8	Cuaternario	
3	40.2	Secundario	Acoplamiento con a
4	56.6	Terciario	Acoplamiento con b
5	172.6	Cuaternario	
6	15.5	Primario	Acoplamiento con c

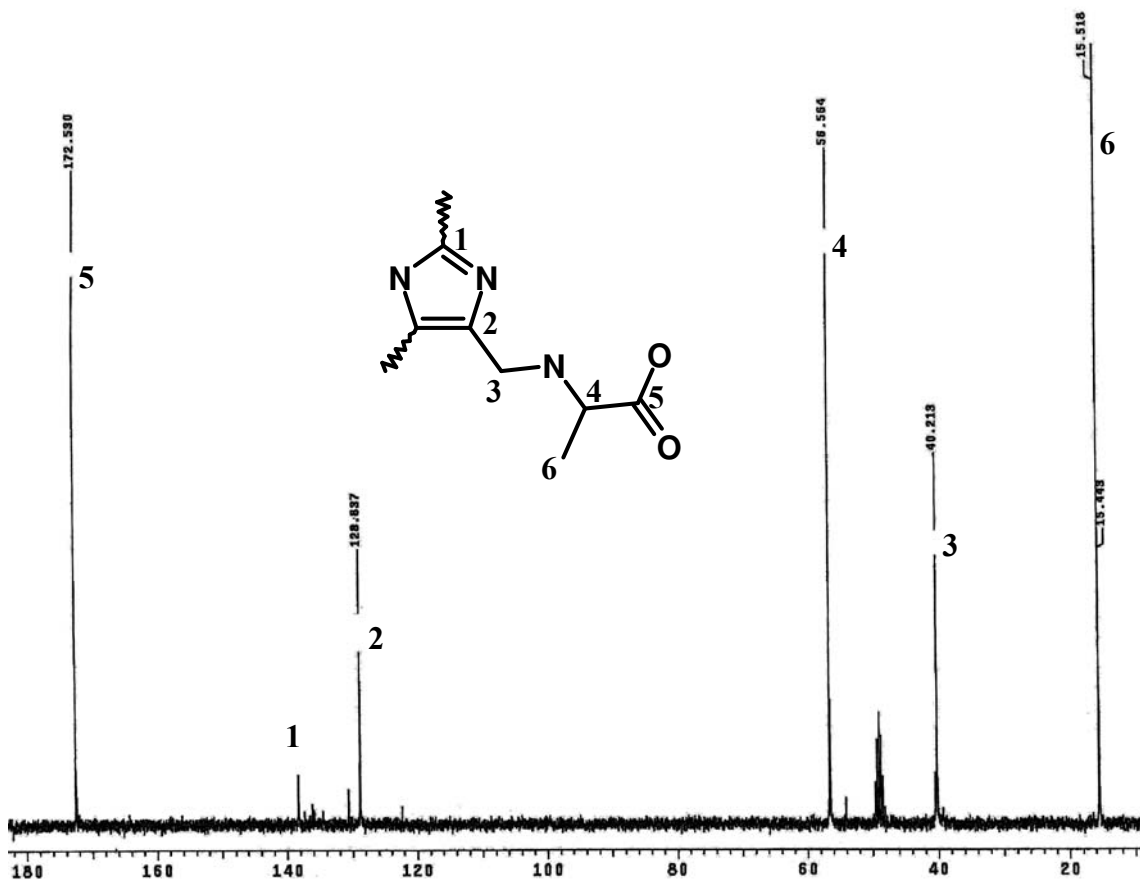


Figura 4.4. Espectro de RMN ^{13}C del ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$ obtenido en D_2O a $\text{pD} \approx 1$ en un equipo de 75.3 MHz

El experimento de correlación de desplazamiento químico heteronuclear C-H (HETCOR) nos permite correlacionar los espectros de RMN ^1H y ^{13}C ayudándonos a identificar cuáles señales del espectro de protón pertenecen a cada señal del espectro de carbono. En el espectro HETCOR del ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$ se observan tres correlaciones C-H, como es de esperarse. Se observa una correlación entre **C3** y los protones **a**, **C4** con los protones **b** y **C6** con los protones **c**. De esta manera se comprueba la asignación de las señales 3, 4 y 6 observadas en el espectro de RMN de ^{13}C .

4.1.1.5. Espectrometría de masas

En la espectrometría de masas de estos compuestos es necesario usar la técnica de bombardeo con átomos rápidos (**FAB**) debido a que estos ligantes tienen un peso molecular elevado, son compuestos zwitteriónicos y se descomponen al calentarlos. El espectro de masas del ligante $H_6Alabiim$ se obtuvo empleando la técnica de FAB+ en una matriz de alcohol nitrobenílico. Cabe mencionar que en la técnica de FAB+ algunos fragmentos suelen aparecer en su valor de peso molecular más una unidad ($M+1$). Dada la baja solubilidad del ligante en la matriz, sólo es posible observar algunas de las señales esperadas. En la Figura 4.5 se presenta una ampliación del ion molecular y una simulación de este pico donde se observa que la abundancia isotópica corresponde claramente para el fragmento propuesto. Además del ion molecular, se observa también un pico en 270 correspondiente a la mitad del ion molecular o al ion molecular con doble carga ($M/2 + 1$).

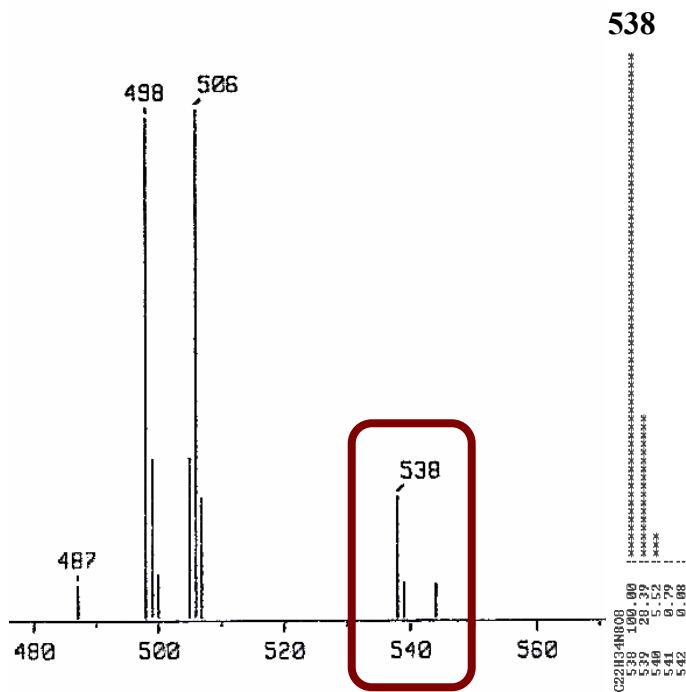


Figura 4.5. Patrón isotópico del ion molecular del ligante $H_6Alabiim$ observado en el espectro de masas (izquierda) y su simulación (derecha). El espectro fue obtenido usando la técnica de FAB+.

4.1.2. Ligante $H_6Valbiim$

El ligante 4,5-(L-valina-*N*-metil)-2-(4,5-(L-valina-*N*-metil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-imidazol ($H_6Valbiim$) fue sintetizado siguiendo el mismo procedimiento que para el ligante $H_6Alabiim$ (ver sección 4.1.1) usando 4 equivalentes de L-valina en lugar de L-alanina. A diferencia del ligante $H_6Alabiim$, con este ligante no es necesario evaporar el disolvente, ya que desde un pH ≈ 10 el ligante empieza a precipitar. El precipitado obtenido se filtra y purifica en un equipo soxhlet con agua durante 4 horas y posteriormente con metanol durante 2 horas más, obteniendo un polvo blanco con un rendimiento del 17 %. El producto es estable al aire y a la humedad.

4.1.2.1. Análisis elemental

En la tabla siguiente se muestra el análisis elemental obtenido para el ligante $H_6Valbiim$.

Tabla 4.4. Análisis elemental para el ligante $H_6Valbiim \cdot 9H_2O$ ($C_{30}H_{50}N_8O_8 \cdot 9H_2O$)

Elemento	% Exp	% Cal	% Error
C	44.9	44.3	1.3
N	13.8	13.8	0
H	8.2	8.4	2.4

La cantidad de moléculas de agua de hidratación fue corroborada por análisis termogravimétrico, en el cual se observa una pérdida de masa del 20 % de la inicial a una temperatura de 150 °C. Esta pérdida concuerda con 9 moléculas de agua en el ligante.

4.1.2.2 Espectroscopia infrarroja

El espectro de infrarrojo del ligante $H_6Valbiim \cdot 9H_2O$ (Figura 4.6) es similar al observado para el ligante $H_6Alabiim \cdot 7H_2O$. Se observa una banda muy ancha alrededor de 3410 cm^{-1} característica de los estiramientos O–H y N–H de las moléculas de agua presentes y de las aminas secundarias. Se observan también la vibración C=O de los carbonilos en 1620 cm^{-1} y la vibración C–O en 1424 cm^{-1} además de la señal en 1470 cm^{-1} de la vibración C–N del bisimidazol. También se observan las señales de estiramiento de los metilos en 2970 cm^{-1} .

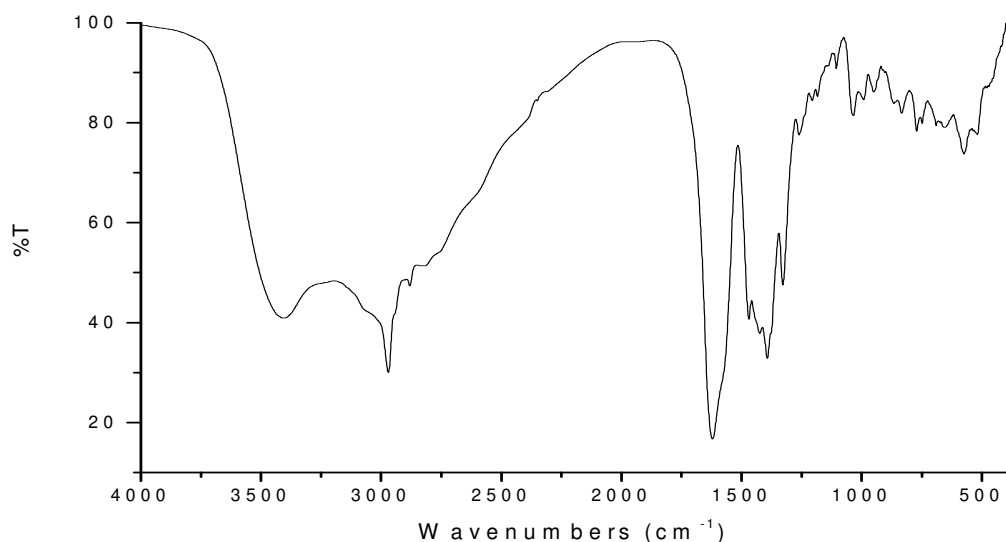


Figura 4.6. Espectro de infrarrojo del ligante $H_6Valbiim \cdot 9H_2O$ obtenido en pastilla de KBr.

4.1.2.3. Espectroscopia de RMN 1H y experimento COSY

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 1H y el experimento COSY se realizaron en D_2O acidulada con DCl a un $pD \approx 1$. Las señales fueron referenciadas con TMS.

El número de señales observadas en el espectro de RMN de ^1H del ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ (Figura 4.7), así como su integración concuerdan con lo esperado. Se observan cinco señales correspondientes a cada uno de los protones del ligante. Cabe mencionar que los dos metilos del residuo del aminoácido se diferencian, por lo que se observa un doblete de integral 3 para cada uno. En la Tabla 4.5 se resumen los valores de desplazamiento químico, multiplicidad, constante de acoplamiento e integración para cada una de las señales presentes, así como los acoplamientos observados en el experimento COSY.

Tabla 4.5. Señales observadas en RMN ^1H para el ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS.

Protón	δ (ppm)	J (Hz)	Integral	Multiplicidad	COSY
a	4.21	--	2	Singulete	
b	3.86	3.9	1	Doblete	Acoplamiento con c
c	2.15	7.2 y 3.9	1	Multiplete (heptuplete dobleteado)	Acoplamiento con b, d y e
d	0.83	7.2	3	Doblete	Acoplamiento con c
e	0.76	6.9	3	Doblete	Acoplamiento con c

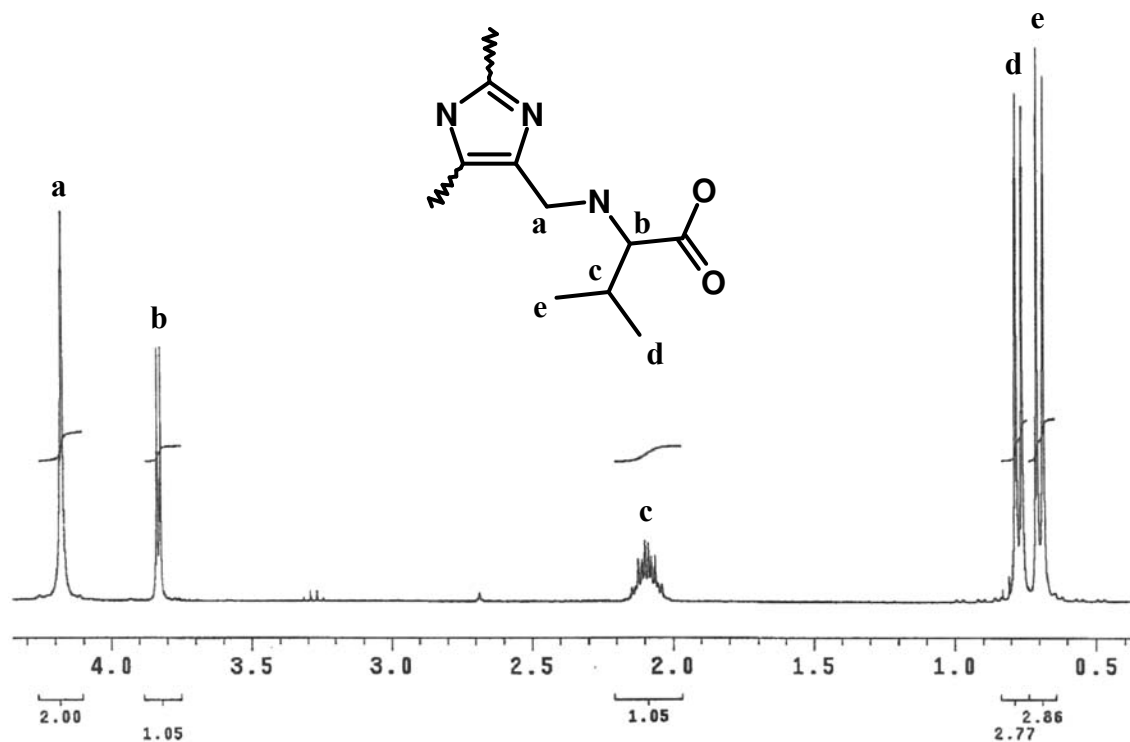


Figura 4.7. Espectro de RMN ^1H del ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ obtenido en D_2O a $\text{pD} \approx 1$ en un equipo de 300.2 MHz.

En el experimento COSY del ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ se observan tres correlaciones que concuerdan con los acoplamiento del protón del $\beta\text{-CH}$ con los protones de los metilos y del $\alpha\text{-CH}$.

4.1.2.4. Espectroscopia de RMN ^{13}C y experimento HETCOR

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C y el experimento HETCOR se realizaron en D_2O acidulada con DCl a un $\text{pD} \approx 1$. Las señales fueron referenciadas nuevamente con la señal de TMS.

En el espectro de RMN ^{13}C del ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ (Figura 4.8) se observan sólo ocho señales dada la gran simetría de éste. Al igual que en el ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$, la señal del

carbono 2 del imidazol presenta una baja intensidad debido a su largo tiempo de relajación. En la Tabla 4.6 se resumen los desplazamientos químicos para cada una de las señales observadas.

Tabla 4.6. Señales observadas en RMN ^{13}C para el ligante $H_6\text{Valbiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS.

Carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono	HETCOR
1	140.4	Cuaternario	
2	130.4	Cuaternario	
3	43.3	Secundario	Acoplamiento con a
4	68.1	Terciario	Acoplamiento con b
5	172.6	Cuaternario	
6	31.8	Terciario	Acoplamiento con c
7	20.6	Primario	Acoplamiento con d
8	19.0	Primario	Acoplamiento con e

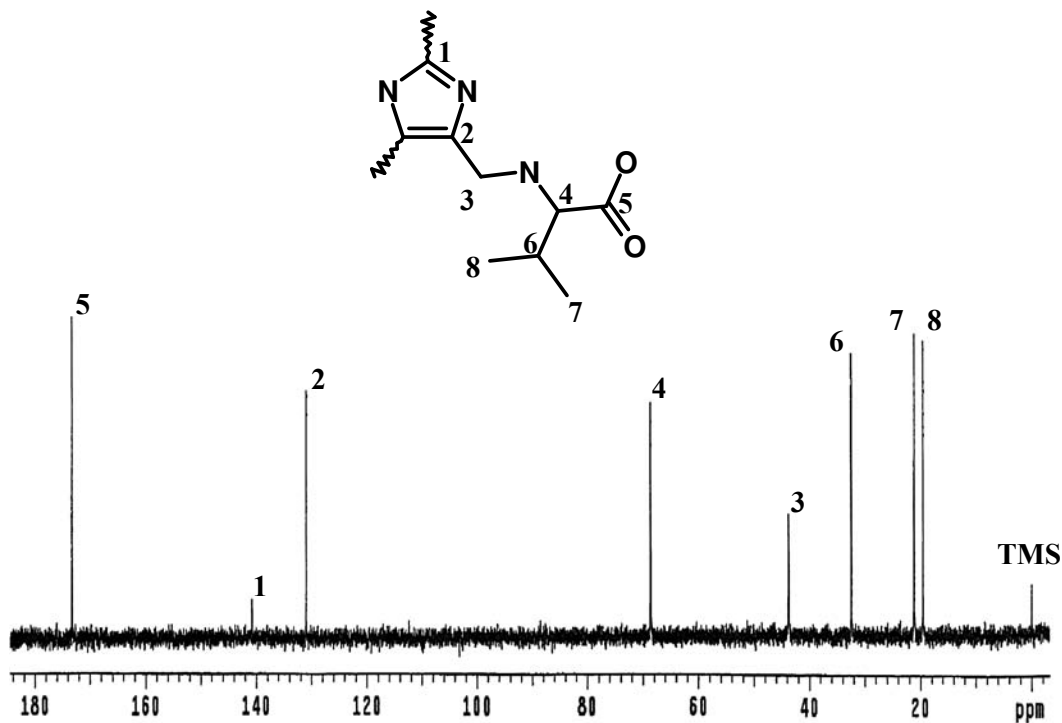


Figura 4.8. Espectro de RMN ^{13}C del ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ obtenido en D_2O a $\text{pD} \approx 1$ en un equipo de 75.3 MHz.

El experimento HETCOR del ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ se observan cinco correlaciones C–H como es de esperarse; *i.e.* hay correlación entre **C3** con los protones **a**, **C4** con los protones **b**, **C6** con los protones **c**, **C7** con los protones **d** y **C8** con los protones **e**.

4.1.3. Ligantes $\text{H}_6\text{Metbiim}$ y $\text{H}_6\text{Fenbiim}$

Los ligantes 4,5-(L-metionina-*N*-metil)-2-(4,5-(L-metionina-*N*-metil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-imidazol ($\text{H}_6\text{Metbiim}$) y 4,5-(L-fenilalanina-*N*-metil)-2-(4,5-(L-fenilalanina-*N*-metil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-imidazol ($\text{H}_6\text{Fenbiim}$) fueron sintetizados siguiendo el mismo procedimiento que para el ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ (Ver sección 4.1.2) usando como materia prima L-metionina y L-fenilalanina con rendimientos del 25.8 % y 30.3 %, respectivamente. Los productos son estables al aire y a la humedad.

4.1.3.1 Análisis elemental

En la tabla siguiente se muestra el análisis elemental obtenido para la los ligantes $H_6Metbiim$ y $H_6Fenbiim$.

Tabla 4.7. Análisis elemental para los ligantes $H_6Metbiim \cdot 4H_2O$ ($C_{30}H_{50}N_8O_8S_4 \cdot 4H_2O$) y $H_6Fenbiim \cdot 1H_2O$ ($C_{46}H_{50}N_8O_8 \cdot 1H_2O$).

Elemento	$H_6Metbiim \cdot 4H_2O$ $C_{30}H_{50}N_8O_8S_4 \cdot 4H_2O$			$H_6Fenbiim \cdot 1H_2O$ $C_{46}H_{50}N_8O_8 \cdot 1H_2O$		
	% Exp	% Cal	% Error	% Exp	% Cal	% Error
C	42.0	42.3	0.7	63.5	64.2	1.1
N	13.7	13.2	3.6	13.3	13.0	2.3
H	6.7	6.9	3.0	6.1	6.1	0
S	14.8	15.1	2.0			
TGA	Pérdida del 10 % a 150 °C (4 moléculas de H_2O)					

4.1.3.2 Espectroscopia infrarroja

Los espectros de los ligantes $H_6Metbiim$ y $H_6Fenbiim$ en forma general son similares al obtenido para el ligante $H_6Valbiim$. Las principales señales observadas en los espectros así como sus respectivas asignaciones se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 4.8. Señales observadas en el espectro de infrarrojo de los ligantes $H_6Metbiim$ y $H_6Fenbiim$.

$H_6Metbiim \cdot 4H_2O$ cm^{-1}	$H_6Fenbiim \cdot 1H_2O$ cm^{-1}	Asignación
1604	1620	C=O
1393	1452	C-O
2916	2845	CH ₃ y/o CH ₂
3400	3382	OH y NH
1438	1496	C-N

4.1.3.3. Espectroscopia de RMN ^1H y ^{13}C

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C del ligante $H_6\text{Metbiim}$ se adquirieron en D_2O acidulada con DCl a un $\text{pD} \approx 1$, mientras que los espectros de $H_6\text{Fenbiim}$ se realizaron en D_2O alcalinizada con NaOD por presentar problemas de solubilidad en medio ácido. Las señales fueron referenciadas usando TMS. Las señales observadas en los espectros de ^1H y ^{13}C así como sus asignaciones y las correlaciones observadas en los experimentos HETCOR y COSY se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 4.9. Señales observadas en RMN ^1H para el ligante $H_6\text{Metbiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS. ^1H RMN (300.2 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ $\text{pD} = 1$, TMS):

Protón	δ (ppm)	Integral	Multiplicidad	Acoplamiento COSY
a	4.20	2	Singulete	
b	4.03	1	Triplete	con c
c	1.96	2	Cuadruplete	con b y d
d	2.32	2	Multiplete	con c
e	1.71	3	Singulete	

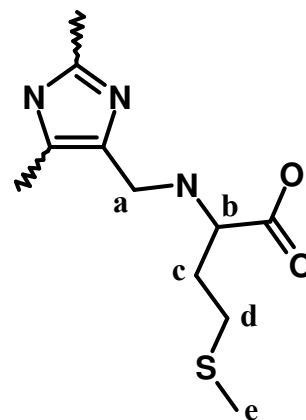


Tabla 4.10. Señales observadas en RMN ^{13}C para el ligante $H_6\text{Metbiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS. ^{13}C NMR (75.3 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ $\text{pD} = 1$)

Carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono	HETCOR
1	140.5	Cuaternario	
2	130.5	Cuaternario	
3	42.4	Secundario	Acoplamiento con a
4	60.8	Terciario	Acoplamiento con b
5	172.8	Cuaternario	
6 y 7	30.6	Secundario	Acoplamiento con c y d
8	16.2	Primario	Acoplamiento con e

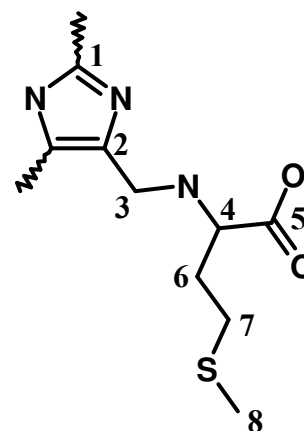


Tabla 4.11. Señales observadas en RMN ^1H para el ligante $H_6\text{Fenbiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS. ^1H RMN (300.2 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ pD = 12, TMS)

Protón	δ (ppm)	J (Hz)	Integral	Multiplicidad	Acoplamiento COSY
a	3.25	J = 13.3 2C = 47.3	2	Sistema AB	
b	3.07	6.9	1	Triplete	con c
c	2.61	6.9	2	Doblete	con b
d, e y f	6.97		5	Multiplete	

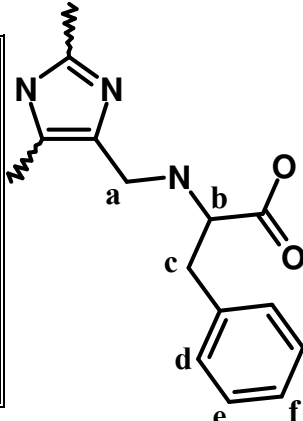
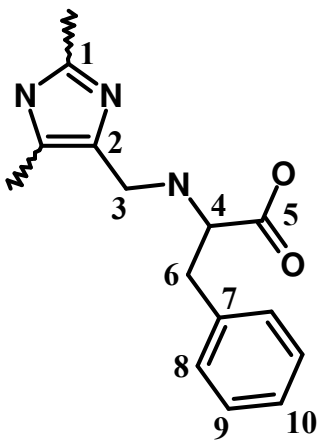


Tabla 4.12. Señales observadas en RMN ^{13}C para el ligante $H_6\text{Fenbiim}$. Las señales están referenciadas con la señal del TMS. ^{13}C RMN (75.3 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ pD = 12, TMS):

Carbono	δ (ppm)	Tipo de carbono	HETCOR
1	144.3	Cuaternario	
2	133.1	Cuaternario	
3	42.3	Secundario	Acoplamiento con a
4	64.6	Terciario	Acoplamiento con b
5	181.4	Cuaternario	
6	39.2	Secundario	Acoplamiento con c
7	138.4	Cuaternario	
8	129.4	Terciario	Acoplamiento con HAr
9	128.9	Terciario	Acoplamiento con HAr
10	126.7	Terciario	Acoplamiento con HAr



4.2. Síntesis y caracterización de los complejos polinucleares de Cu(II)

4.2.1. Síntesis

En la síntesis de los compuestos de coordinación con los ligantes presentados en este trabajo, es muy importante tomar en cuenta factores como la correcta elección del disolvente y la acidez del medio. Como puede observarse en la Figura 4.2.1 estos ligantes poseen una gran cantidad de grupos capaces de presentar reacciones ácido-base, por lo que es fácil entender la dependencia de los distintos equilibrios presentados por estos sistemas con el pH. Estos sistemas ligantes presentan cuatro grupos carboxílicos, cuatro grupos amino (ambos derivados de los aminoácidos usados) y cuatro átomos de nitrógeno heterocíclicos (provenientes del bisimidazol). Otro punto a destacar es su alta afinidad a disolventes con una constante dieléctrica alta, ya que los compuestos de coordinación de cobre(II) con estos ligantes tendrán una carga elevada.

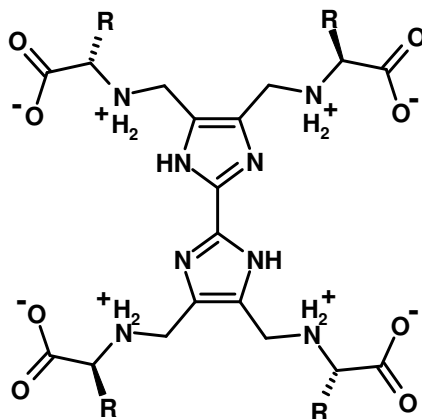


Figura 4.2.1. Representación esquemática de los ligantes presentados en este trabajo. Cada molécula de ligante contiene cuatro átomos de nitrógeno imidazólicos, cuatro aminas secundarias y cuatro ácidos carboxílicos. Los residuos R dependen del aminoácido usado en la síntesis.

La síntesis de los compuestos tetranucleares de cobre(II) con estos ligantes es sencilla, basta mezclar cantidades estequiométricas de alguno de los ligantes con $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$ en MeOH. Una vez formado el complejo *in situ*, se puede incrementar el pH del medio agregando alguna base, como pueden ser NaOMe o Bu_4NOH , para obtener los distintos grados de protonación de los complejos tetranucleares.

$\text{H}_6\text{Valbiim}$ es el ligante con el que se obtuvieron mejores resultados, logrando aislar exitosamente tres complejos con distintos grados de protonación. La primera especie que puede aislarse es el complejo formado *in situ*, el cual al agregarle ocho equivalentes de base se obtiene un precipitado verde olivo que se redisuelve al agregar dos equivalentes más de base (un total de diez equivalentes). Tanto la especie formada *in situ* como la obtenida con diez equivalentes de base, son extremadamente solubles en MeOH, lo que dificulta su aislamiento y purificación. Para aislar estas especies, es necesario evaporar el MeOH casi a sequedad, diluir un poco la mezcla con acetona y agregar posteriormente otro disolvente que funcione como precipitante (*e.g.* éter etílico). Al inducir la precipitación de los complejos de esta manera, también se favorece la coprecipitación de algunas impurezas que presentan solubilidades similares a las de los complejos. Los complejos aislados pueden purificarse por lavados sucesivos con pequeñas cantidades de *i*-PrOH frío.

Los compuestos con los ligantes $\text{H}_6\text{Alabiim}$, $\text{H}_6\text{Metbiim}$, y $\text{H}_6\text{Fenbiim}$ no presentan redisolución al agregar diez equivalentes de base, por lo que sólo es posible aislar el complejo formado *in situ* y el compuesto con ocho equivalentes de base. El análisis de la caracterización sólo se presenta para los tres complejos con el ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$.

4.2.1.1. $[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{Valbiim})(\text{H}_2\text{O})_{10}](\text{BF}_4)_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)

Al mezclar un equivalente de $\text{H}_6\text{Valbiim} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ con cuatro equivalentes de $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se obtiene una disolución con un marcado aumento de acidez debida a la desprotonación del ligante para dar paso a la formación del complejo formado *in situ*. Con base en los diversos estudios analíticos realizados (presentados posteriormente) y tomando

en cuenta la estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}_2\text{Leumeim}(\text{H}_2\text{O})_3\text{NO}_3]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ver Figura 1.28, izquierda, Sección 1.3.3.2), se propone una estructura con dos iones de cobre(II) enlazados, cada uno, a un átomo de N imidazólico y a los átomos de N y O del residuo del aminoácido, completando su esfera de coordinación con moléculas de disolvente. Por simplicidad llamaremos a estos sitios *tricoordinados* (por el ligante) a lo largo de este texto. Aunados a estos dos iones de Cu *tricoordinados*, se proponen dos iones de cobre(II) enlazados sólo a los átomos de N y O del residuo del aminoácido, con moléculas de disolvente ocupando las posiciones de coordinación restantes, a los cuales por simplicidad, llamaremos *dicoordinados* (por el ligante). Obteniendo como resultado un complejo catiónico de color verde claro (Figura 4.2.2).

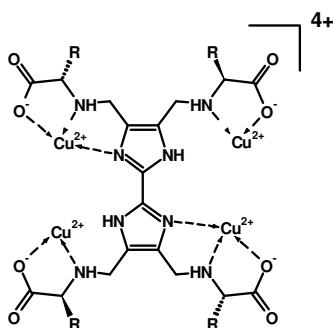


Figura 4.2.2. Estructura propuesta para el compuesto catiónico formado *in situ*, **1**: $[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{Valbiim})(\text{H}_2\text{O})_{10}]^{4+}$. Por razones de claridad, las moléculas de agua de coordinación se excluyen de la imagen. Los fragmentos R representan residuos *i*-propilo provenientes de la L-valina.

4.2.1.2 $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})(\mu\text{-OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2)

Al agregar ocho equivalentes de base (número de equivalentes necesarios para neutralizar los 6 protones del ligante y realizar dos hidrólisis) a la especie formada *in situ* se obtiene un precipitado verde oliva, aislado de una disolución prácticamente neutra. Con base en la estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}_2\text{Fenmeim}(\text{H}_2\text{O})_4]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Ver Figura 1.28, derecha, Sección 1.3.3.2) se propone una estructura con cuatro átomos de cobre equivalentes, coordinados por el carboxilo y las amina del residuo del aminoácido, un átomo de nitrógeno de imidazol desprotonado y por un grupo $\mu\text{-OH}$ (Figura 4.2.3).

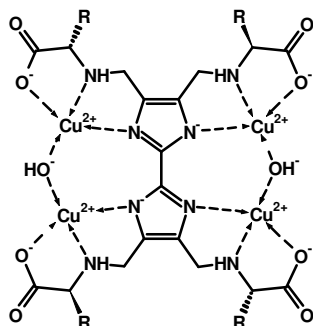


Figura 4.2.3. Estructura propuesta para el compuesto neutro formado al agregar ocho equivalentes de base, **2**: $[Cu_4(\text{Valbiim})(\mu\text{-OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$. Por razones de claridad, las moléculas de agua de coordinación se excluyen de la imagen. Los fragmentos R representan residuos *i*-propilo provenientes de la L-valina.

4.2.1.3 $Bu_4N [Cu_4(\text{Valbiim})(\mu\text{-OH})_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 5H_2O$ (**3**)

Finalmente, al agregar diez equivalentes de base a la especie formada *in situ*, se obtiene una disolución con una intensa coloración verde, de la cual se aísla un complejo aniónico de color verde oscuro. Para éste se propone una estructura similar a la del complejo aislado con ocho equivalentes, el cual presenta una hidrólisis adicional. Este tercer grupo OH puede o no estar formando un grupo puente.

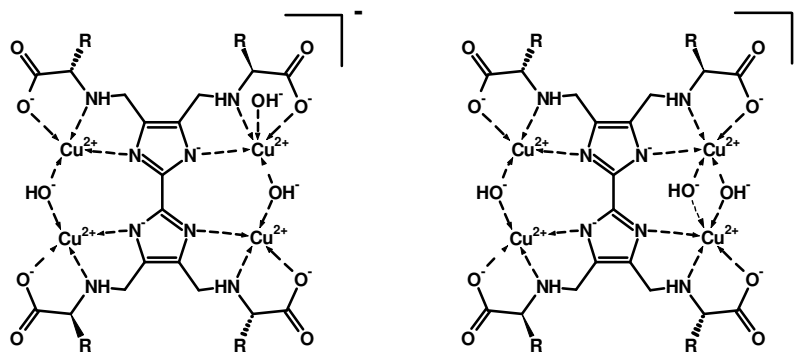


Figura 4.2.4. Estructura propuesta para el compuesto aniónico formado al agregar diez equivalentes de base, **3**: $[Cu_4(\text{Valbiim})(\mu\text{-OH})_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]^{-}$, con el tercer grupo OH terminal (izquierda) o puente (derecha). Por razones de claridad, las moléculas de agua de coordinación se excluyen de la imagen. Los fragmentos R representan residuos *i*-propilo provenientes de la L-valina.

4.2.2. Caracterización

4.2.2.1. Análisis elemental

En la tabla 4.2.1 se muestra el análisis elemental obtenido para los compuestos tetranucleares de cobre aislados con el ligante $H_6Valbiim$, así como el análisis de absorción atómica para determinar el porcentaje de Cu(II) y el análisis de TGA para confirmar el porcentaje de agua presente en las muestras.

Tabla 4.2.1 Análisis elemental para los compuestos tetranucleares de cobre(II) en el ligante $H_6Valbiim$:

1, $[Cu_4(H_2Valbiim)(H_2O)_{10}](BF_4)_4 \cdot 6H_2O$ ($Cu_4C_{30}H_{46}N_8O_8B_4F_{16} \cdot 16H_2O$);

2, $[Cu_4(Valbiim)(\mu-OH)_2(H_2O)_4] \cdot 5H_2O$ ($Cu_4C_{30}H_{48}N_8O_{10} \cdot 9H_2O$);

3, $Bu_4N [Cu_4(Valbiim)(\mu-OH)_2(OH)(H_2O)_3] \cdot 5H_2O$ ($Cu_4C_{46}H_{85}N_9O_{11} \cdot 8H_2O$).

* Los porcentajes de Cu(II) se determinaron por absorción atómica.

Elemento	1 $Cu_4C_{30}H_{46}N_8O_8B_4F_{16} \cdot 16H_2O$			2 $Cu_4C_{30}H_{48}N_8O_{10} \cdot 9H_2O$			3 $Cu_4C_{46}H_{85}N_9O_{11} \cdot 8H_2O$		
	% Exp	% Cal	% Error	% Exp	% Cal	% Error	% Exp	% Cal	% Error
C	23.32	23.45	0.6	32.35	32.84	1.5	40.55	41.28	1.8
N	7.18	7.29	1.5	10.00	10.21	2.1	9.27	9.42	1.6
H	5.02	5.12	2.0	5.88	6.06	3.1	7.3	7.61	4.2
Cu*	16.49	16.54	0.3	23.19	23.17	0.1	19.03	18.99	0.2
TGA	No realizado por la presencia de F ⁻			Pérdida del 15 % de 50 a 100 °C (9 moléculas de H ₂ O)			Pérdida del 11 % de 50 a 100 °C (8 moléculas de H ₂ O)		

Los porcentajes de error obtenidos entre los datos experimentales y los teóricos en el compuesto obtenido con diez equivalentes son mayores a los observados en los otros dos complejos debido a la dificultad en el aislamiento y la purificación de esta muestra, sin embargo estos porcentajes son menores al 2 % para C y N y de 5 % para H.

La pérdida de masa en el estudio de TGA, asignada a la pérdida de moléculas de agua en los compuestos, se observa en un solo intervalo de temperatura, lo que impide determinar con claridad el número de moléculas de agua coordinadas y de hidratación. Las propuestas están hechas con base en el número de coordinación más frecuente en este tipo de compuestos, el cual es de cinco para cada átomo de cobre(II), sin embargo, es necesario mencionar que este número podría ser cuatro o seis.

4.2.2.2. Espectroscopia infrarroja

Los espectros de infrarrojo de los tres complejos son muy parecidos entre ellos (Figura 4.2.5), destacando las señales asignadas a los grupos carbonilo (1620 cm^{-1}), los contraiones y el agua. En el espectro de **1** se aprecia una señal de gran intensidad en 1071 cm^{-1} debida a la vibración $\nu_d(\text{XY})$ y una señal en 751 cm^{-1} de la vibración $\nu_s(\text{XY})$ del contraión BF_4^- ,⁹⁹ indicando que el compuesto es catiónico. En el espectro de **2** se observa la desaparición de esta señal dejando el resto del espectro prácticamente sin cambio. Por su parte, el espectro de **3** presenta un aumento de las señales asignadas a las vibraciones de los metilos y metilenos (2965 y 2880 cm^{-1}) debido a la presencia del contraión Bu_4N^+ , indicando la obtención de un complejo aniónico.

Dada la gran cantidad de moléculas de agua presentes en los tres complejos, no es posible observar con claridad la señal de los grupos OH^- coordinados que se esperaría como una señal muy fina alrededor de 3586 cm^{-1} ,¹⁰⁰ a pesar de secar las muestras previamente.

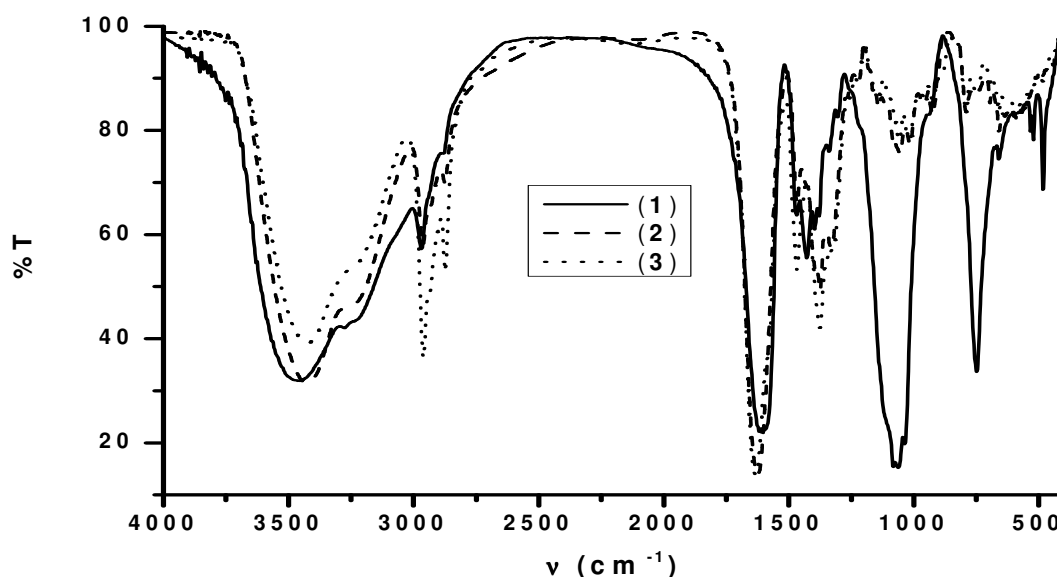


Figura 4.2.5. Espectros de FT-IR de los compuestos **1**, **2** y **3**. Los espectros fueron obtenidos en pastilla de KBr de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.2.3. Reflectancia difusa

La reflectancia difusa es una técnica ampliamente usada en la obtención de espectros de UV-Vis para muestras sólidas. Los espectros de reflectancia difusa de los tres compuestos aislados se presentan en la Figura 4.2.6. El espectro obtenido de **1** muestra un máximo en 694 nm debido a la transición d-d de los iones de cobre(II) y otro máximo en 316 nm debida a una absorción de los contraiones tetrafluoroborato.

Al comparar los espectros de **1** y **2** observamos un desplazamiento de la transferencia d-d hacia mayores energías (658 nm) en el espectro de **2** que concuerda con la formación de los puentes imidazolato, ligantes de campo mayor que las moléculas de H_2O . Por otro lado, la señal asignada al contraión desaparece para dar paso a dos nuevas señales: una en 328 nm que puede asignarse a una transferencia de carga de los grupos hidróxido puente a los iones de cobre(II) (TCLM, Cu-OH-Cu)¹⁰¹ y otra en 366 nm, señal característica de la formación de puentes imidazolato (TCLM, Cu-imid-Cu).¹⁰² Por su parte,

el espectro del compuesto **3** es similar al de **2** con un ligero desplazamiento de las señales a 634, 340 y 367 nm, respectivamente.

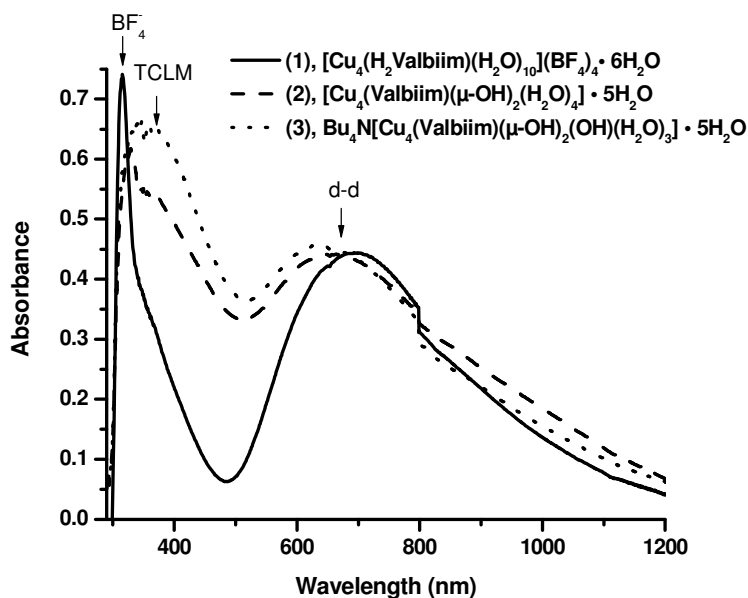


Figura 4.2.6. Espectros de reflectancia difusa de los compuestos tetranucleares de *Cu(II)* con el ligante *H₆Valbiim* (**1**, **2** y **3**). La anomalía cercana a 800 nm es debida al cambio de detector.

4.2.2.4. Resonancia paramagnética electrónica

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (**EPR**) en sólido de los tres compuestos fueron obtenidos a temperatura ambiente, colocando el mismo número de moles en cada tubo y fijando los parámetros del equipo. En la Figura 4.2.7 se presentan los espectros obtenidos para los tres complejos. El compuesto **1** presenta un espectro axial con un valor de $g_{\parallel} = 2.394$ y $g_{\perp} = 2.134$. Por su parte **2** y **3** son silenciosos debido a un fuerte acoplamiento antiferromagnético, sugiriendo la presencia de puentes magnéticos (imidazolato e hidróxido) en los complejos. Un análisis más detallado de los espectros de EPR y de las modificaciones de éstos en función del pH se presenta en la sección 4.3.2.1.

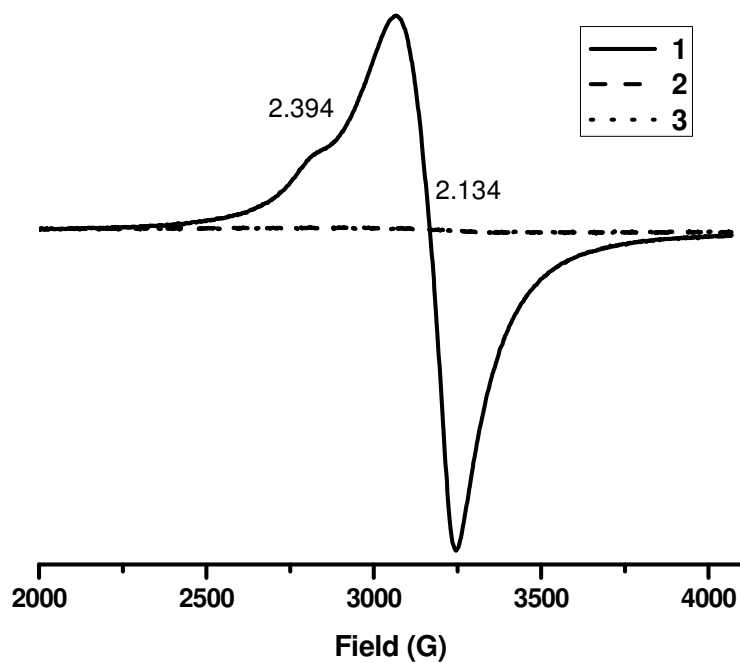


Figura 4.2.7. Espectros de EPR en estado sólido a temperatura ambiente de los complejos **1**, **2** y **3**.

4.2.2.5. Susceptibilidad magnética

La susceptibilidad magnética de los tres sólidos fue medida a temperatura ambiente en una balanza de Gouy, obteniendo un valor de 2.91 MB para el compuesto **1**, 0.73 MB por átomo de cobre, mientras que **2** y **3** presentan un comportamiento diamagnético. El valor de **1** es un valor menor al esperado, probablemente debido a pequeños acoplamientos intermoleculares a lo largo del sólido.

4.2.3. $[\text{Cu}_3(\text{HValbiim})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4)

4.2.3.1 Síntesis

Al buscar una variante de la síntesis del compuesto **2**, se cambió la sal de cobre usada anteriormente por carbonato básico de cobre(II), $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$, con la finalidad de evitar la contaminación de la muestra con los contraiones sobrantes. Esta nueva fuente de cobre(II) funcionaría también como base, proporcionando ocho equivalentes de base por cada dos equivalentes de sal, formando así el compuesto eléctricamente neutro.

En la síntesis de este nuevo complejo se colocan dos equivalentes de $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ con un equivalente de $\text{H}_6\text{Valbiim} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en metanol. Ambos sólidos son prácticamente insolubles, por lo que forman una suspensión, que al dejar en reflujo por 4 días forma una disolución verde. Al final del tiempo de reacción la disolución se filtra, removiendo el sólido remanente (probablemente $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ que no reaccionó). Esta disolución se deja en evaporación lenta, obteniendo después de 12 meses, cristales adecuados para difracción de rayos X. Los cristales verdes obtenidos, con un rendimiento del 35 %, son estables al aire y a la humedad.

4.2.3.2 Caracterización

4.2.3.2.1 Análisis elemental

En la tabla siguiente se muestran los resultados del análisis elemental obtenido para el compuesto **4** y su análisis de TGA para confirmar el porcentaje de agua presente en la muestra.

Tabla 4.2.2. *Análisis elemental para el compuesto trinuclear de cobre(II), 4, [Cu₃(HValbiim)(μ-OH)(H₂O)] • 4H₂O*

4 Cu ₃ C ₃₀ H ₄₆ N ₈ O ₉ • 5H ₂ O			
Elemento	% Exp	% Cal	% Error
C	38.48	38.19	0.8
N	11.48	11.88	3.5
H	5.13	5.98	16.6
TGA	Pérdida del 10.5 % de 50 a 100 °C (5 moléculas de H ₂ O)		

4.2.3.2.2 Reflectancia difusa

El espectro de reflectancia difusa del compuesto **4** muestra tres máximos en la región del ultravioleta. Un máximo en 275 nm, otro en 346 nm asignado a la transferencia de carga de puente hidróxido (Cu-OH-Cu)¹⁰¹ y otro en 386 nm de la transferencia de carga del puente imidazolato (Cu-imid-Cu).¹⁰² En la región del espectro visible, este compuesto muestra dos máximos debidos a las transferencias d-d de los dos tipos de Cu(II) presentes, en 545 y en 655 nm.

4.2.3.2.3 Resonancia paramagnética electrónica.

El espectro de resonancia paramagnética electrónica (**EPR**) del compuesto **4** fue obtenido en sólido a 77 K. Debido al fuerte acoplamiento antiferromagnético existente entre los iones de Cu(II) puenteados por el grupo OH, este compuesto presenta un espectro semejante al de un compuesto mononuclear con un cromóforo CuN₂O₃, mostrando un espectro rómbico con valores de $g_x = 1.97$ $g_y = 2.12$ y $g_z = 2.29$.

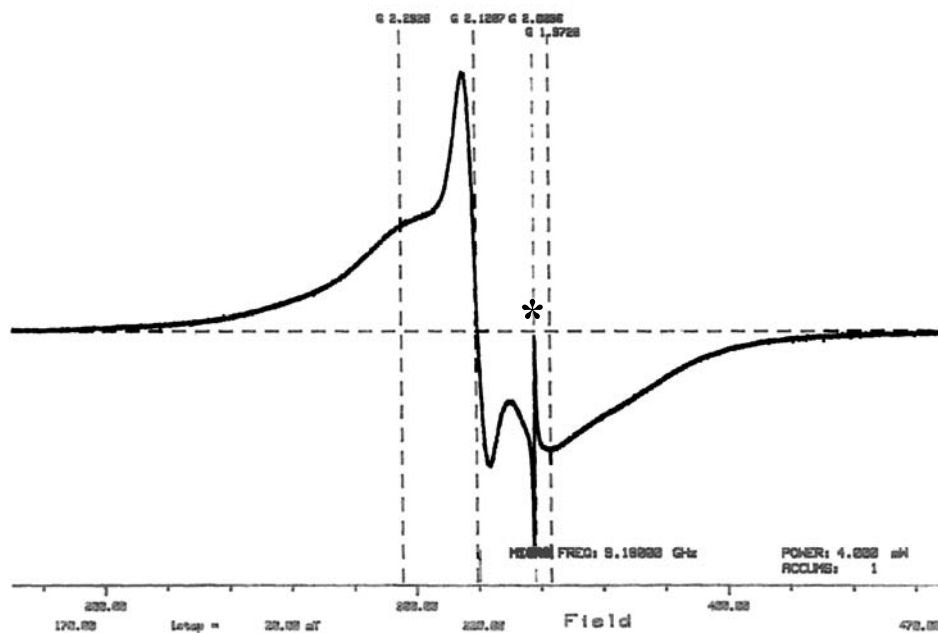


Figura 4.2.8. Espectro de EPR en estado sólido a 77 K del complejos **4**. La señal marcada como (*) corresponde al radical 1,1'-difenil-2-picrilhidrazil (**DPPH**) usado como referencia ($g = 2.0036$).

4.2.3.2.4 Difracción de rayos-X (EXAFS)

El compuesto **4** cristaliza en el grupo espacial hexagonal quiral $P6_122$. Este compuesto contiene tres centros diferentes de Cu(II), etiquetados Cu1, Cu2 y Cu3, coordinados por una sola molécula de ligante monoprotonada $[HValbiim]^{5-}$, con uno de los grupos amino protonados y no coordinados (átomo N39, ver Figura 4.2.9).

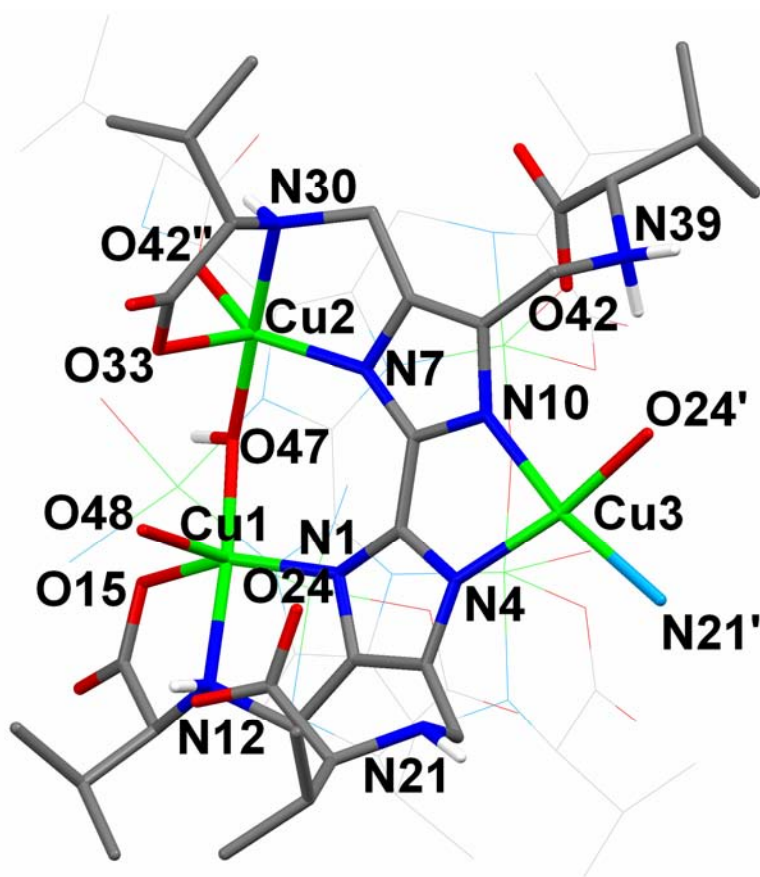


Figura 4.2.9. Estructura de rayos X de la unidad de repetición trinuclear del compuesto $[Cu_3(HValbiim)(\mu-OH)(H_2O)] \cdot 4H_2O$, (4).

En la unidad básica trinuclear (Figura 4.2.9), el Cu1 se encuentra en un ambiente de pirámide de base cuadrada distorsionada ($\tau = 0.33$), cuyo plano base se encuentra formado por dos átomos de nitrógeno, uno imidazólico (N1) y otro de un grupo amino (N12), y un átomo de oxígeno de un grupo carboxilo (O15), todos pertenecientes a la misma molécula de $[HValbiim]^{5-}$. La cuarta posición del plano se encuentra ocupada por un átomo de oxígeno (O47) de una molécula de OH puente y con la posición axial ocupada por una molécula de agua (O48). Las distancias Cu-N y Cu-O se encuentran dentro los intervalos normales para dicha geometría (Tabla 4.2.3).¹⁰³ El valor de los ángulos de enlace refleja la distorsión de la geometría la cual se genera principalmente del pequeño ángulo de mordida de la unidad tridentada N1, N12 y O15 ($N1-Cu1-N12 = 83.7(2)^\circ$ y $N12-Cu1-O15 = 83.4(2)^\circ$). Por su parte, el Cu2 también se encuentra formando parte de un cromóforo pentacoordinado del tipo CuN_2O_3 , pero con una geometría de coordinación intermedia entre

una pirámide de base cuadrada y una bipirámide trigonal ($\tau = 0.52$). La esfera de coordinación del Cu2 está constituida de los átomos donadores N7, N30 y O33 de la misma molécula de $[HValbim]^{5-}$ coordinada al Cu1, y del átomo de oxígeno O47 del grupo hidróxido puente (con una distancia Cu1-Cu2 de 3.540(1) Å). La quinta posición de coordinación alrededor del Cu2 se encuentra ocupada por un átomo de oxígeno de un grupo carboxilato (O42'') de una unidad trinuclear adyacente (Figura 4.2.10). Las distancias de enlace Cu-N y Cu-O (Tabla 4.2.3) pueden considerarse normales para este tipo de ambiente de coordinación.¹⁰⁴ Al comparar las distancias de enlace Cu1-N1 y Cu2-N7 observamos que ésta última es mayor, pese a que ambos átomos de nitrógeno son imidazólicos, esto se debe a la diferencia en la geometría de los iones metálicos.^{103, 104}

Tabla 4.2.3. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para **4**.

Cu1			
Cu1-N1	1.979(5)	Cu1-N12	2.032(5)
Cu1-O15	1.954(4)	Cu1-O47	1.909(4)
Cu1-O48	2.457(5)	Cu1-Cu2	3.540(1)
N1-Cu1-N12	83.7(2)	N12-Cu1-O15	83.4(2)
O15-Cu1-O47	92.9(2)	O47-Cu1-N1	101.3(2)
N1-Cu1-O15	154.7(2)	O15-Cu1-O48	106.6(2)
O48-Cu1-N1	93.8(2)		
Cu2			
Cu2-N7	2.030(5)	Cu2-N30	2.039(5)
Cu2-O33	2.153(5)	Cu2-O42''	2.077(4)
Cu2-O47	1.899(5)		
N7-Cu2-N30	81.4(2)	N30-Cu2-O42''	92.5(2)
O42''-Cu2-O47	90.0(2)	O47-Cu2-N7	97.0(2)
N7-Cu2-O42''	146.0(2)	O42''-Cu2-O33	109.4(2)
O33-Cu2-N7	102.5(2)		
Cu3			
Cu3-N4	2.028(5)	Cu3-N10	1.970(5)
Cu3-N21'	2.042(5)	Cu3-O24'	1.953(4)
N4-Cu3-N10	81.4(2)	N10-Cu3-N21'	91.4(2)
N21'-Cu3-O24'	83.4(2)	O24'-Cu3-N4	105.5(2)

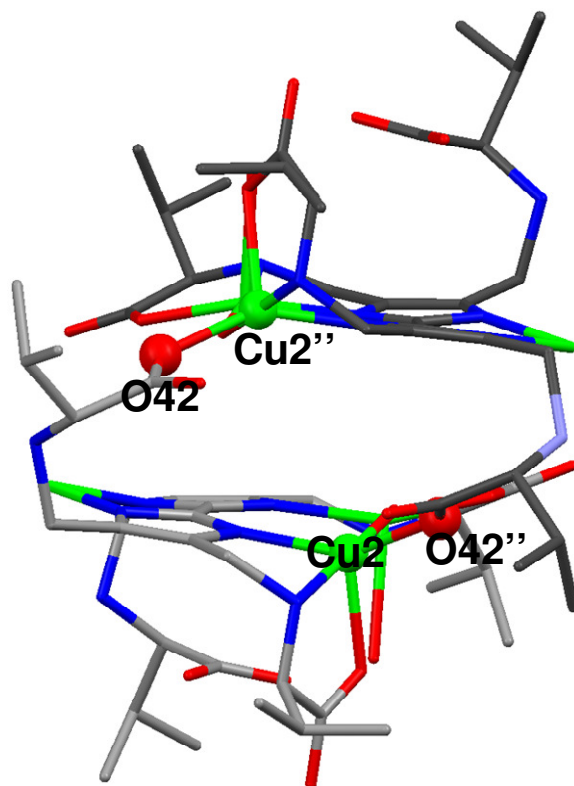


Figura 4.2.10. *Dimerización de 4 generada por un doble puente, a través de los enlaces de coordinación entre Cu2-O42'' y Cu2''-O42*

Como se mencionó anteriormente, el núcleo Cu2 está conectado a una unidad trinuclear adyacente a través del átomo O42'' de otra unidad de ligante, similarmente, el átomo vecino Cu2'' está coordinado por el átomo de oxígeno O42 de la primera molécula de ligante. El doble puente resultante (nombrado Cu2-O42'' y Cu2''-O42) conlleva a la formación de una entidad hexanuclear que se ilustra en la Figura 4.2.10.

La coordinación de un átomo donador (i.e. O42'') de una segunda molécula de ligante [HValbiim]⁵⁻ hacia el átomo Cu2 genera una fuerte distorsión (comparada con el Cu1), la cual se refleja en el modo de coordinación de la unidad N7, N30 y O33. De hecho, mientras que los átomos N1, N12 y O15 de la unidad tridentada equivalente están casi en el mismo plano que Cu1, no es el caso para N7, N30 y O33 con el Cu2. Más aún, el átomo O33 se encuentra ahora fuera del plano de los átomos N7 y N30 (Figura 4.2.9). El ángulo

entre los planos constituidos por N30 Cu2 N7 y N30 Cu2 O33 es de 76 °, mientras que el valor correspondiente para el Cu1 es de 22 °.

El tercer ion de cobre(II), nombrado Cu3, se encuentra en un ambiente de plano cuadrado ligeramente distorsionado, coordinado por tres átomos de nitrógeno y uno de oxígeno provenientes de dos moléculas de ligante distintas (Figura 4.2.9). Los valores de las distancias Cu-N y Cu-O están entre los intervalos típicos encontrados para los cromóforos del tipo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{N}_3\text{O}$.¹⁰⁵ Como se mencionó, Cu3 está coordinado por dos moléculas de ligante: como resultado, Cu3 se encuentra puenteando la unidad hexanuclear con otra unidad hexanuclear adyacente, obteniendo como resultado una fascinante cadena monodimensional (Figura 4.2.11). Esta cadena polimérica infinita es generada por bloques hexanucleares unidos a través de dos iones de cobre(II) (Cu3/Cu3', Cu3''/Cu3''', etc.)

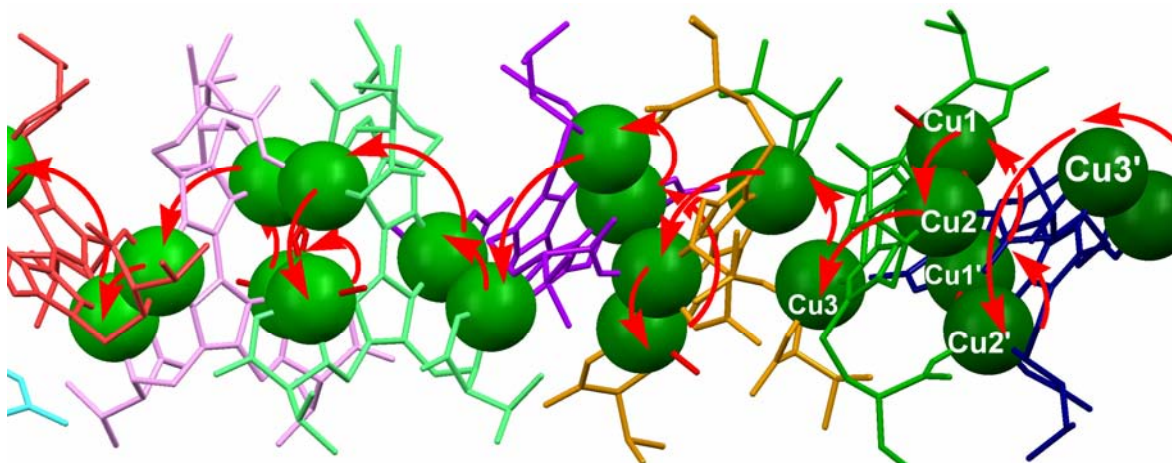


Figura 4.2.11. Arreglo espacial de los iones de Cu(II) a lo largo del polímero, formando un metalohelicato.

Una inspección detallada de los iones de cobre(II) a lo largo de las cadenas revela un alto arreglo de estos centros metálicos a lo largo del polímero. De hecho, los iones de Cu(II) forman una metalohélice que gira en contra de las manecillas del reloj, como se observa en las Figuras 4.2.11 y 4.2.12. Cada giro de la cadena está constituido por doce unidades de $[\text{HValbiim}]^{5-}$.

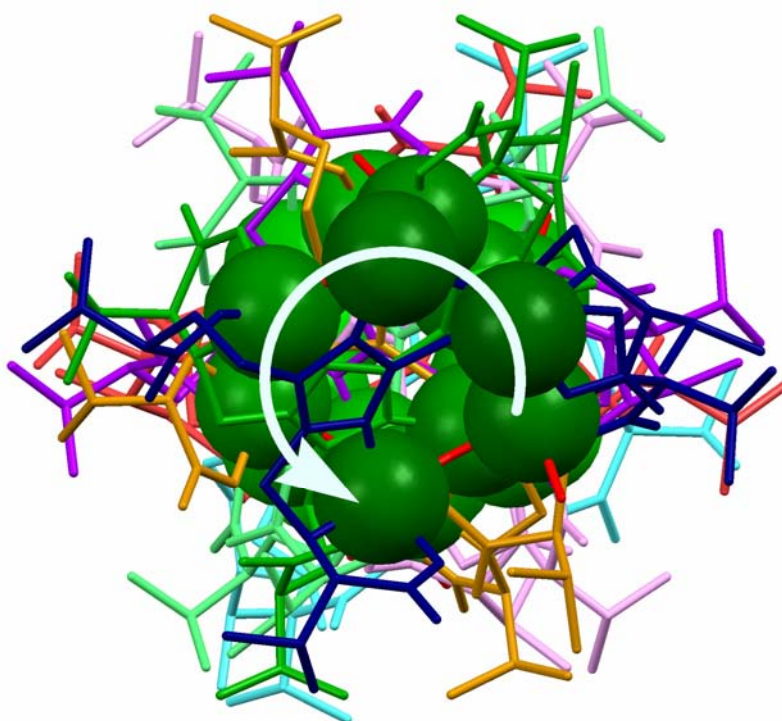


Figura 4.2.12. Vista a través del eje *c* de la cadena del metalohelicato en donde se observa el giro en contra de las manecillas del reloj (**M**).

El empaquetamiento cristalino de **4** a lo largo del eje *c* (Figura 4.2.13) muestra que las cadenas infinitas en 1D están orientadas de manera paralela. Las hélices paralelas se encuentran separadas unas de otras, sobre todo como resultado de una restricción estérica creada por los residuos isopropílicos de los ligantes. Los intersticios creados entre las cadenas se encuentran completamente ocupados por moléculas de agua, las cuales se encuentran en una intrincada red de puentes de hidrógeno parecida a la observada en las estructuras cristalinas de proteínas. Es importante destacar que todas las hélices presentan una configuración **M** (giro a la izquierda),¹⁰⁶ lo cual se debe a que la materia prima usada es enantioméricamente pura.

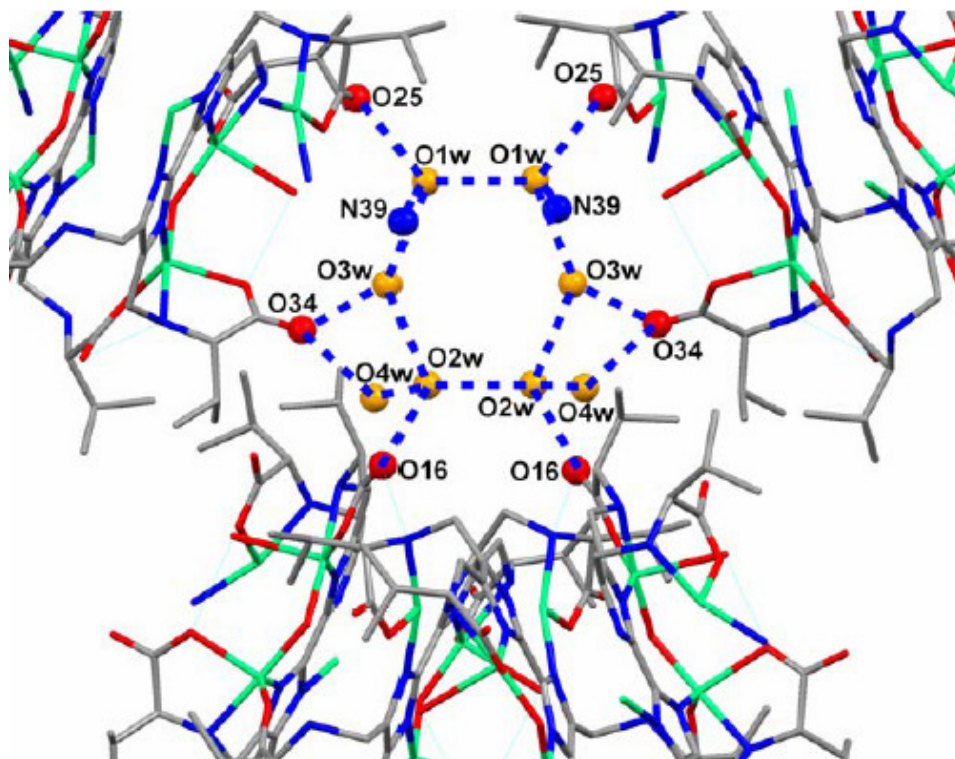
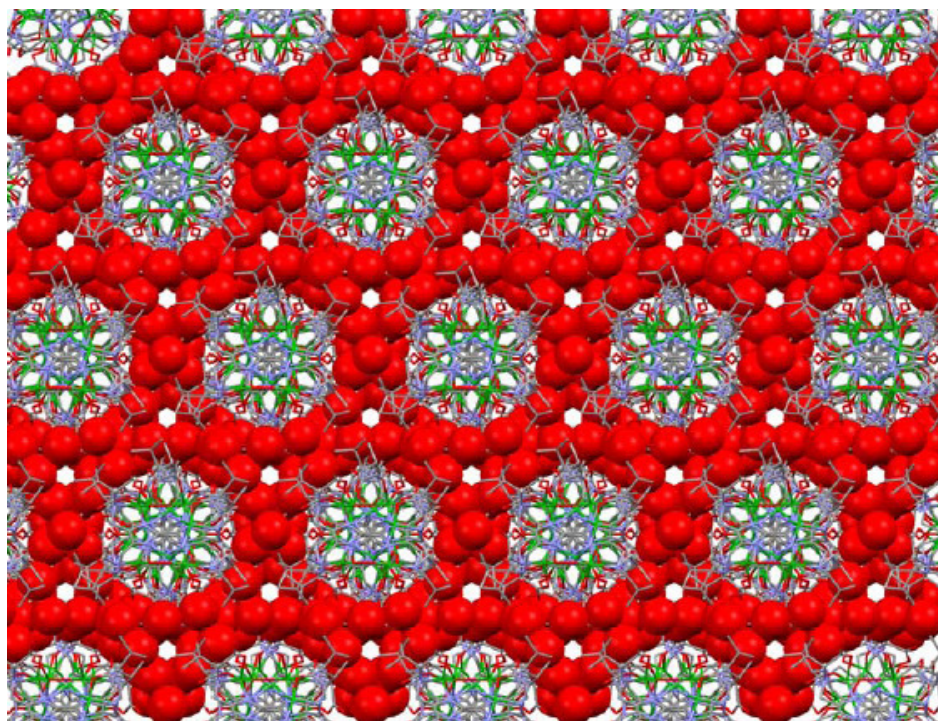


Figura 4.2.13. (Arriba) Vista del empaquetamiento cristalino a lo largo del eje *c* del compuesto **4** en la cual se observa que las moléculas de agua se encuentran ocupando los espacios entre las cadenas elípticas y (Abajo) una vista del arreglo de puentes de hidrógeno observados.

4.2.3.2.5 Propiedades magnéticas (MAGSUS)

Las propiedades magnéticas del compuesto **4** se estudiaron en el intervalo de temperatura de 2 a 350 K y se presentan en la Figura 4.2.14 como $\chi_M T$ vs T adicionalmente se presenta la curva de M vs H a 2 K (siendo χ_M la susceptibilidad magnética molar por unidad trinuclear, *i.e.* Cu₃, y M la magnetización).

A 350 K el valor del producto $\chi_M T$ es cercano a $0.84 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$, valor significativamente menor al esperado para tres iones con $S = \frac{1}{2}$ no acoplados ($1.125 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$ para un valor de $g = 2$), indicando la presencia de fuertes interacciones antiferromagnéticas. De hecho, el producto $\chi_M T$ disminuye al descender la temperatura hasta alcanzar una meseta ca. $0.41 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$ en el intervalo de 20 K a 60 K, valor que está de acuerdo con el esperado para un estado de espín doblete ($S = \frac{1}{2}$, $0.375 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$ para un valor de $g = 2$). Por debajo de los 20 K, se observa una disminución posterior hasta alcanzar un valor de $0.22 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$ a 2 K, lo que evidencia una interacción antiferromagnética débil entre los estados doblete restantes. Analizando el recuadro en la Figura 4.2.14, se observa que el valor de la magnetización alcanza un valor de saturación de $0.95 \mu_B$ a 2 K.

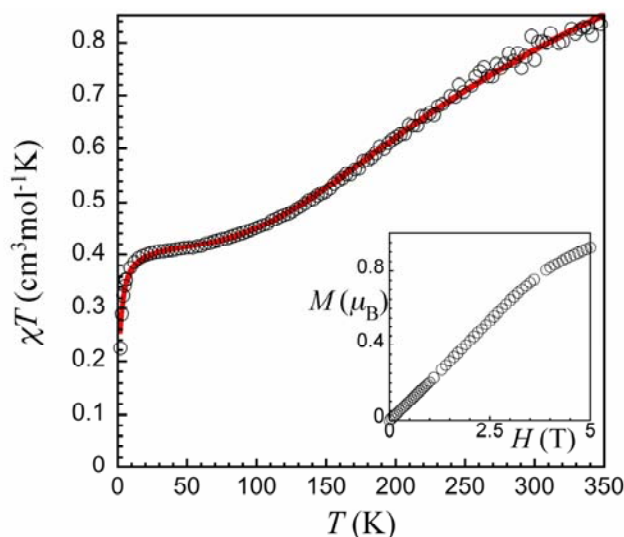


Figura 4.2.14. Gráfica de $\chi_M T$ versus T del compuesto **4** en el intervalo de temperatura de 0 a 350 K a 5000 G. (O) Datos experimentales; (—) mejor ajuste. En el recuadro se presenta la gráfica de magnetización en función del campo aplicado a 2 K.

La presencia de un puente hidróxido en el centro trinuclear del compuesto **4** contribuye al fuerte acoplamiento antiferromagnético observado,¹⁰¹ mientras que el acoplamiento a través de los puentes imidazolato del biim²⁻, que se espera sea de naturaleza también antiferromagnética, contribuye con una menor intensidad.¹⁰⁷ Ambas interacciones dan como resultado un esquema de interacciones en forma de triángulo isósceles (Figura 4.2.15) el cual daría como resultado el estado doblete observado a temperaturas mayores a 20 K. La subsiguiente disminución a valores menores de temperatura, sólo puede ser atribuida a un débil acoplamiento a través de los puentes carboxilato a lo largo de la hélice entre los átomos de Cu3.

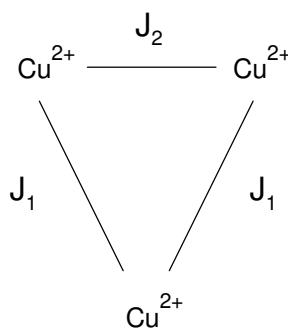


Figura 4.2.15. Esquema de interacciones magnéticas presentes en el compuesto **4** en forma de triángulo isósceles.

De acuerdo con estas suposiciones basadas en consideraciones magnetoestructurales, se simuló exitosamente los datos experimentales con un modelo que contempla las interacciones en un triángulo isósceles el cual a su vez interactúa débilmente a lo largo de una cadena en una dimensión. Esta última interacción fue tomada en cuenta a través de la aproximación de campo medio.

El Hamiltoniano de espín para las interacciones de tres centros paramagnéticos colocados en un triángulo isósceles (Figura 4.2.15) puede escribirse de la siguiente forma:

$$H = -J_1(S_1 \cdot S_2 + S_1 \cdot S_3) - J_2(S_2 \cdot S_3)$$

Donde J_2 representa la constante de acoplamiento a través del puente hidróxido (*i.e.* Cu1-OH-Cu2), mientras que se asume que ambas interacciones a través de los puentes imidazolato (*i.e.* Cu1-biim-Cu3 y Cu2-biim-Cu3) son similares y están descritas por la constante de acoplamiento J_1 .

Las energías de los diferentes estados son entonces:

$$E(S, S') = -J_1 S(S+1) - (J_2 - J_1) S'(S'+1)$$

Con $S' = S_1 + S_1'$,

lo cual, al usar la ecuación de van Vleck,¹⁰⁸ nos lleva a la siguiente ecuación para la susceptibilidad magnética:

$$\chi_{tri} = \frac{Ng^2\mu_B^2}{4k_B T} \frac{\left[1 + \exp\left(\frac{J_1 - J_2}{k_B T}\right) + 10 \exp\left(\frac{3J_1}{2k_B T}\right) \right]}{\left[1 + \exp\left(\frac{J_1 - J_2}{k_B T}\right) + 2 \exp\left(\frac{3J_1}{2k_B T}\right) \right]}$$

Donde χ_{tri} es la susceptibilidad magnética molar por unidad trinuclear, J_1 y J_2 son las constantes de acoplamiento anteriormente descritas, g es la constante giromagnética, μ_B es el magnetón de Bohr, N el número de Avogadro y k_B la constante de Boltzmann.

Por una limitante en el número de parámetros variables se consideró un mismo valor de g para los tres iones de Cu(II).

Después de incluir las interacciones entre las unidades trinucleares usando la aproximación de campo medio y de incluir un término para el paramagnetismo independiente de la temperatura (**TIP**), la expresión resultante para ajustar los datos experimentales es:

$$\chi = \frac{\chi_{tri}}{1 - \frac{2zJ}{Ng^2\mu_\beta^2} \chi_{tri}} + TIP$$

El mejor conjunto de parámetros obtenido fue: $g = 2.11(1)$, $J_1/k_B = -260(10)$ K para las interacciones Cu1-biim-Cu3 y Cu2-biim-Cu3, $J_2/k_B = -335(5)$ K para la interacción Cu1-OH-Cu2 y un valor de $zJ/k_B = -1.3(1)$ K correspondiente a la interacción inter-[Cu₃]. El valor de J_2 es consistente con el valor esperado para un puente hidróxido y para el ambiente de coordinación de los núcleos Cu1 y Cu2.¹⁰¹ Así, mientras que a altas temperaturas el comportamiento magnético de **4** está dominado por la fuerte interacción antiferromagnética a través del puente hidróxido, a temperaturas menores a 55 K el comportamiento de **4** puede describirse como un ensamble unidimensional de espines $S = \frac{1}{2}$ acoplados antiferromagnéticamente. Para confirmar el comportamiento magnético de cadena unidimensional de **4** se trazó la gráfica de $\ln\chi_M T$ vs T^{-1} en la cual se observa un comportamiento lineal en el intervalo de temperaturas deseado (Figura 4.2.16),¹⁰⁹ lo que concuerda perfectamente con la estructura en hélices aisladas que presenta **4**.

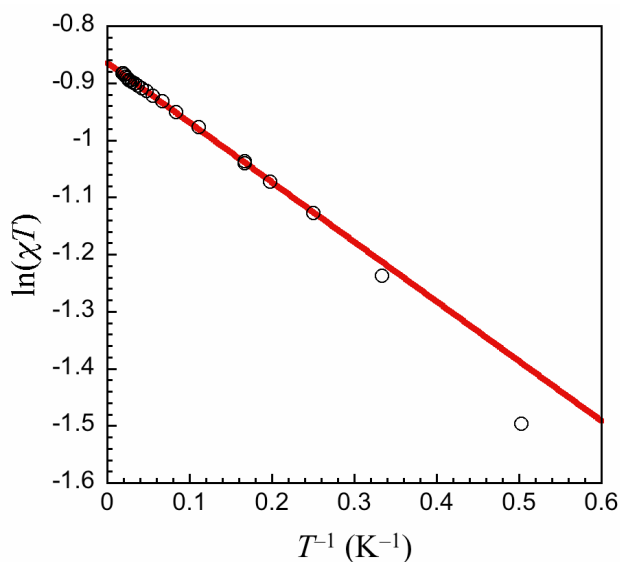


Figura 4.2.16. Gráfica del $\ln(\chi_M T)$ vs $1/T$ del compuesto **4** en el intervalo de temperaturas de 60 a 2 K, en el cual se observa una variación lineal indicando un comportamiento de cadena unidimensional.

4.3. Estudios en disolución

4.3.1. Constantes de equilibrio

Uno de los factores principales, tanto en la síntesis de los compuestos polinucleares (ver sección 4.2) como en la actividad catalítica de éstos (ver sección 4.3.3), es el grado de acidez del medio, por lo que es primordial la determinación de las distintas especies en disolución en función del pH. Para determinar las constantes de formación de los complejos (β) es indispensable conocer las constantes de acidez de los ligantes (K_a), por lo que el primer paso es determinar éstas. Las constantes de equilibrio, normalmente expresadas en su forma logarítmica (pK_a y $\log\beta$), fueron determinadas mediante titulaciones potenciométricas en disolución acuosa a 25 °C con una fuerza iónica constante de 0.1 M (KNO_3), usando como titulante NaOH 0.1 N. Los datos potenciométricos obtenidos fueron ajustados con ayuda del programa Hyperquad 2003.^{110, 111}

4.3.1.1. Constantes de acidez (pK_a s)

Como se mencionó con anterioridad, estos ligantes exhiben una amplia gama de sitios capaces de presentar reacciones ácido-base. Con la finalidad de proponer un buen modelo inicial al cual ajustar los datos obtenidos, es importante analizar cuidadosamente la estructura de los ligantes. La Figura 4.3.1 muestra una representación esquemática general de los ligantes tetranucleantes en donde se aprecia que éstos contienen cuatro tipos de grupos funcionales distintos. En primer lugar observamos la presencia de cuatro grupos carboxílicos, así como cuatro aminas secundarias, ambos derivados de los α -aminoácidos empleados. Es bien conocido que los grupos carboxílicos de los α aminoácidos presentan pK_a s cercanos a 2, mientras que las aminas secundarias α a un carboxilo presentan pK_a s alrededor de 9.¹¹² Por otro lado, se observa la presencia de dos anillos imidazólicos. En los imidazoles se presentan dos átomos de nitrógeno distintos. Uno de ellos se encuentra desprotonado y es susceptible a la protonación en un pH entre 4 y 6, mientras que el otro se encuentra protonado y presenta normalmente un pK_a mayor a 14.¹¹² Cabe mencionar que

debido a los valores de pK_a de las aminas y de los carboxilos, la forma eléctricamente neutra será la especie zwitteriónica, en la cual las aminas se encontrarán protonadas mientras que los carboxilos estarán desprotonados.

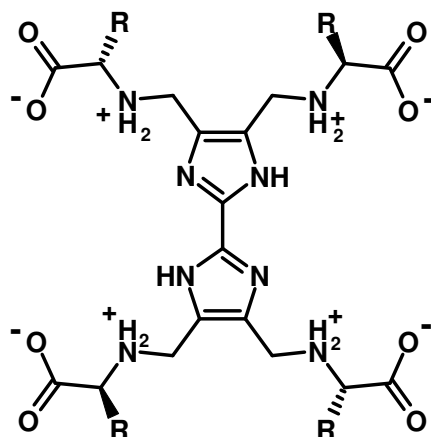


Figura 4.3.1. Representación esquemática general de los ligantes tetranucleantes en su forma zwitteriónica.

Para determinar las constantes de acidez de los ligantes, es necesario adicionar un exceso de ácido a la disolución de éstos, con la finalidad de protonarlos al máximo, debido a que los ligantes son aislados en su forma eléctricamente neutra (especie H_6L), es decir con sólo 6 de las 12 protonaciones probables ($H_{12}L^{6+}$). Para ello, se agregaron los seis equivalentes de ácido restantes más un equivalente de exceso, dando como resultado siete equivalentes de ácido añadido. Dada la baja solubilidad en agua de algunos de los ligantes sintetizados, sólo fue posible determinar las constantes de acidez para los ligantes $H_6Alabiim$ y $H_6Valbiim$.

En la Figura 4.3.2 se muestra una curva de titulación típica del ligante $H_6Valbiim$ al cual se le agregaron siete equivalentes de HNO_3 y ésta es comparada con las titulaciones de siete y once equivalentes de estándar de HNO_3 .

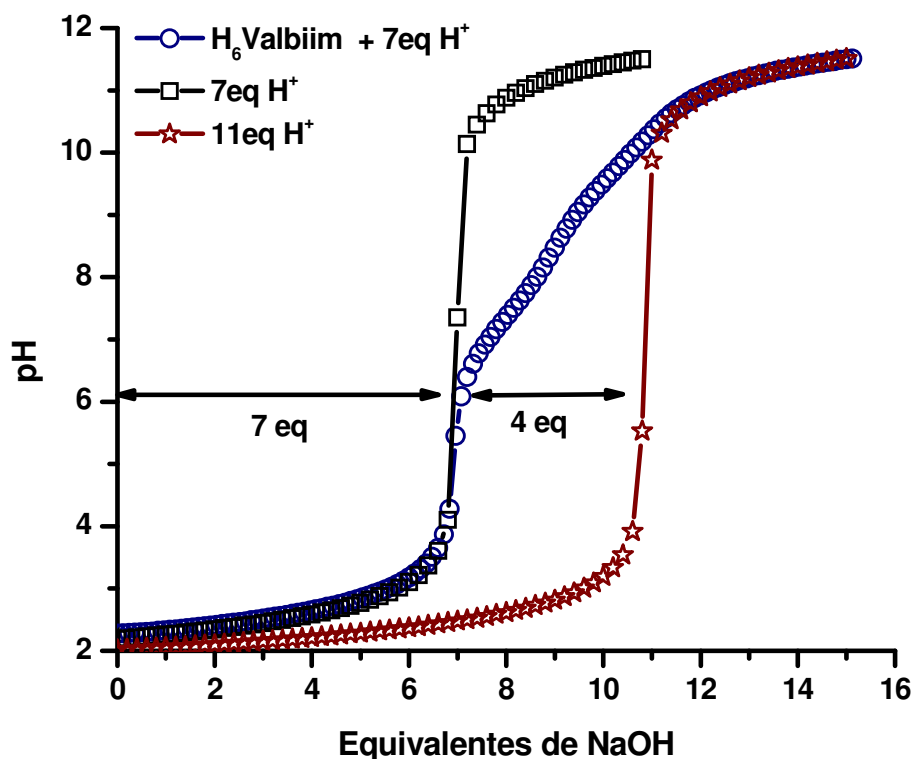


Figura 4.3.2. Curvas de titulación experimentales. La curva negra (-□-) corresponde a la titulación de siete equivalentes de ácido libre, mientras que la curva roja (-★-) corresponde a once equivalentes. La curva azul (-○-) corresponde a 1 equivalente de ligante ($H_6Valbiim$) más siete equivalentes de ácido fuerte. Las titulaciones fueron realizadas a 25 °C y una fuerza iónica 0.1 M (KNO_3). $[H_6Valbiim]_{total} = 1$ mM.

Comparando la curva de titulación de la disolución del ligante que contiene 7 equivalentes de ácido, con la curva del estándar de HNO_3 de 7 equivalentes, se observa que estas dos curvas son prácticamente iguales hasta el primer punto de equivalencia (correspondiente a 7 equivalentes). Esta similitud entre ambas curvas implica una nula interacción entre el ligante y los protones adicionados, ya que éstos presentan un comportamiento de ácido libre como en el caso del HNO_3 solo. Ahora bien, si se compara la curva de titulación del ligante con la curva del estándar de 11 equivalentes, éstas son prácticamente iguales en la parte final de la titulación, lo que implica que después de haber titulado los 7 equivalentes de ácido añadido, se titulan 4 equivalentes más, hasta llegar al final de la titulación.

Con este sencillo análisis se puede proponer un modelo inicial el cual contemple la pérdida sucesiva de 4 protones en el ligante. Es importante mencionar que esto es válido en el intervalo de trabajo estudiado, el cual es de pH 2 a pH 12, y que los otros grupos tendrán un valor de pK_a menor a 2 o mayor a 12 según sea el caso. Este mismo análisis se realizó con el ligante $H_6Alabiim$ obteniendo resultados similares.

Después del tratamiento de los datos, fue posible determinar 4 valores de pK_a , tanto para el ligante $H_6Alabiim$ como para el ligante $H_6Valbiim$. Estos valores son enlistados en la Tabla 4.3.1 y en la Figura 4.3.3 se presenta los diagramas de predominio de especies obtenido con ellos.

Tabla 4.3.1. Valores de pK_a determinados para los ligantes $H_6Alabiim$ y $H_6Valbiim$ a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M (KNO_3).

Equilibrio	pK_a	
	$H_6Alabiim$	$H_6Valbiim$
$H_6L \rightleftharpoons H_5L^- + H^+$	7.06 ± 0.10	6.90 ± 0.02
$H_5L^- \rightleftharpoons H_4L^{2-} + H^+$	8.31 ± 0.09	7.66 ± 0.02
$H_4L^{2-} \rightleftharpoons H_3L^{3-} + H^+$	9.25 ± 0.08	9.10 ± 0.01
$H_3L^{3-} \rightleftharpoons H_2L^{4-} + H^+$	11.81 ± 0.06	9.83 ± 0.01

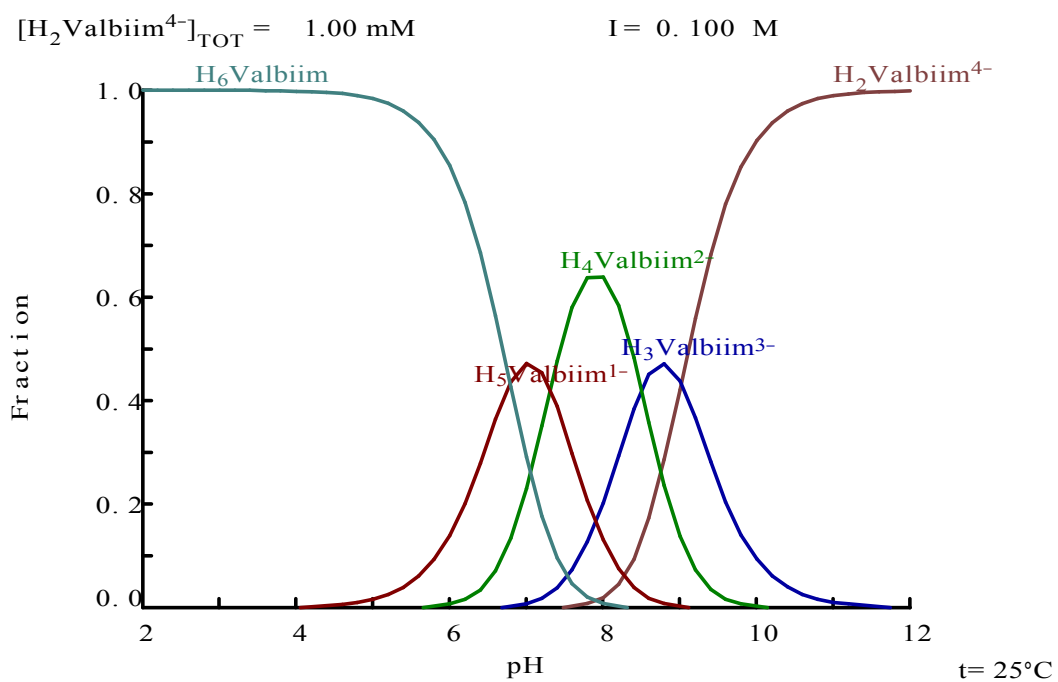
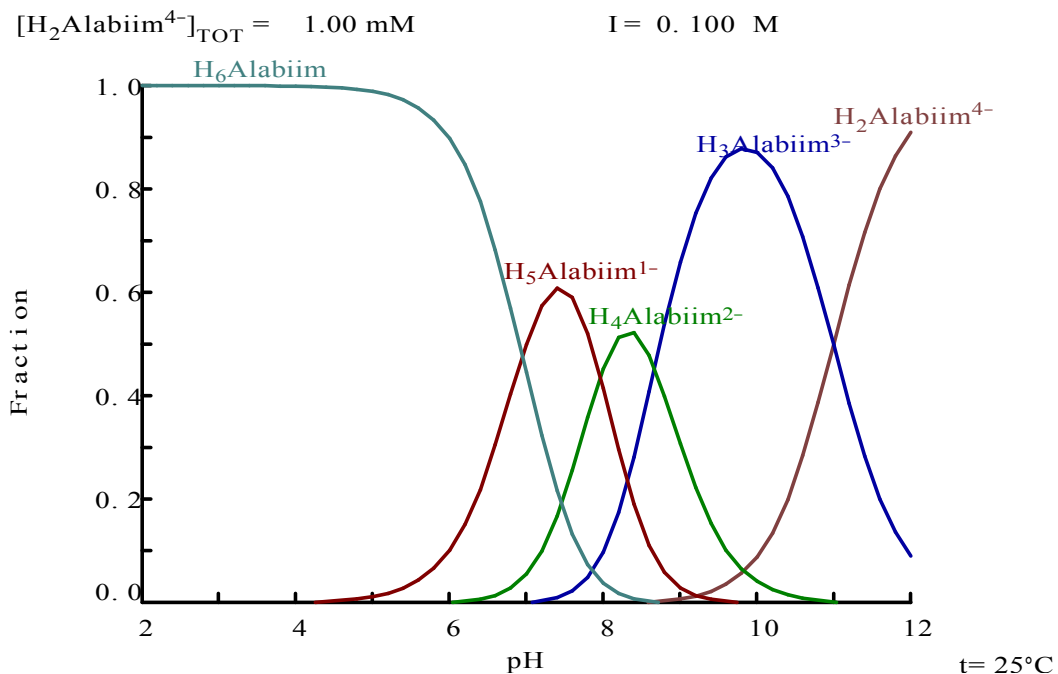


Figura 4.3.3. Diagramas de predominio de especies para los ligantes $\text{H}_6\text{Alabiim}$ (arriba) y $\text{H}_6\text{Valbiim}$ (abajo) con una concentración total de ligante 1 mM a 25°C y fuerza iónica 0.1 M (KNO_3). $[\text{H}_6\text{Valbiim}]_{\text{total}} = 1 \text{ mM}$.

Como ya se mencionó con anterioridad, los valores de pK_a de la desprotonación del grupo imidazol para formar un grupo imidazolato, suelen ser mayores a 14, por lo que no se esperaba poder determinarlos en este estudio. De igual forma, no es sorprendente que los valores de pK_a para los grupos carboxílicos sean menores a 2, sin embargo se esperaba determinar tanto los valores de pK_a de las aminas como de la protonación de los anillos imidazólicos, por lo que se esperaban seis valores. Esta imposibilidad de refinar pK_a s menores sugiere la existencia de fuertes puentes de hidrógeno intramoleculares, los cuales imposibilitan posteriores protonaciones en el ligante.

Otro punto a destacar, es el hecho de que el ligante $H_6Alabiim$ presenta valores de pK_a mayores a los del ligante $H_6Valbiim$. De éstos destacan la primera y la tercera protonación, ya que la diferencia presentada entre ambos ligantes es cercana a 2 y 0.7 unidades, respectivamente, mientras que para el resto de los pK_a s es menor a 0.2 unidades. Esta diferencia puede deberse al menor carácter hidrofóbico del ligante $H_6Alabiim$, el cual es un factor que se sabe influye en los aminoácidos solos, en los que se observan diferencias de 0.2 unidades y hasta de media unidad con aminoácidos más hidrofóbicos como la fenilalanina,¹¹² por lo que esta diferencia de dos unidades deberá ser ocasionada por algún factor que englobe la estructura del ligante, como alguna conformación preferente.

4.3.1.2. Asignación de las constantes de acidez

Los valores de pK_a encontrados fueron asignados mediante un experimento de RMN 1H en función del pH. Este experimento se basa en los cambios observados en el desplazamiento químico de las señales cercanas a los grupos que presentan el intercambio protónico. Cuando un grupo se protona o desprotona, su ambiente electrónico es modificado y por consiguiente el de los grupos vecinos. Entre más cercanos se encuentren éstos, mayor será el cambio en el ambiente electrónico y por tanto el cambio en el desplazamiento químico observado.

Seguindo esta lógica, se esperaría observar un cambio idéntico en la señal del metileno y del carbono α si los 4 pK_a s correspondieran a las protonaciones de las cuatro aminas. Mientras que si la protonación corresponde al anillo imidazólico sólo se esperaría cambio en la señal del metileno en la zona de algún pK_a . En la Figura 4.3.4 se muestran los cambios en los desplazamientos químicos de cada una de las señales del ligante $H_6Valbiim$ en función del pH

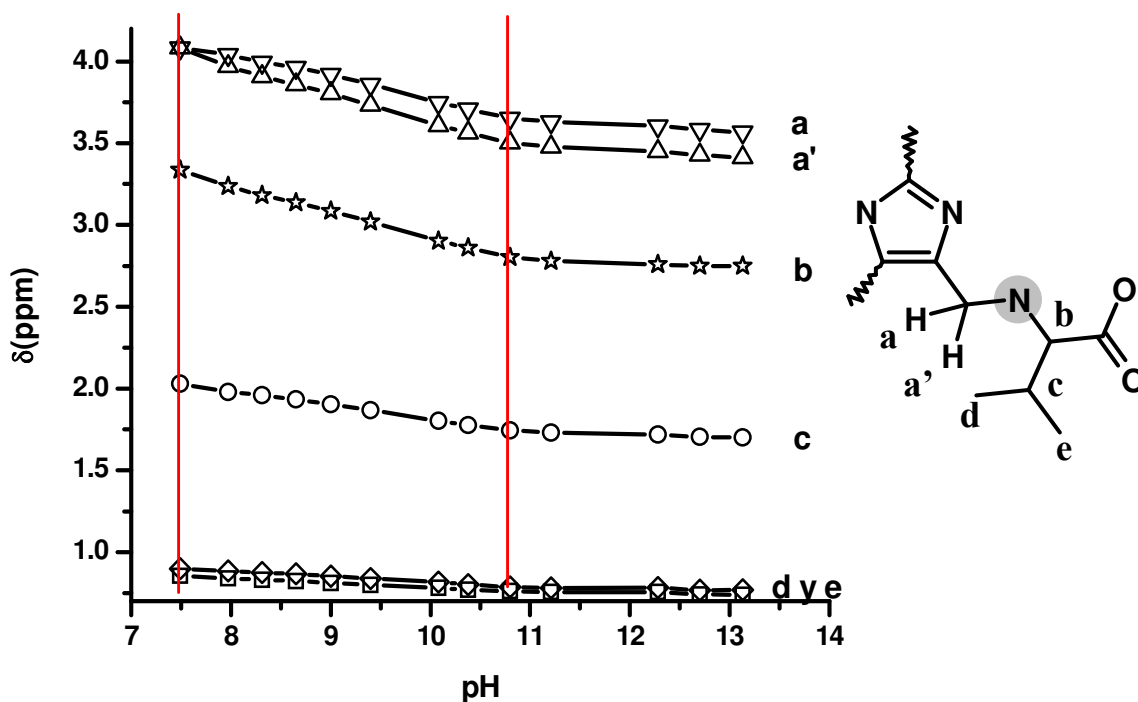


Figura 4.3.4. Cambio en el desplazamiento químico de las señales observadas en 1H RMN del ligante $H_6Valbiim$ en función del pH. Las señales correspondientes a los protones *a*, *a'* y *b* muestran un mayor cambio en el desplazamiento químico, indicando su cercanía al grupo que sufre el intercambio protónico.

Como puede observarse en la Figura 4.3.4, el cambio en las señales de los protones del metileno y del carbono α es igual (mismo comportamiento y magnitud) a lo largo de todo el experimento. También es posible observar un cambio gradual en la señal de los protones del carbono β y de los metilos que se hace más sutil conforme el grupo se aleja de la amina. Este cambio no se podría observar de tratarse de una protonación en el anillo imidazólico por la lejanía de estos grupos. Con base en esto, los cuatro valores de pK_a

pueden asignarse de manera inequívoca a las cuatro protonaciones de las aminas del ligante.

Por otro lado, se observa que la señal de los metilenos presenta un acoplamiento AB, el cual aumenta al incrementar el pH, hasta llegar a un máximo por arriba del último valor de pK_a determinado. La Figura 4.3.5 muestra el cambio en la intensidad del acoplamiento AB al variar el pH. La aparición de este acoplamiento manifiesta una rigidez en el sistema, haciendo que los dos protones dejen de ser indistinguibles. Esto apoya la hipótesis de los puentes de hidrógeno intramoleculares, los cuales provocarían una rigidez en el sistema por la formación de un anillo (Figura 4.3.5) y así, provocar la aparición del acoplamiento AB.

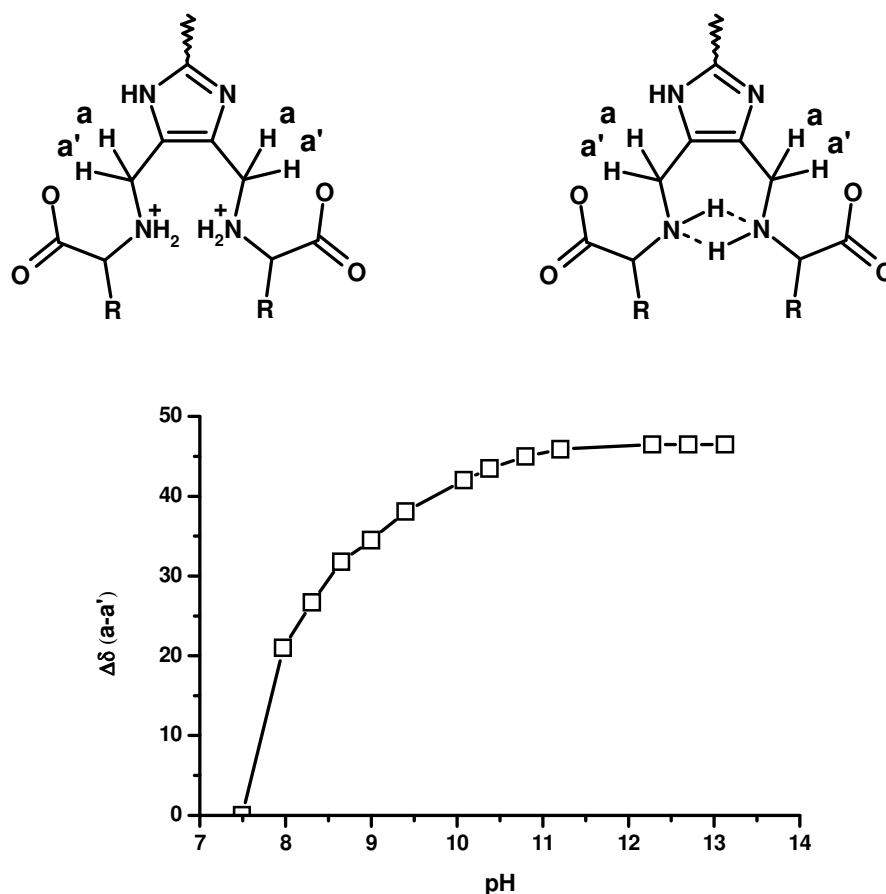


Figura 4.3.5. Cambio en la magnitud del acoplamiento AB de los protones a y a' del ligante H₆Valbiim al variar el pH, debida a la aparición de puentes de hidrógeno al aumentar el pH.

4.3.1.3. Constantes de formación ($\log\beta$)

Una vez obtenidos los valores de pK_a para los ligantes, es posible determinar las constantes de formación de los complejos ($\log\beta$). Para ello, se realizó nuevamente un estudio potenciométrico en el cual se disolvió el ligante, en su forma H_6L , en presencia de cuatro equivalentes de Cu^{2+} y siete equivalentes de HNO_3 . Los resultados de esta titulación se muestran en la Figura 4.3.6 y son comparados con los estándares de siete y once equivalentes de HNO_3 y con la titulación del ligante con siete equivalentes de ácido.

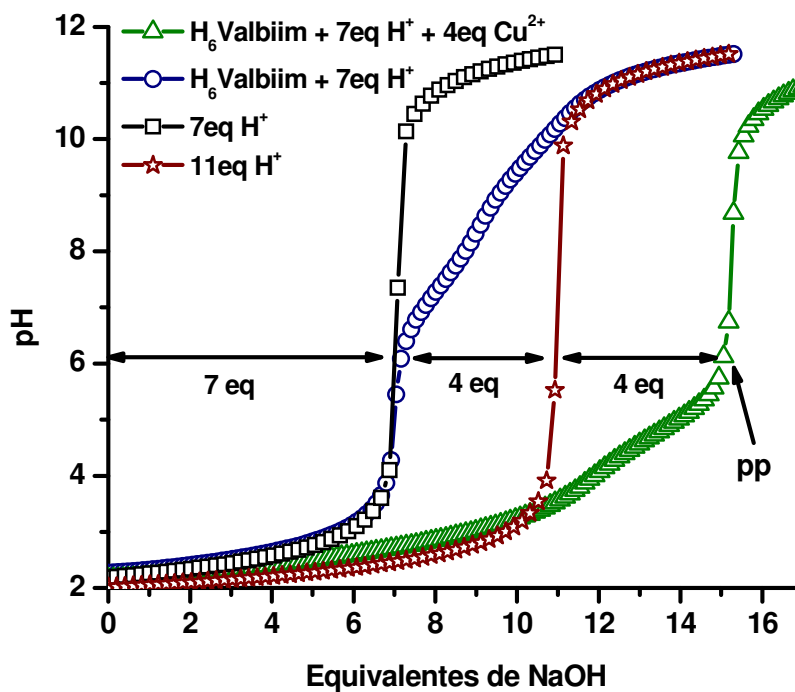


Figura 4.3.6. Curvas de titulación experimentales. La curva negra (- \square -) corresponde a la titulación de siete equivalentes de ácido libre, mientras que la curva roja (- \star -) corresponde a once equivalentes. La curva azul (- O -) corresponde a 1 equivalente de ligante ($H_6Valbiim$) más siete equivalentes de ácido fuerte mientras que la curva verde (- Δ -) corresponde a la mezcla de un equivalente de ligante más siete equivalentes de ácido fuerte y 4 equivalentes de $Cu(II)$. Las titulaciones fueron realizadas a 25 °C y una fuerza iónica 0.1 M (KNO_3). $[H_6Valbiim]_{total} = 1\text{ mM}$ y $[Cu(II)]_{total} = 4\text{ mM}$.

Comparando las curvas de titulación de $H_6Valbim$ en presencia y en ausencia de Cu^{2+} se observa un cambio drástico en el comportamiento de los 4 protones titulables del ligante. Estos protones se vuelven ácidos fuertes y ahora son titulados como ácido libre. Esto se corrobora al comparar la curva de titulación del estándar de once equivalentes con la del ligante en presencia de Cu^{2+} , las cuales son similares antes del primer punto de equivalencia, lo que significa la titulación de once equivalentes de ácido libre, es decir cuatro equivalentes más que el ácido añadido. Este aumento tan radical en la acidez de los protones del ligante, implica que las aminas se desprotonan para coordinarse a los iones metálicos.

Ahora bien, si comparamos nuevamente la curva de titulación de once equivalentes de ácido con la curva de $H_6Valbim$ en presencia de Cu^{2+} , se aprecia que después del primer punto de equivalencia es posible titular 4 equivalentes más, hasta llegar al punto de precipitación (pp.), habiendo titulado así, un total de 15 equivalentes de protones, lo que significa 8 equivalentes en el complejo. Haciendo un análisis algebraico de las cargas, es fácil comprender que la especie que aparece en el punto de precipitación es una especie eléctricamente neutra, con cuatro iones de Cu^{2+} (ocho cargas positivas) y 8 pérdidas de protones (ocho cargas negativas).

El ajuste y refinamiento de los datos permitió obtener cinco constantes de equilibrio, correspondientes a cinco distintos estados de protonación del complejo tetranuclear. A continuación se muestran los equilibrios correspondientes a la formación de la especie $Cu_4H_2L^{4+}$ y sus sucesivas desprotonaciones. Los valores de las constantes son enlistados en la Tabla 4.3.2.

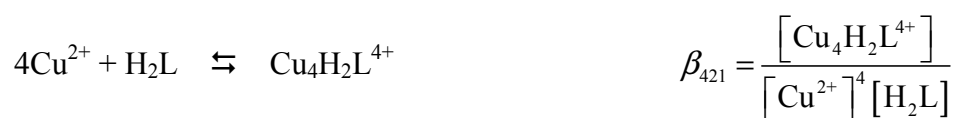




Tabla 4.3.2. Valores de constante de formación ($\log\beta$) e hidrólisis (pK_a) determinados para los compuestos tetranucleares con los ligantes $H_6\text{Alabiim}$ y $H_6\text{Valbiim}$ a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M (KNO_3).

$\beta_{xyz} = \frac{[\text{Cu}_x^{2+}\text{H}_y\text{L}_z]}{[\text{Cu}^{2+}]^x [\text{H}]^y [\text{L}]^z}$			
$H_6\text{Valbiim}$		$H_6\text{Alabiim}$	
$\log \beta_{421} = 33.27 \pm 0.01$		$\log \beta_{421} = 35.46 \pm 0.02$	
$\log \beta_{411} = 29.97 \pm 0.01$	$pK_a^{(1)} = 3.30$	$\log \beta_{411} = 31.36 \pm 0.02$	$pK_a^{(1)} = 4.09$
$\log \beta_{401} = 25.46 \pm 0.02$	$pK_a^{(2)} = 4.51$	$\log \beta_{401} = 26.85 \pm 0.02$	$pK_a^{(2)} = 4.51$
$\log \beta_{4-11} = 20.61 \pm 0.02$	$pK_a^{(3)} = 4.85$	$\log \beta_{4-11} = 21.21 \pm 0.03$	$pK_a^{(3)} = 5.64$
$\log \beta_{4-21} = 15.55 \pm 0.01$	$pK_a^{(4)} = 5.06$	$\log \beta_{4-21} = 14.91 \pm 0.03$	$pK_a^{(4)} = 6.30$
<p style="text-align: center;">Si $\beta_{421} = \frac{[\text{Cu}_4^{2+}\text{H}_2\text{L}]}{[\text{Cu}^{2+}]^4 [\text{H}_2\text{L}]}$ y $\beta_{411} = \frac{[\text{Cu}_4^{2+}\text{HL}]}{[\text{Cu}^{2+}]^4 [\text{H}_2\text{L}][\text{H}]^{-1}}$ entonces</p> $\beta_{411} \left(\frac{\beta_{421}}{\beta_{421}} \right) = \frac{[\text{Cu}_4^{2+}\text{HL}][\text{H}]}{[\text{Cu}_4^{2+}\text{H}_2\text{L}]} \beta_{421} = K_a^{(1)} * \beta_{421}$ $K_a^{(1)} = \frac{\beta_{411}}{\beta_{421}} \rightarrow pK_a^{(1)} = \log \beta_{421} - \log \beta_{411}$			

El primer equilibrio presentado corresponde a la formación de la especie $\text{Cu}_4\text{H}_2\text{L}^{4+}$, en la cual el ligante contiene sólo dos de los seis protones iniciales. Como ya se discutió anteriormente, esta pérdida de protones obedece a un cambio en la acidez de las aminas provocada por la presencia de los núcleos de Cu^{2+} , favoreciendo su desprotonación y coordinándose así a éstos. Los iones de Cu^{2+} además de estar coordinados por las aminas, estarán coordinados también por los grupos carboxílicos, y en dos de los casos, estarán coordinados también por los nitrógenos del anillo imidazólico no protonados (Figura 4.3.7).

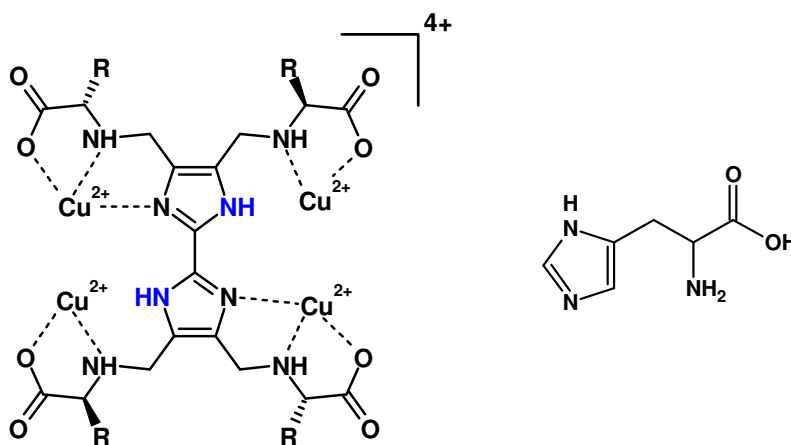


Figura 4.3.7. Representación esquemática del complejo tetranuclear de cobre, $\text{Cu}_4\text{H}_2\text{L}^{4+}$, formado en disolución (izquierda). Dos de los iones metálicos se encuentran en un sitio tridentado equivalente a la histidina (derecha) y dos más en un sitio bidentado.

Los valores del $\log\beta$ determinados para la formación de los compuestos tetranucleares con los ligantes $\text{H}_6\text{Alabiim}$ y $\text{H}_6\text{Valbiim}$ son de 33.27 y 35.46, respectivamente. Estos valores son aparentemente muy grandes, pero hay que recordar que, al ser constantes acumulativas, contemplan la formación de cada uno de los cuatro sitios. Si analizamos la especie $\text{Cu}_4\text{H}_2\text{L}^{4+}$, es fácil observar que está constituida de dos sitios *dicoordinados* y dos *tricoordinados*. En los sitios *dicoordinados*, los átomos de cobre se encuentran enlazados solamente a los átomos de oxígeno y nitrógeno del residuo del aminoácido, por lo que es de esperar que presenten valores similares a los de la formación de la especie Cu^{2+} (aminoácido), los cuales son cercanos a 8 tanto para la alanina como para la valina.¹¹² Por otro lado, los sitios *tricoordinados* pueden aproximarse a la formación de

la especie Cu^{2+} (histidina), ya que la histidina es un α -aminoácido en el cual el residuo está constituido por un grupo metilimidazol y cuya constante de formación es cercana a 10.¹¹² Sumando cada una de las cuatro constantes de equilibrio tenemos un logaritmo de la constante global de 36, el cual es un valor cercano al obtenido para los compuestos tetranucleares. La diferencia encontrada puede deberse a dos factores principalmente. El primero de ellos es el hecho de que la histidina es un α -aminoácido con una amina primaria y que el anillo imidazólico se encuentra enlazado al carbono α , mientras que en los ligantes de este trabajo la amina es secundaria con el anillo imidazólico unido a ella. En segundo lugar, se tiene que las constantes de Cu^{2+} (aminoácido) y Cu^{2+} (histidina) contemplan un equilibrio de formación con una estequiometría 1 a 1, por lo que los factores entrópicos son menores que en un equilibrio 1 a 4, y por lo tanto es de esperar valores de constantes de formación ligeramente menores en nuestro caso.

Las siguientes constantes de formación contemplan la pérdida sucesiva de equivalentes de protones en el complejo y se puede demostrar que la resta entre ellas se puede expresar como un valor de pK_a (ver Tabla 4.3.2).

Durante la determinación de las constantes de acidez de los ligantes, se habló de la imposibilidad de determinar los valores de pK_a de desprotonación de los anillos imidazólicos, dado el alto valor que presentan éstos. Pero al igual que los pK_a s de las aminas, en las cuales se observa una disminución mayor a siete unidades, es bien sabido que los pK_a s de los anillos imidazólicos llegan a disminuir hasta 10 unidades en presencia de Cu^{2+} ¹¹² para llegar a formar un puente imidazolato. Aunado a esto, la disposición espacial de los iones de Cu^{2+} en la especie $\text{Cu}_4\text{H}_2\text{L}^{4+}$, favorecerá dicha desprotonación en ambos anillos para formar la especie Cu_4L^{2+} (Figura 4.3.8), al término de la segunda desprotonación del complejo (sexta global). Esta especie tendrá cuatro sitios metálicos equivalentes, cada uno coordinado a los átomos de nitrógeno y oxígeno del aminoácido y a un átomo de nitrógeno del grupo imidazolato puente.

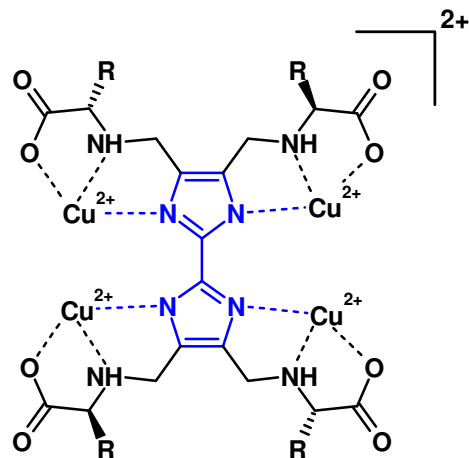


Figura 4.3.8. Representación esquemática del complejo tetranuclear de cobre, Cu_4L^{2+} , formado en disolución. Los cuatro iones de $Cu(II)$ se encuentran coordinados en sitios equivalentes debido a la formación de dos puentes imidazolato.

Los siguientes dos valores de pK_a pueden asignarse a la hidrólisis de dos moléculas de agua coordinadas a los iones de Cu^{2+} , para dar paso a la formación de la especie $Cu_4L(OH)_2$, especie eléctricamente neutra, observada al final de la titulación. Existen dos posibilidades de la estructura de esta nueva especie. Una, en donde la hidrólisis de las moléculas de agua da paso a la formación de grupos hidroxilo terminales y otra en donde se obtengan grupos hidroxilo puente, $\mu-OH$ (Figura 4.3.9). Si comparamos nuevamente los valores reportados para la hidrólisis de una molécula de agua coordinada a la especie $Cu^{2+}(\text{histidina})$ ($pK_a = 8$),¹¹² en la cual se obtiene un grupo OH^- terminal, vemos que es mayor al determinado en nuestro caso. Mientras que si comparamos los valores de pK_a obtenidos con los presentados por Torelli y colaboradores,⁵ en los cuales se obtiene un grupo $\mu-OH$ entre dos iones de cobre(II), observamos que son de la misma magnitud ($pK_a = 5$). Esto nos permite asignar los últimos valores de pK_a a la formación de dos grupos $\mu-OH$ en el complejo. Esta hipótesis será analizada con más detalle al estudiar el comportamiento magnético en disolución (sección 4.3.2.1).

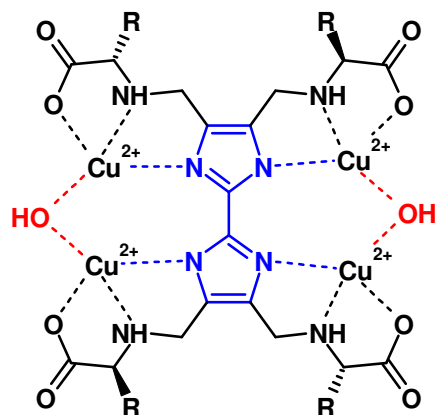
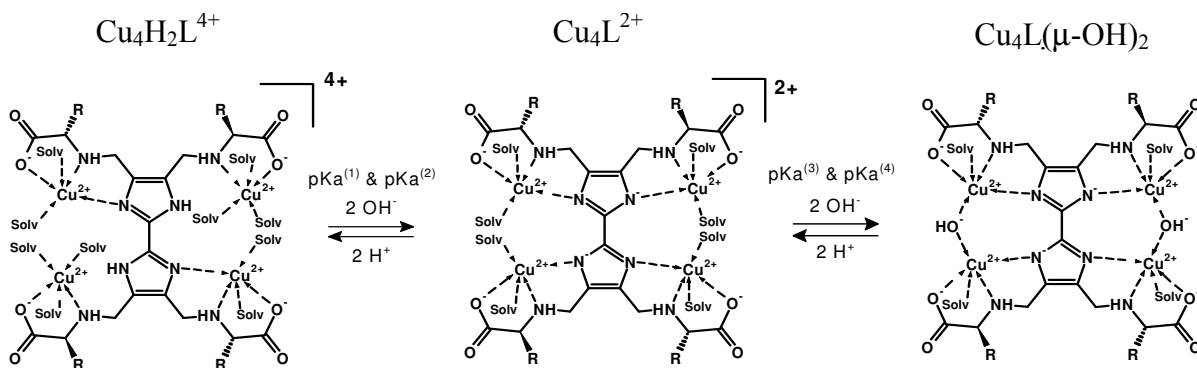


Figura 4.3.9. Representación esquemática del complejo tetranuclear de cobre, $Cu_4L(OH)_2$. Los cuatro iones de $Cu(II)$ se encuentran coordinados en sitios equivalentes debido a la formación de dos puentes hidroxido.

Con los valores de las constantes de equilibrio, tanto del ligante solo, como del complejo tetranuclear, es posible obtener un diagrama de predominio de especies que se muestra en la Figura 4.3.10. Es importante mencionar que a pesar de que no fue posible determinar especies de menor nuclearidad, es posible que existan en proporciones muy pequeñas, lo cual imposibilita determinarlas en este experimento.



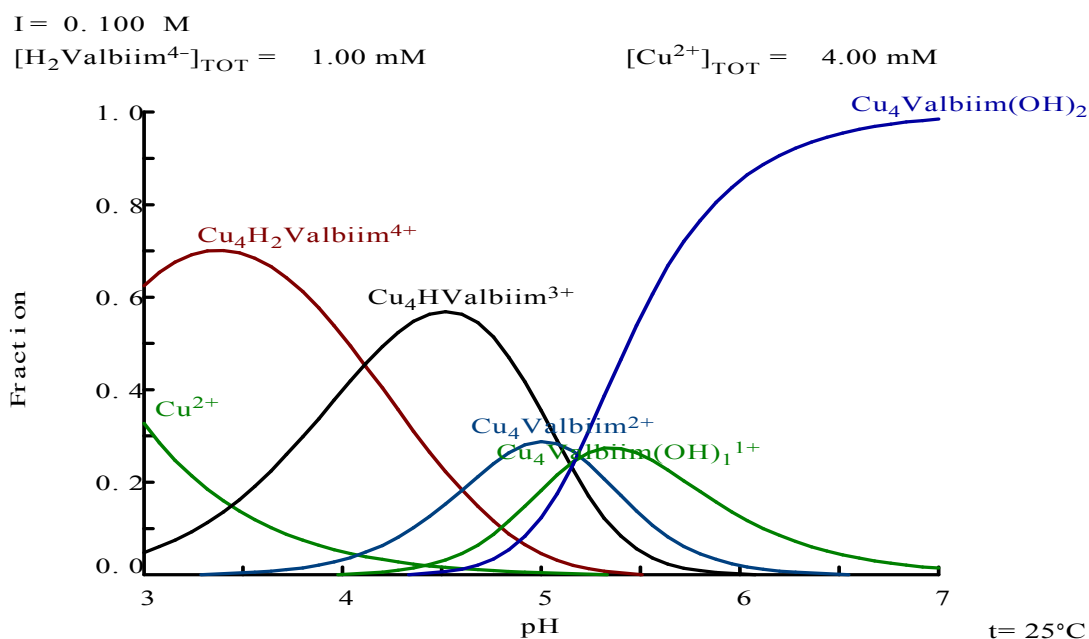
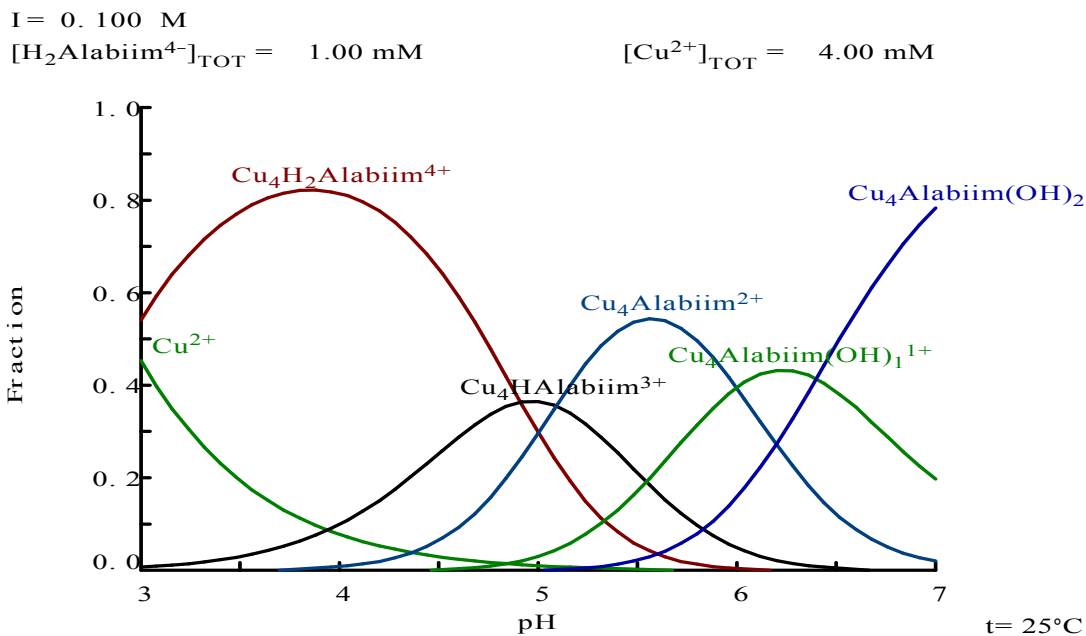


Figura 4.3.10. Interconversión debida al pH de los distintos grados de hidrólisis de los complejos tetranucleares con los ligantes $\text{H}_6\text{Alabiim}$ (arriba) y $\text{H}_6\text{Valbiim}$ (abajo) y sus diagramas de predominio de especies. Los diagramas se encuentran realizados a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M (KNO_3). $[\text{H}_6\text{Valbiim}]_{\text{total}} = 1 \text{ mM}$ y $[\text{Cu(II)}]_{\text{total}} = 4 \text{ mM}$.

En el diagrama de predominio de especies se observa que a valores de pH bajos coexiste la especie $\text{Cu}_4\text{H}_2\text{L}^{4+}$ con una proporción de cobre no coordinado el cual disminuye hasta desaparecer por completo en un pH cercano a 5. También se observa un claro predominio de la especie $\text{Cu}_4\text{L}(\text{OH})_2$ por arriba de $\text{pH} = 6.5$

Finalmente, cabe destacar que la aparición de las especies con el ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ se observa a valores menores de pH en comparación con el ligante $\text{H}_6\text{Alabiim}$.

4.3.2. Estudios magnéticos

Desde antaño son conocidas algunas sustancias que presentan propiedades magnéticas, como la magnetita, pero es hasta 1845 cuando Michael Faraday clasifica por primera vez a la materia según sus propiedades magnéticas, en sustancias diamagnéticas y paramagnéticas, y no es sino hasta muchos años después, que este fenómeno puede ser entendido en términos de la estructura electrónica. Hoy en día, con el desarrollo de las diversas teorías en este campo, el estudio de las propiedades magnéticas de las sustancias nos provee de información muy valiosa a nivel electrónico y estructural.

Una de las técnicas de análisis más usadas para estudiar las sustancias paramagnéticas es la resonancia paramagnética electrónica (**EPR**, por sus siglas en inglés). Como resultado de sus espines, los electrones no apareados se comportan como imanes y se alinean entre ellos de manera paralela o antiparalela a un campo magnético externo aplicado. Estas dos formas de alineamiento tienen energías ligeramente diferentes, y la transición de un nivel a otro puede ser inducida y detectada, aplicando una energía de resonancia en forma de radiación electromagnética. Un electrón desapareado que no se encuentra expuesto a interactuar con otros electrones desapareados o con un núcleo magnético presenta una absorción única para esta transición. Sin embargo, en muchos de los compuestos de coordinación, los patrones de resonancia suelen ser más complejos. Una de las ventajas que presenta la resonancia paramagnética electrónica es que puede realizarse tanto en muestras sólidas como en disoluciones, a diferentes temperaturas, incluyendo disoluciones congeladas. La técnica de EPR es sumamente sensible. Con ésta es posible estudiar muestras con concentraciones cercanas a 10^{-8} M.¹¹³

4.3.2.1. EPR en disolución congelada

Con la finalidad de obtener mayor información de la estructura de las especies en disolución, se realizaron experimentos de resonancia paramagnética electrónica de los complejos en función de la acidez del medio. La EPR emplea radiación electromagnética en

la frecuencia de las microondas, frecuencia que es altamente absorbida por disolventes muy polares, provocando por un lado el calentamiento de las muestras y por otro, la pérdida de sensibilidad en el equipo. Aunado a esto, es necesario que los disolventes seleccionados, al ser congelados, formen estructuras poco ordenadas, comúnmente llamadas vidrios, y no arreglos altamente cristalinos. Es por esto que el uso de disolventes como el agua dificulta los estudios de EPR. En la búsqueda de un equilibrio entre la polaridad del disolvente y la solubilidad de los complejos en éste, se eligió el MeOH como disolvente para realizar los experimentos de EPR. No obstante, el cambio a disolventes no acuosos conlleva la imposibilidad del uso del pH como medida de la acidez del medio. Es por esto que en los experimentos realizados se emplean equivalentes de base agregada como una medida de la acidez.

Los estudios de EPR se realizaron en disolución metanólica congelada a 77 K, partiendo de la especie formada *in situ* con una concentración 2.5 mM. Los complejos formados *in situ* fueron sintetizados simplemente agregando un equivalente de ligante a cuatro equivalentes de $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$. Distintas disoluciones del complejo fueron adicionadas con base (Bu_4NOH), desde cero hasta siete equivalentes, y posteriormente fueron aforadas a un mismo volumen para garantizar la misma concentración a lo largo de todo el experimento. Debido a que la concentración usada en estos experimentos es mucho menor a la empleada en la síntesis, no se observa precipitación sino hasta llegar a 7.5 equivalentes de base. Nuevamente, por razones de solubilidad de los compuestos, se usaron sólo dos de los ligantes sintetizados; *i.e.* $\text{H}_6\text{Valbiim}$ y $\text{H}_6\text{Leubiim}$.

Los espectros de EPR para ambos complejos formados *in situ* muestran, a simple vista, los patrones clásicos de un espectro axial con un acoplamiento hiperfino con un núcleo de espín 3/2, y un valor de $g_{//} > g_{\perp}$, consistente con un ion de cobre(II) con una geometría D_{4h} (octaedro distorsionado tetragonalmente por elongación). Los parámetros $A_{//}$, $g_{//}$ y g_{\perp} coinciden con los esperados para un ion de cobre(II) en un ambiente hexacoordinado por átomos de oxígeno, como es el caso de un ion de cobre(II) solvatado $[\text{Cu}(\text{MeOH})_6]^{2+}$. No obstante, al comparar los espectros de los complejos con el de la sal de cobre libre se observan señales adicionales que se encuentran traslapadas (Figura 4.3.11).

Este traslape de señales se puede entender claramente al observar el diagrama de predominio de especies para el complejo con el ligante $H_6Valbiim$ (Figura 4.3.10, Sección 4.3.1.3), en el cual se observa la coexistencia de la especie $Cu_4H_2L^{4+}$ con iones de Cu^{2+} libre. A pesar de que en EPR no existe, como en otras espectroscopias, un parámetro equivalente al coeficiente de absortividad molar, es posible que la intensidad de las señales de los iones de cobre libre sea mayor que las del cobre coordinado, debido a la presencia de acoplamiento antiferromagnético presentes en los complejos. Aunado a esto, el cambio en las concentraciones usadas en este experimento modifica el diagrama de predominio de especies incrementando la proporción de cobre libre cuando la acidez del medio es mayor, por lo que las señales de $[Cu(MeOH)_6]^{2+}$ serán de mayor intensidad que las de las especies de $Cu_4H_xL^{n+}$.

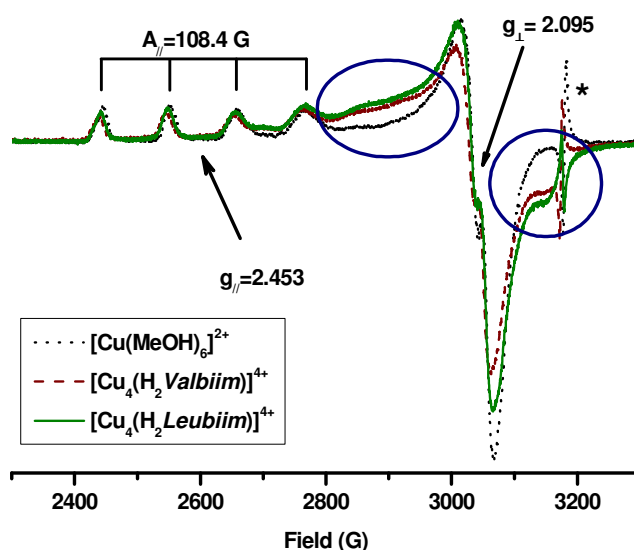


Figura 4.3.11. Espectros de EPR en banda X de $[Cu_4(H_2Valbiim)]^{4+}$ (en rojo), $[Cu_4(H_2Leubiim)]^{4+}$ (en verde) 2.5 mM y $[Cu(MeOH)_6]^{2+}$ (en negro) 10 mM en disolución metanólica congelada a 77 K. La señal marcada como (*) corresponde al radical 1,1'-difeníl-2-picrilhidrazil (DPPH) usado como referencia ($g = 2.0036$).

Con la finalidad de detectar con mayor claridad las señales de las especies $Cu_4H_xL^{n+}$ se realizó un nuevo experimento variando la proporción ligante:cobre(II) (Figura 4.3.12).

Por razones de solubilidad del ligante sólo es posible empezar de una proporción 1:2; ligante:cobre. En el espectro para la proporción 1:2 se aprecian claramente dos patrones de señales, uno que concuerda con $[\text{Cu}(\text{MeOH})_6]^{2+}$ y otro con una especie de cobre(II) en un ambiente nitrogenado.

Al incrementar la proporción de cobre se observa un aumento en todas las señales pero en mayor proporción para las de cobre(II) libre, hasta llegar a los espectros descritos anteriormente para las especies formadas *in situ*. Con este experimento se puede concluir que las señales de las especies $\text{Cu}_4\text{H}_x\text{L}^{n+}$ se encuentran traslapadas con las de $[\text{Cu}(\text{MeOH})_6]^{2+}$.

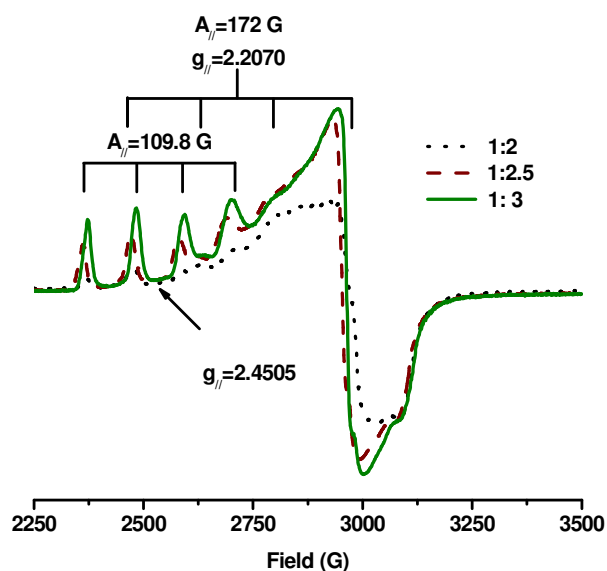


Figura 4.3.12. Espectros de EPR en banda X del ligante $H_6\text{Valbiim}$ (2.5 mM) en presencia de distintas proporciones de Cu(II) en disolución metanólica congelada a 77 K. (*) DPPH.

Como se mencionó anteriormente, se prepararon disoluciones de los complejos con distinta cantidad de base, manteniendo la concentración del complejo constante. Los espectros de EPR de estas disoluciones se muestran en la Figura 4.3.13 y en ella se observa una disminución gradual de todas las señales al incrementar la cantidad de base usada,

obteniendo una disminución casi completa al alcanzar 7 equivalentes de Bu_4NOH agregados. A lo largo de todo el experimento no hay aparición de señales en campo medio ($\Delta M_S = \pm 2$).

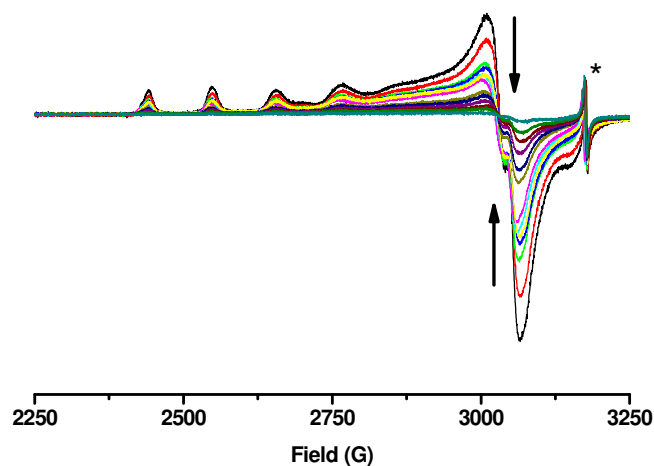


Figura 4.3.13. Espectros de EPR en banda X de $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})]$ (2.5 mM) en disolución metanólica congelada a 77 K en función de la cantidad de NBu_4OH añadida. La primera línea corresponde al espectro de la disolución de $4\text{Cu}:\text{H}_6\text{Valbiim}$ y los subsiguientes a las adiciones de 0.5 equivalentes de base hasta alcanzar 7 equivalentes. (*) DPPH.

La disminución de la señal se debe a la formación de un grupo que funcione como puente magnético entre los iones metálicos y no sólo al incremento de la basicidad de la disolución. Esto se corrobora al comparar el comportamiento entre la sal de cobre libre y los complejos al agregarles base. En la Figura 4.3.14 se compara el espectro del $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$ con los espectros de los complejos, cada uno con tres equivalentes de Bu_4NOH , y se observa una disminución significativa de la señal sólo en el caso de los complejos, lo que implica que la disminución es debida a un cambio estructural en los compuestos y no sólo en el ion de cobre(II) libre por el incremento en la basicidad del medio. La comparación de los espectros sólo puede ser hecha hasta tres equivalentes de base, ya que en ausencia de ligante el cobre precipita al agregar más base.

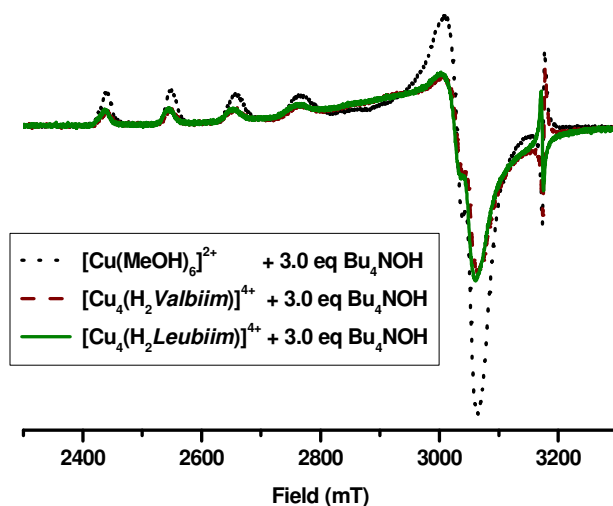


Figura 4.3.14. Espectros de EPR en banda X de $[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{Valbiim})]^{4+}$ (en rojo), $[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{Leubiim})]^{4+}$ (en verde) 2.5 mM y $[\text{Cu}(\text{MeOH})_6]^{2+}$ (en negro) 10 mM con tres equivalentes de NBu_4OH en disolución metanólica congelada a 77 K. (*) DPPH.

Analizando nuevamente las estructuras propuestas en la Sección 4.3.1.3, se observan dos posibilidades para este puente magnético. Por un lado, la estructura propuesta para la especie Cu_4L^{2+} presenta la formación de dos puentes imidazolato entre los iones metálicos (Figura 4.3.15, izquierda), mientras que la estructura propuesta para la especie $\text{Cu}_4\text{L}(\mu\text{-OH})_2$, además de presentar dos puentes imidazolato, presenta también dos puentes hidroxilo (Figura 4.3.15, derecha).

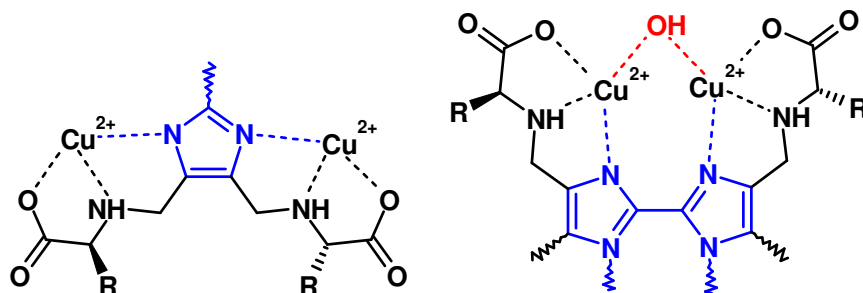


Figura 4.3.15. Representación esquemática de los puentes imidazolato (izquierda) e hidroxilo (derecha) en los complejos tetranucleares.

Es bien sabido que ambos puentes son capaces de favorecer los acoplamientos antiferromagnéticos entre dos iones de cobre(II) y que con los puentes μ -OH son más fuertes.^{101, 107} En la literatura se encuentran informadas constantes de acoplamiento antiferromagnético de $J = -40\text{cm}^{-1}$ para compuestos con puentes imidazolato,¹⁰⁷ mientras que se informan constantes de acoplamiento mayores a $J = -400\text{cm}^{-1}$ para compuestos con puentes μ -OH.¹⁰¹ Con estos valores se esperaría observar, a 77 K, una señal ancha y poco definida para la especie puenteada por un grupo imidazolato, mientras que se esperaría un espectro silencioso para una especie puenteada por OH.

Para esclarecer cuál de los dos puentes formados en disolución es responsable del acoplamiento observado, se utilizó un ligante anteriormente sintetizado en nuestro grupo de trabajo. El ligante H₃Alameim es un derivado de L-alanina y 2-metilimidazol.^{94, 96} Con este ligante se obtienen compuestos dinucleares de Cu²⁺ en dos distintos modos de coordinación. En medios ácidos, aloja a un ion de cobre(II) tricoordinado y uno dicoordinado (Figura 4.3.16, izquierda), presentando una estructura análoga a la propuesta para la especie Cu₄H₂L⁴⁺, mientras que al aumentar la basicidad del medio, es capaz de formar un puente imidazolato, coordinando a los dos iones de cobre(II) en ambientes tricoordinados (Figura 4.3.16, derecha), análogos a los observados en la especie Cu₄L²⁺. Por razones estructurales del ligante, éste no es capaz de formar puentes hidroxilo intramoleculares.

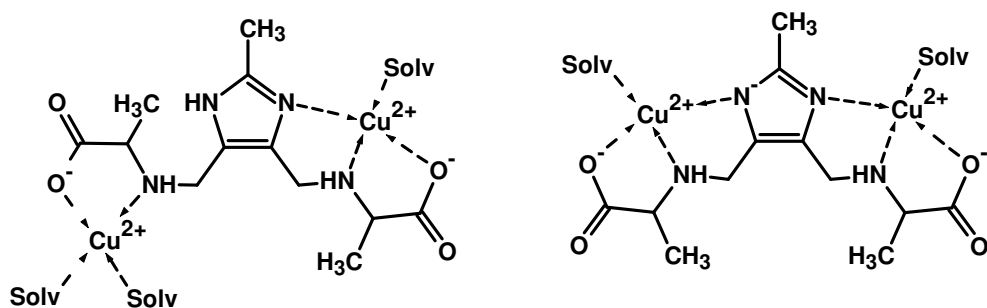


Figura 4.3.16. Representación esquemática de las posibilidades de coordinación del ligante H₃Alameim en función de la acidez del medio. En medios ácidos se observa una estructura abierta (izquierda) y en medios básicos se observa la formación de un puente imidazolato (derecha).

Al realizar nuevamente el experimento de EPR usando ahora el ligante H₃Alameim se obtienen los resultados presentados en la Figura 4.3.17. Con este ligante no se observó precipitación al llegar a la equivalencia, lo que permite agregar un exceso de base, favoreciendo así, la formación del puente imidazolato.

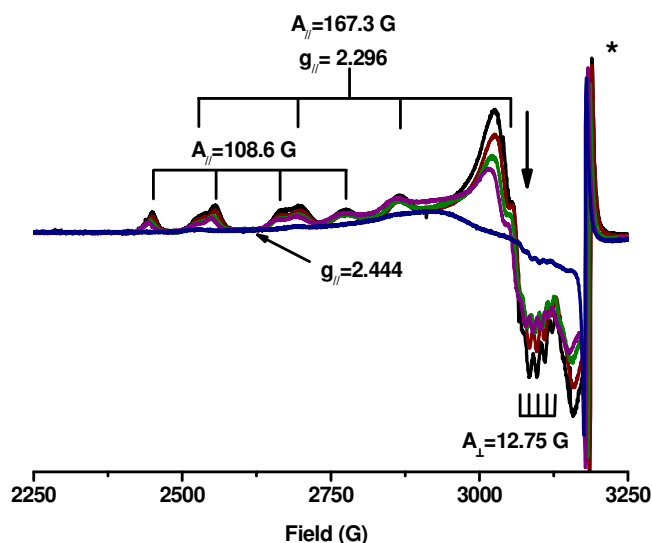


Figura 4.3.17. Espectros de EPR en banda X de [Cu₂Alameim] (5 mM) en disolución metanólica congelada a 77 K en función de la cantidad de NBu₄OH añadida. El espectro de mayor intensidad corresponde a la disolución de 2Cu:H₃Alameim y los subsiguientes a las adiciones de 1, 2, 3 y 6 equivalentes de NBu₄OH. (*) DPPH.

Analizando la especie formada *in situ*, se observa nuevamente la coexistencia de [Cu(MeOH)₆]²⁺ con la especie Cu₂HAlameim²⁺. Los parámetros A_{||}, A_⊥, g_{||} y g_⊥ de la especie Cu₂HAlameim²⁺ concuerdan con los esperados para un ion de cobre(II) en un ambiente nitrogenado. Este espectro muestra claramente un acoplamiento superhiperfino debido a la interacción del electrón desapareado con el núcleo de los átomos de nitrógeno. Al ir agregando base, se observa una disminución gradual de las señales hasta llegar a un espectro que presenta una señal ancha y poco definida característica de un puente imidazolato. A pesar de la disminución significativa de las señales, no se observa la formación de una especie silenciosa.

De los resultados obtenidos en este experimento se concluye que los sistemas son capaces de formar puentes imidazolato y que éstos a su vez, no son el único tipo de puente magnético responsable de la formación de las especies silenciosas en los compuestos tetranucleares. Esto implica que la aparición de las especies silenciosas se deberá entonces a la formación de puentes que provoquen un mayor acoplamiento entre los núcleos metálicos, es decir la formación de puentes hidroxilo.

Regresando nuevamente a la Figura 4.3.13 existe otro comportamiento que llama la atención. La disminución de las señales siempre es gradual y homogénea. A lo largo de toda la titulación no hay un cambio aparente en la intensidad relativa de las señales, al contrario de lo que se esperaría, ya que al favorecer la formación de las especies coordinadas se esperaría un aumento de sus señales para luego disminuir por la formación de las especies silenciosas. Este comportamiento se puede explicar de la manera siguiente.

En diagrama de predominio de especies (Figura 4.3.10, Sección 4.3.1.3) se observa que la especie $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})]^{2+}$ (sólo puentes imidazolato) nunca tiene un claro predominio, ya que coexiste con $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})(\mu\text{-OH})]^+$ y $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})(\mu\text{-OH})_2]$. Además hay que recordar que los valores de las constantes de formación fueron determinados en agua mientras que los espectros de EPR fueron realizados en metanol. El cambio a este nuevo disolvente favorece que las especies hidroxiladas se formen a valores de pH menor. Esta tendencia a formar complejos más estables al cambiar disolventes fue estudiada por Kilic y Dogan.¹¹⁴⁻¹¹⁷ Los autores informan una tendencia de los α -aminoácidos a formar complejos más estables con iones metálicos divalentes en mezcla EtOH-agua (40:60) que en agua.¹¹⁵ Por lo tanto, es de esperar que las constantes de formación en nuestros compuestos aumenten al usar MeOH y que la formación de los puentes imidazolato e hidroxilo se dé concertadamente.

4.3.3 Estudios de la actividad catalítica

A lo largo de las últimas décadas, una gran variedad de compuestos de cobre han sido empleados como modelos en el estudio de las propiedades catalíticas de la enzima catecoloxidasas.^{3, 5, 62-64, 66, 71, 118-121} El interés de esta reacción radica, no sólo en la comprensión del mecanismo de acción de la enzima, sino también en la importancia comercial de obtener catalizadores capaces de oxidar sustratos orgánicos, usando como oxidante oxígeno molecular.

En los estudios catalíticos de oxidación de catecoles, el 3,5-di-*tert*-butilcatecol (**H₂DTBC**) es ampliamente usado como sustrato modelo (Figura 4.3.18).^{122, 123} Esto se debe a que sus sustituyentes voluminosos disminuyen su reactividad, haciendo que las reacciones de oxidación subsecuentes, como la apertura del anillo, sean muy lentas.^{62, 70}

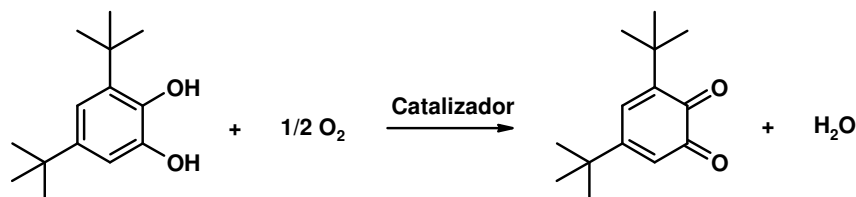


Figura 4.3.18. Representación esquemática de la reacción de oxidación del H₂DTBC.

La formación de la 3,5-di-*tert*-butil-*o*-benzoquinona (**DTBQ**), que se obtiene como producto de la oxidación, es fácil de evaluar espectrofotométricamente ya que presenta una banda de absorción característica alrededor de 400 nm ($\epsilon_0 = 1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeCN/H₂O; 1:1 y $1650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeOH/H₂O; 1:1 a 407 nm).⁶⁹

En la evaluación de la actividad catalítica de nuestros compuestos de cobre(II) se usó el método de velocidades iniciales, siguiendo por espectroscopia de UV-Vis la aparición de la DTBQ en función del tiempo en los primeros instantes de reacción. Un comportamiento lineal en una gráfica de concentración de DTBQ vs. tiempo (Figura 4.3.19) corrobora que se están midiendo velocidades iniciales, y así, la pendiente corresponderá a la velocidad inicial (v_0). Una de las ventajas que ofrece este método es que durante los

primeros instantes del proceso la cantidad de producto formado es muy pequeña y la reacción inversa puede ser considerada despreciable, lo cual permite el uso de ecuaciones simples en el cálculo de las constantes cinéticas.

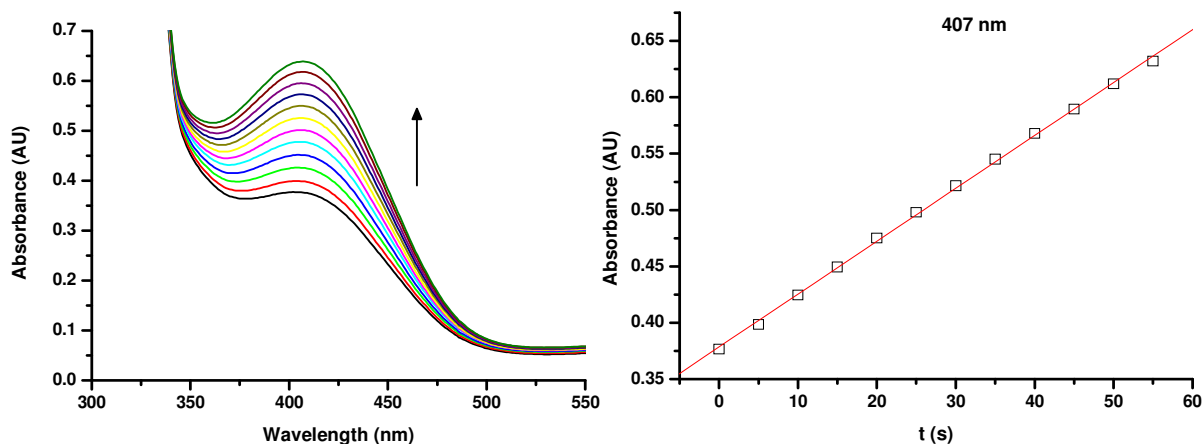


Figura 4.3.19. Incremento en la señal de la DTBQ con respecto al tiempo ($\epsilon_0 = 1300 M^{-1}cm^{-1}$ en MeCN/H₂O; 1:1 y $1650 M^{-1}cm^{-1}$ en MeOH/H₂O; 1:1 a 400 nm).

4.3.3.1 Dependencia de la velocidad en la concentración del catalizador

El efecto de la concentración del catalizador en la actividad catalítica es importante para conocer el orden de reacción con respecto a éste. Para ello, se mantienen fijos tanto el pH como la concentración de sustrato. El experimento se evaluó a una concentración de sustrato constante de $[H_2DTBC] = 20$ mM. El intervalo de concentraciones de catalizador estudiado fue de $[Cu_4L] = 50$ a 300 μ M. De esta manera, se aseguró mantener siempre un exceso en la concentración de sustrato, lo que permite afirmar que la formación de cualquier intermediario no alterará considerablemente la concentración de éste, y así, poder considerarla como una constante en los cálculos. Este análisis se realizó a un valor de pH = 7.5 debido a que es el pH de comparación con los sistemas del grupo de trabajo. En

todos los casos, las disoluciones de los compuestos tetranucleares fueron preparados *in situ* agregando cuatro equivalentes de un estándar de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a un equivalente del ligante en su forma neutra, H_6L .

En la Figura 4.3.20 se muestra la gráfica de v_0 vs $[\text{Cu}_4\text{L}]$ para los complejos tetranucleares de $\text{Cu}(\text{II})$ con los ligantes $\text{H}_6\text{Alabiim}$, $\text{H}_6\text{Valbiim}$, $\text{H}_6\text{Fenbiim}$ y $\text{H}_6\text{Metbiim}$ a $\text{pH} = 7.5$

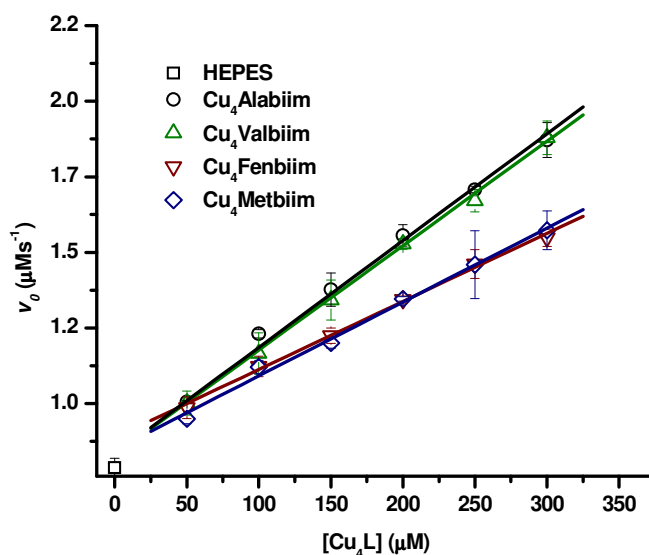


Figura 4.3.20. Gráfica de v_0 vs $[\text{Cu}_4\text{L}]$ para los complejos tetranucleares. En todos los casos se obtiene un coeficiente de correlación lineal (r^2) mayor a 0.99.

Como se aprecia en la figura anterior, en todos los casos se obtiene una relación lineal de la velocidad con respecto a la concentración del catalizador. Esto indica que la reacción con respecto al catalizador es de pseudo-primer orden, ya que la concentración de sustrato se mantuvo constante, por lo tanto la ley de velocidad es $V = k_{obs}[\text{Cat}]$. En esta gráfica, la pendiente equivale a k_{obs} con una ordenada al origen igual a cero, donde el valor de cero no corresponde al cero algebraico, sino al valor de la velocidad sin catalizador, es decir la actividad del medio. Cabe mencionar que el pseudo-primer orden con respecto al catalizador es un requerimiento en el uso del modelo enzimático de Henri-Michaelis-Menten.¹²⁴

Todos los compuestos exhiben comportamientos lineales y es posible observar una pequeña diferencia en las pendientes. Los complejos con los ligantes $H_6Alabiim$ y $H_6Valbiim$ presentan pendientes ligeramente mayores que en los complejos con los ligantes $H_6Metbiim$ y $H_6Fenbiim$. La diferencia estructural de estos ligantes radica en el residuo del aminoácido, siendo menos hidrofóbico en los ligantes $H_6Alabiim$ y $H_6Valbiim$. Es posible que esta diferencia en hidrofobia sea la causa de la diferencia en la actividad catalítica, ya que podría haber una configuración preferida para minimizar las interacciones con el medio, lo que disminuiría la flexibilidad del ligante, que es un factor importante en el intercambio de $Cu(II)/Cu(I)$ y $Cu(I)/Cu(II)$.

4.3.3.2 Dependencia de la velocidad en el pH

Como ya se mencionó, el pH es uno de los factores predominantes en la actividad catalítica, ya que éste induce cambios estructurales en la esfera de coordinación del metal. Además, fue necesario realizar el estudio de la actividad catalítica en función del pH para conocer el valor de éste al cual se obtiene una actividad máxima.

Con la finalidad de obtener resultados comparables con otros sistemas previamente descritos, los estudios se realizaron en la mezcla $MeCN/H_2O$, 1:1. En esta mezcla, el H_2DTBC tiene una solubilidad relativamente baja por lo que la concentración máxima alcanzada es 20 mM. Para mantener un exceso en la concentración de sustrato ($[H_2DTBC]$) con respecto a la concentración de catalizador ($[Cu_4L]$), la concentración de los complejos se fijó en 150 μM . Ambas concentraciones se mantuvieron constantes a lo largo de este experimento. Este estudio se realizó con los ligantes $H_6Valbiim$ y $H_6Metbiim$, ya que estos ligantes representan cada una de las tendencias observadas en el experimento de variación de la concentración del catalizador.

El pH se ajustó utilizando uno de los siguientes amortiguadores no coordinantes a Cu(II)^{125} con una concentración 0.1 M en celda:

- **MES** Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
($\text{pK}_a = 6.15$) en el intervalo de pH de 5.5 a 6.5
- **HEPES** Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'(2-etanosulfónico)
($\text{pK}_a = 7.55$) en el intervalo de pH de 7.0 a 8.0
- **TRIS** Tris(hidroximetil)aminometano
($\text{pK}_a = 8.3$) en el intervalo de pH de 8.5 a 9.5

El la figura 4.3.21 se presenta la gráfica de v_0 vs pH para la reacción de oxidación del H_2DTBC en presencia y en ausencia de catalizador.

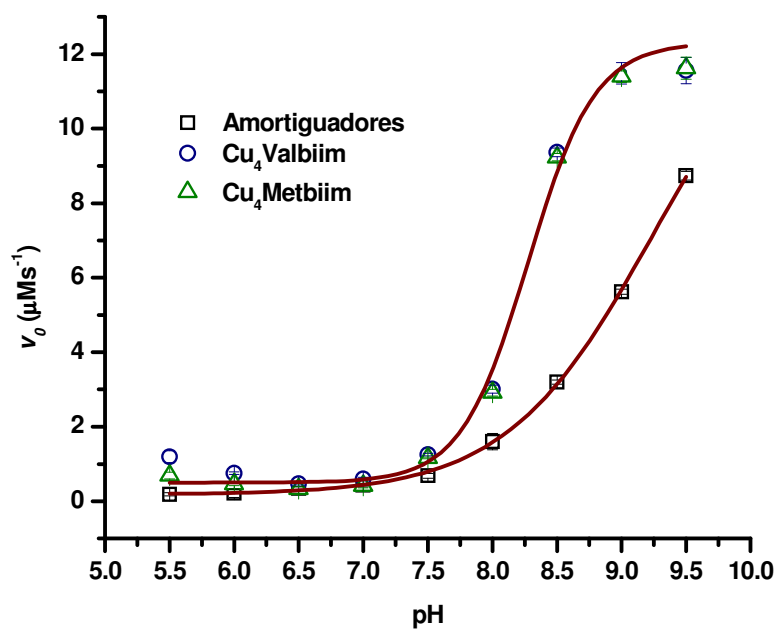


Figura 4.3.21. Curvas de v_0 vs pH para los complejos tetranucleares. Los puntos en negro representan los valores de actividad del medio sin catalizador.

Como puede apreciarse en la gráfica anterior, la velocidad de reacción aumenta al incrementar el pH del medio en el intervalo de 7.5 a 9.0 en las pruebas con catalizador. También se observa un aumento en la actividad en el experimento en donde no se usó catalizador debido a una catálisis básica. Sin embargo, el aumento de la velocidad es mayor cuando se emplea alguno de los catalizadores, obteniendo la mayor diferencia entre los experimentos con y sin catalizador a $\text{pH} = 8.5$, el cual es, por lo tanto, el pH de máxima actividad.

El incremento en la actividad, en el caso de usar alguno de los complejos, coincide con la aparición de las especies hidroxiladas. Este comportamiento concuerda con lo observado por Belle y colaboradores.⁵ En su trabajo, observan la formación de dos tipos de grupos hidróxido (puente y terminales) al incrementar el pH. Al realizar la evaluación catalítica de sus compuestos, determinan que las especies con grupos $\mu\text{-OH}$ son las únicas en presentar actividad catalítica. En nuestros ligantes, la disposición espacial de los átomos de Cu(II) promueve la formación de estos grupos $\mu\text{-OH}$ al incrementar el pH del medio, llevando a la formación de especies activas y así, a un aumento en la actividad catalítica.

Es necesario mencionar que la diferencia en la actividad observada entre los complejos con los dos tipos de ligantes con distinta hidrofobia en el experimento de v_0 vs $[\text{Cu}_4\text{L}]$ (Figura 4.3.20), es aproximadamente de dos órdenes de magnitud menor que la diferencia observada en este experimento. Esto implica que el cambio estructural en estos ligantes, que se manifiesta como una interacción con el medio, no es un factor que determine su actividad, a diferencia del cambio en entorno de coordinación de los sitios metálicos, provocado por el cambio en el pH.

4.3.3.3 Dependencia de la velocidad en la concentración del sustrato

La catálisis enzimática se caracteriza por presentar un efecto de saturación. En un principio, a concentraciones relativamente bajas de sustrato, la dependencia de la reacción con respecto a la concentración de sustrato es de primer orden y a cierta concentración esta

dependencia deja de ser lineal, hasta el punto de ser prácticamente independiente de ella. En los sistemas vivos, este comportamiento es usado en complejas estrategias de autorregulación.

Usualmente, la actividad catalítica de las enzimas es evaluada utilizando el modelo de Henri, Michaelis y Menten, quienes propusieron un modelo simple para explicar la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas. Este modelo se desarrolló para el caso de una reacción en la que sólo hay un sustrato y en él se plantea que el catalizador (**Cat**) se combina reversiblemente con el sustrato (**Sust**) para formar el complejo catalizador-sustrato (**CatSust**), que posteriormente da lugar a la formación del producto (**P**) y la regeneración del catalizador.



Donde k_1 , k_2 y k_3 son constantes cinéticas (constantes de velocidad de reacción).

De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que:

$$v_1 = k_1 [\text{Cat}] [\text{Sust}]$$

$$v_2 = k_2 [\text{CatSust}]$$

$$v_3 = k_3 [\text{CatSust}]$$

En el modelo de Henri-Michaelis-Menten la velocidad de reacción debe ser evaluada en los primeros instantes, es decir, medir velocidades iniciales (v_0). La razón de lo anterior es que en ese momento la concentración del producto que se ha acumulado es muy pequeña y, por lo tanto, la reacción en el sentido inverso puede ser despreciada. También se asume la hipótesis del estado estacionario, en la cual la concentración del complejo catalizador-sustrato no cambia con el tiempo, lo que significa que las velocidades de formación y descomposición de CatSust son iguales. Por lo que:

$$v_1 = v_2 + v_3$$

Bajo estos supuestos, la velocidad de formación del producto puede considerarse constante y puede representarse en términos de la concentración de sustrato usando la expresión más conocida de la ecuación de Henri-Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [\text{Sust}]}{K_M + [\text{Sust}]}$$

Donde, K_M es conocida como la constante de Michaelis y está definida por las constantes cinéticas de acuerdo a la relación siguiente:

$$K_M = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}$$

V_{\max} es la velocidad máxima alcanzada cuando todo el catalizador se encuentra unido al sustrato:

$$V_{\max} = k_3 [\text{Cat}]_{\text{total}}$$

y donde, a su vez, k_3 es conocida como número de recambio o constante catalítica (k_{cat}).

Las cinéticas que siguen un comportamiento de Michaelis-Menten presentan, en una gráfica de v_0 vs [Sustrato], una tendencia hiperbólica debido al efecto de saturación. En esta gráfica, V_{\max} corresponde al valor máximo al cual tiende la curva y K_M a la concentración del sustrato a la cual se alcanza la mitad de V_{\max} (Figura 4.3.22).

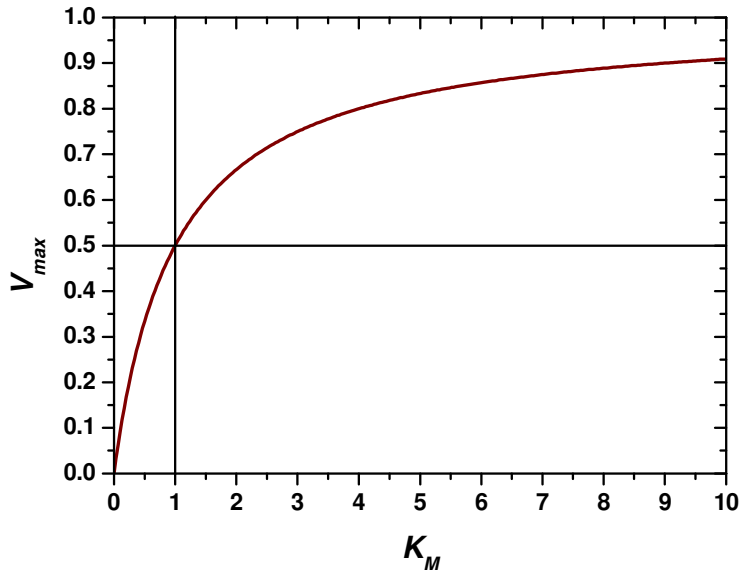


Figura 4.3.22. Tendencia de un sistema que sigue un comportamiento de Michaelis-Menten.

Tanto K_M como k_{cat} son parámetros cinéticos que están relacionados directamente con la eficiencia catalítica. Dada su definición, K_M puede interpretarse como una medida inversa de la afinidad del catalizador por el sustrato. Valores pequeños de K_M reflejan una alta afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que valores grandes implican un complejo Catalizador-Sustrato inestable.

Por otro lado, la constante catalítica, k_{cat} , representa la capacidad de la enzima para llevar a cabo la transformación de sustrato a producto. Se expresa como la cantidad máxima de moles de producto que pueden transformarse por mol de catalizador (o sitio activo) por unidad de tiempo. El valor de ésta se determina a partir del valor de V_{max} ya que

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[\text{Catalizador}]_{total}}$$

Dado que ambos parámetros, K_M y k_{cat} , definen características diferentes del sistema, no es apropiado basarse sólo en uno de ellos para comparar la eficiencia de dos

sistemas. Así, el cociente k_{cat}/K_M es un parámetro de la eficiencia catalítica comúnmente empleado para comparar la actividad de diferentes catalizadores frente a un mismo sustrato en el mismo medio.

La determinación de los parámetros cinéticos sólo se realizó para los compuestos con los ligantes $H_6Valbiim$ y $H_6Metbiim$. Estos ligantes fueron seleccionados como representantes de los dos tipos de comportamientos observados en el estudio de v_0 vs $[Cu_4L]$ (ver sección 4.3.3.1). Recordemos que en estos experimentos los complejos con los ligantes $H_6Valbiim$ y $H_6Alabiim$ presentan un comportamiento similar y más activo que los compuestos con los ligantes $H_6Metbiim$ y $H_6Fenbiim$, que presentan un comportamiento similar entre sí.

La dependencia de la velocidad con respecto a la concentración del sustrato se determinó manteniendo constante la concentración del catalizador en $150\ \mu M$ y variando la concentración del H_2DTBC desde $6\ mM$ hasta $20\ mM$, por lo que se mantiene un exceso del sustrato durante todo el experimento. El experimento se realizó a dos valores de pH diferentes: $pH = 7.5$ (pH de comparación) y $pH = 8.5$ (pH óptimo). Los resultados se presentan en la Figura 4.3.23.

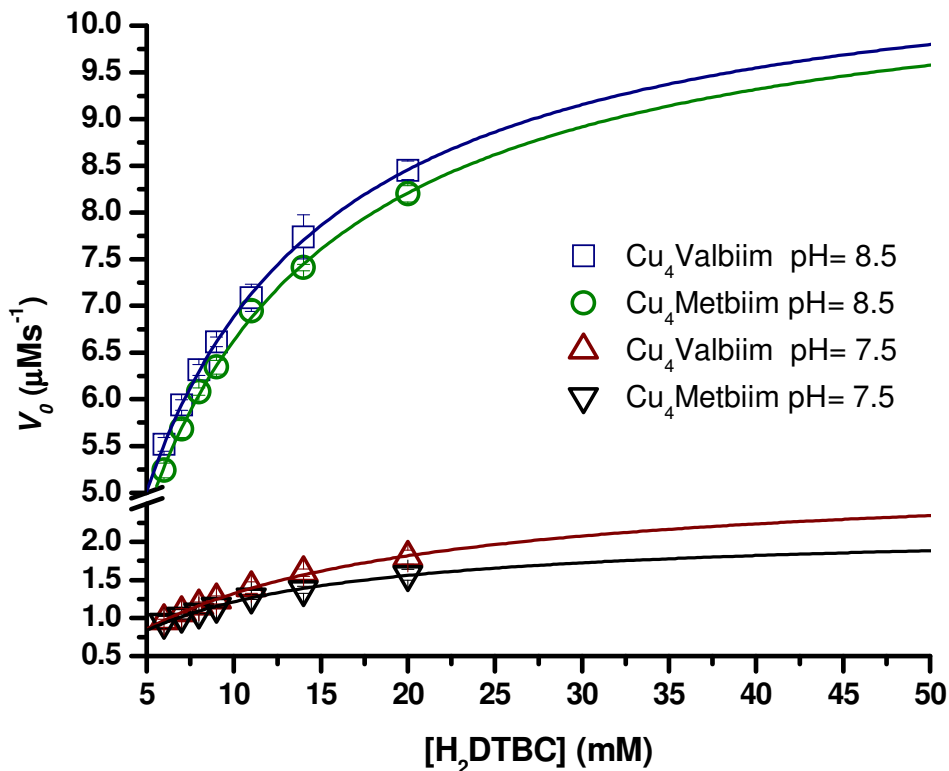


Figura 4.3.23. Curvas de velocidad v_0 vs $[H_2DTBC]$ para los complejos tetranucleares con los ligandos $H_6Valbiim$ y $H_6Metbiim$ a $pH = 7.5$ y 8.5 en mezcla $MeCN/H_2O$; 1:1. $[Cu_4L] = 150 \mu M$. Las líneas representan los ajustes no lineales con la ecuación de Michaelis-Menten ($y = (V_{max} * x) / (K_M + x)$).

En todos los casos se observa un efecto de saturación por lo que se puede emplear el modelo de Henri-Michaelis-Menten en el cálculo de los parámetros cinéticos.

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente a formas más útiles para la determinación de parámetros cinéticos. Una de estas expresiones se obtiene simplemente tomando el doble recíproco ($1/v_0$ vs $1/[Sust]$). Esta expresión es conocida como representación de Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[Sust]_0}$$

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

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

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

En la figura 4.3.24 se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk para la reacción catalizada por los compuestos tetranucleares.

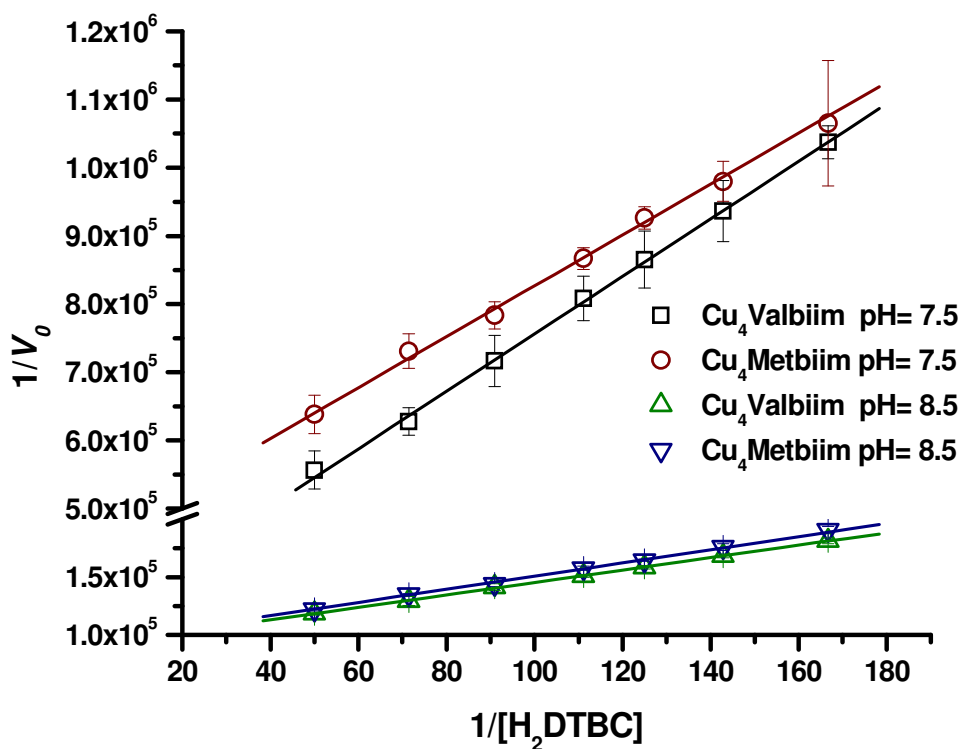


Figura 4.3.24. Gráfica de Lineweaver-Burk para los complejos tetranucleares.

Con los datos de la regresión lineal de estas gráficas es posible conocer los valores de k_{cat} , K_M , V_{max} y k_{cat}/K_M . Estos valores se presentan en la Tabla 4.3.3.

Tabla 4.3.3. Valores de los parámetros cinéticos k_{cat} , K_M , V_{max} y k_{cat}/K_M . obtenidos para la reacción de oxidación del H_2DTBC a 25 °C en $MeCN/H_2O$; 1:1. Los valores están expresados por mol de complejo.

Catalizador	pH	V_{Max} [μMs^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}s^{-1}$]
[Cu ₄ (Valbiim)]	7.5	12.0	12.6	0.08	6.3
[Cu ₄ (Metbiim)]	7.5	8.8	8.2	0.06	7.2
[Cu ₄ (Valbiim)]	8.5	46.6	5.9	0.29	49.6
[Cu ₄ (Metbiim)]	8.5	42.8	6.1	0.28	46.8

Los valores de los parámetros obtenidos pueden ser comparados en función de la velocidad de reacción, la afinidad del catalizador por el sustrato, la transformación de sustrato a producto y, finalmente, de la eficiencia catalítica.

En cuanto a la velocidad de reacción se puede observar que el compuesto con el ligante $H_6Valbiim$ realiza la transformación más rápido en ambos valores de pH, y que ambos complejos aumentan su V_{max} al aumentar la basicidad. Esto concuerda con la aparición de las especies hidroxiladas ($pK_a^{(3)}$ y $pK_a^{(4)}$) al aumentar el pH.

Dado que el valor de k_{cat} es directamente proporcional al de V_{max} la tendencia es la misma. El complejo con el ligante $H_6Valbiim$ presenta valores de k_{cat} mayores que los del complejo con $H_6Metbiim$ y éstos a su vez aumentan al incrementar el pH del medio.

Al comparar los valores de K_M se puede observar que éstos disminuyen al aumentar el pH. Recordemos que una disminución en el valor de K_M implica un aumento en la afinidad de catalizador por el sustrato. En estos complejos, es claro que la formación del puente OH dispondrá a los sitios de cobre en una geometría óptima para la coordinación del sustrato, por lo que la formación del puente μ -OH promoverá la formación del complejo catalizador-sustrato. Por lo tanto, a valores de pH bajos, es decir, cuando el complejo no

presenta puentes OH y los núcleos de cobre(II) no se encuentran cercanos (Figura 4.3.25, izquierda), la afinidad hacia el sustrato será menor que en el caso de los complejos en los cuales se ha formado el puente OH (Figura 4.3.25, derecha), el cual dispondrá los núcleos metálicos de manera adecuada para la coordinación del sustrato.

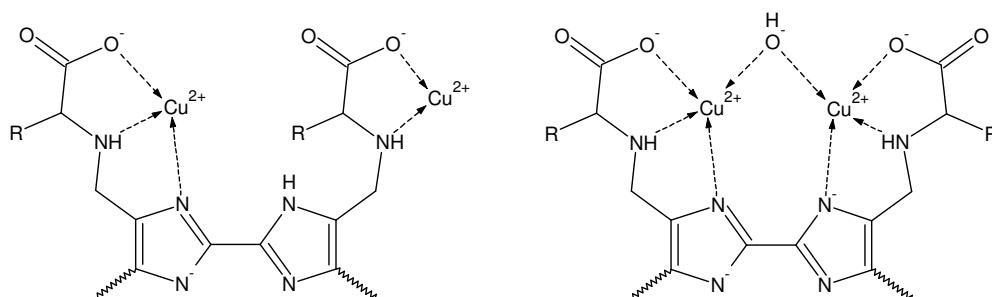


Figura 4.3.25. Representación esquemática de dos tipos de coordinación en los compuestos tetranucleares. (izquierda) Coordinación sin formación de puente OH y (derecha) coordinación con formación de puente OH.

Ahora, si comparamos los valores entre ambos complejos, a pH = 7.5 el complejo con H₆Metbiim muestra una mayor afinidad por el sustrato mientras que a pH = 8.5 las afinidades son prácticamente iguales, siendo ligeramente mayor en el caso del compuesto con H₆Valbiim. Este comportamiento puede deberse a dos razones:

Por un lado, el pK_a de formación del puente OH puede ser ligeramente más bajo en el caso del complejo con Metbiim que con Valbiim, como sucede en los aminoácidos solos, donde los pK_as de la metionina son ligeramente menores que en el caso de la valina.^{112, 126} Esta ligera diferencia de acidez provocaría la formación de una pequeña cantidad del μ-OH a pH = 7.5 con H₆Metbiim, lo que explicaría la mayor afinidad. Posteriormente, a pH = 8.5 ambos complejos presentarían el puente μ-OH, por lo que las afinidades de ambos serían similares ya que los sitios activos son iguales en ambos complejos.

Finalmente, si se compara el cociente k_{cat}/K_M podemos observar que ambos complejos presentan una mayor eficiencia catalítica a pH = 8.5 que a pH = 7.5 y que a un

mismo valor de pH ambos ligantes presentan un valor similar de eficiencia catalítica, siendo ligeramente mayor para $[\text{Cu}_4(\text{Metbiim})]$ a $\text{pH} = 7.5$ y mayor para $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})]$ a $\text{pH} = 8.5$.

4.3.3.4 Efecto del disolvente en la actividad catalítica

Aunado al pH, el cambio de disolvente es un factor de gran importancia en las reacciones químicas. La correcta elección del disolvente conlleva un aumento en la eficiencia catalítica de los sistemas. Por esta razón los parámetros cinéticos fueron determinados también en mezcla MeOH/H₂O; 1:1, el cual es un medio de reacción usado por algunos grupos de trabajo. Debido a que los parámetros cinéticos obtenidos en MeCN/H₂O de ambos complejos estudiados son similares, este estudio se realizó sólo para uno de ellos, i.e. $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})]$.

La dependencia de la velocidad con respecto a la concentración del sustrato se determinó manteniendo constante la concentración del catalizador en 12.5 μM y variando la concentración del H₂DTBC desde 0.16 mM hasta 8 mM. Las concentraciones en este medio son menores que las usadas en MeCN/H₂O ya que la solubilidad del sustrato es menor. El experimento se realizó en un intervalo de pH entre 6.5 y 8.5. Los resultados se presentan en la Figura 4.3.26 y los valores de los parámetros cinéticos se enlistan en la Tabla 2.

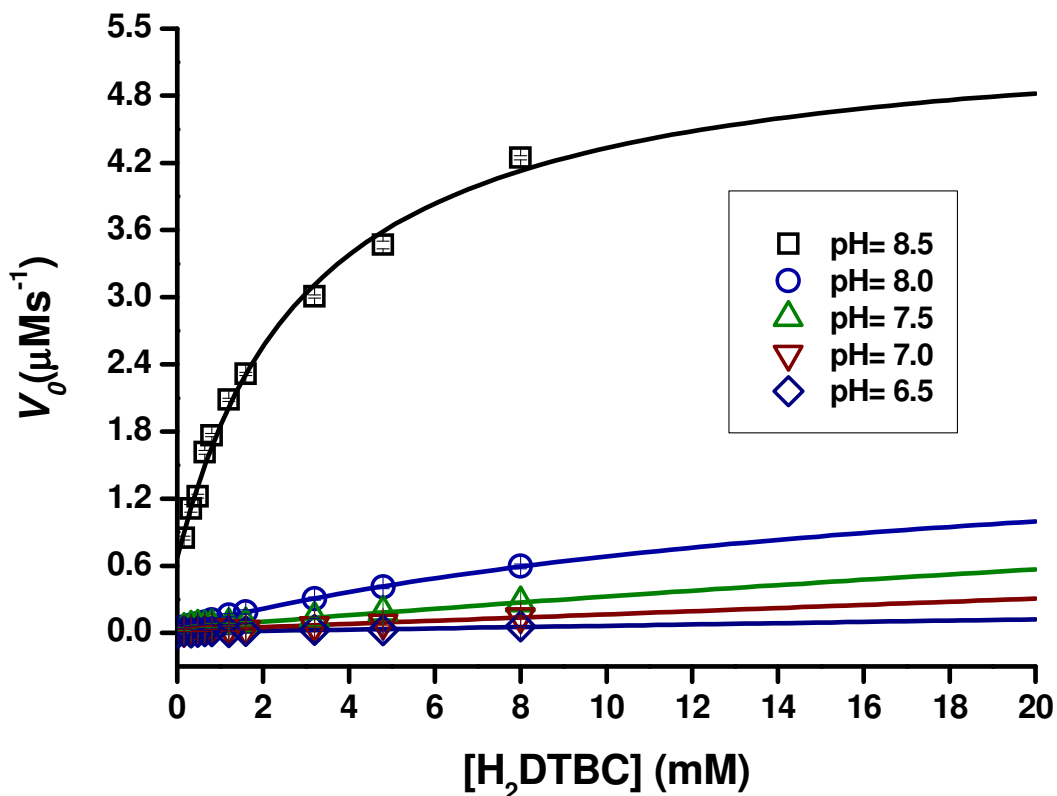


Figura 4.3.26. Curvas de velocidad v_0 vs. $[\text{H}_2\text{DTBC}]$ para el complejo tetranuclear con el ligante $\text{H}_6\text{Valbiim}$ en el intervalo de pH de 6.5 a 8.5 en mezcla $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 1:1. $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})] = 12.5 \mu\text{M}$. Las líneas representan los ajustes no lineales con la ecuación de Michaelis-Menten ($y = (V_{\text{max}} * x) / (K_M + x)$).

Tabla 4.3.3. Valores de los parámetros cinéticos k_{cat} , K_M , V_{max} y k_{cat}/K_M obtenidos para la reacción de oxidación del H_2DTBC a 25 °C en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 1:1, por el compuesto $[\text{Cu}_4(\text{Valbiim})]$. Los valores están expresados por mol de complejo.

pH	V_{Max} [μMs^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
6.5	—	—	—	0.5
7.0	—	—	—	1.2
7.5	—	—	—	2.5
8.0	1.9	18.9	0.15	8.1
8.5	4.9	3.09	0.39	127.2

Debido a la baja actividad presentada en este medio a pH menor de 8.0 no es posible ajustar satisfactoriamente los datos para determinar los valores individuales de K_M y V_{max} (y por lo tanto de k_{cat}) sin embargo se puede obtener el valor del cociente k_{cat}/K_M . A partir de pH 8.0, los datos obtenidos pueden ajustarse con el modelo de Michaelis-Menten obteniendo un coeficiente de correlación mayor a 0.99.

Al igual que en MeCN/H₂O, los valores de la eficiencia catalítica, k_{cat}/K_M , aumentan al aumentar el pH y se observa un aumento dramático al cambiar de pH 8.0 a 8.5, observando un cambio mayor al 1500 % en el valor de la eficiencia catalítica.

Al comparar los valores de k_{cat} obtenidos en ambas mezclas, observamos valores ligeramente mayores en MeOH/H₂O los cuales aumentan al incrementar el pH. Este incremento es semejante al observado en la mezcla MeCN/H₂O. Ahora bien, al comparar los valores K_M , éstos disminuyen al incrementar el pH del medio al igual que en MeCN/H₂O lo que habla de una mayor afinidad del complejo hacia el sustrato al incrementar la basicidad en ambos medios. Sin embargo, la disminución del valor de K_M es mayor en MeOH/H₂O que en MeCN/H₂O siendo éste el factor predominante del incremento en el cociente k_{cat}/K_M .

La diferencia observada en el valor de K_M al cambiar de medio se debe probablemente a la estabilidad de especies de Cu(I) en MeCN lo que dificulta la regeneración del catalizador de Cu(II). Aunado a esto, existe la posibilidad de formar especies coordinantes a Cu(I) en el ciclo catalítico, como pueden ser las especies radicales semiquinona, lo que aumentaría igualmente la estabilidad de las especies de Cu(I). Un estudio más detallado sobre este tema es presentado por González L.¹²⁷

4.3.3.5 Comparación con sistemas reportados

El primer análisis que se puede realizar es comparar los valores de eficiencia catalítica de los compuestos reportados anteriormente en el grupo de trabajo con los presentados en esta tesis. Recordemos que las condiciones seleccionadas para dicha comparación son MeCN/H₂O; 1:1 a pH = 7.5. Al realizar esta comparación observamos que los compuestos tetranucleares Cu₄L presentan valores de k_{cat}/K_M mayores que los reportados para los sistemas *abiertos*⁹⁸ y *cerrados*^{90,98} (Figura 4.3.27).

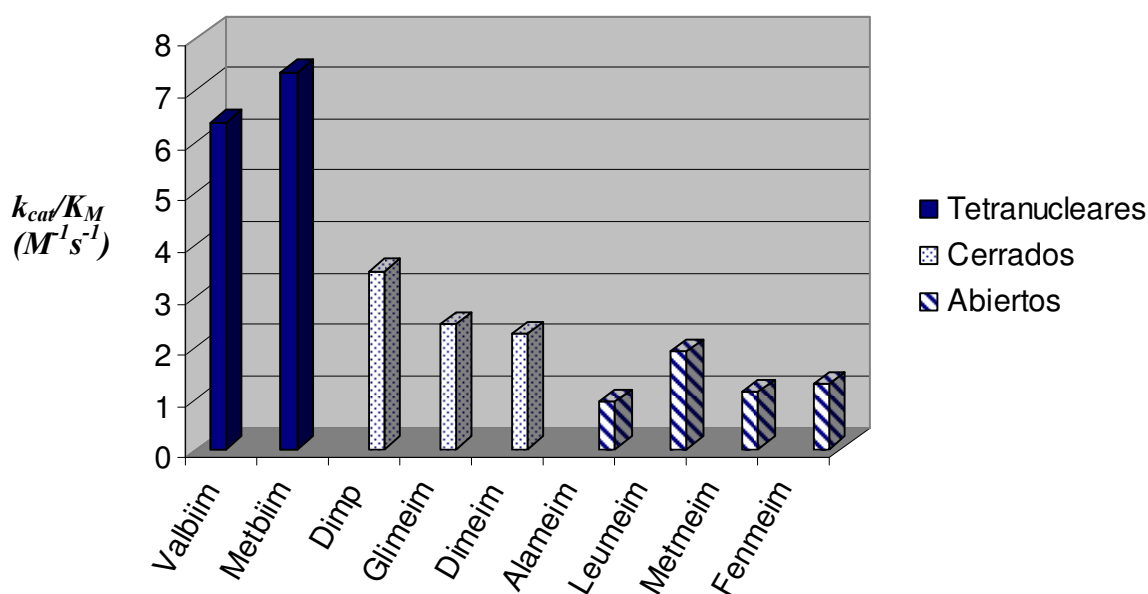


Figura 4.3.27. Comparación de los valores de eficiencia catalítica entre los sistemas *abiertos*, *cerrados* y *tetranucleares* obtenidos en mezcla MeCN/H₂O a pH 7.5 a 25 °C. Los valores de eficiencia catalítica están presentados por mol de complejo.

Como puede observarse en la gráfica anterior, los compuestos con los ligantes *abiertos* presentan prácticamente la mitad de la eficiencia catalítica observada con los ligantes *cerrados* y éstos a su vez, la mitad de los complejos tetranucleares.

Dado que las condiciones experimentales son exactamente las mismas, es posible comparar los valores de k_{cat} y K_M por separado (Figura 4.3.28). Al comparar los valores de k_{cat} observamos que los complejos tetranucleares presentan valores mucho mayores a los presentados por los otros dos sistemas, lo que habla de una mejor capacidad de los sistemas tetranucleares para transformar el sustrato a producto.

Por otro lado, al comparar los valores de K_M observamos que son similares a los de los sistemas *abiertos* y un poco mayores que los presentados por los sistemas *cerrados*. Esto hablaría de una menor afinidad hacia el sustrato, sin embargo, es necesario recordar que el valor de K_M está definido como el cociente de tres constantes, entre ellas k_{cat} de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_M = \frac{(k_2 + k_{cat})}{k_1}$$

Por ello, un aumento dramático en el valor de k_{cat} aumentará el valor de K_M a pesar de que exista un aumento en el valor de k_1 . Por lo anterior, la pequeña diferencia observada en el valor de K_M no implica necesariamente una disminución de la afinidad hacia el sustrato.

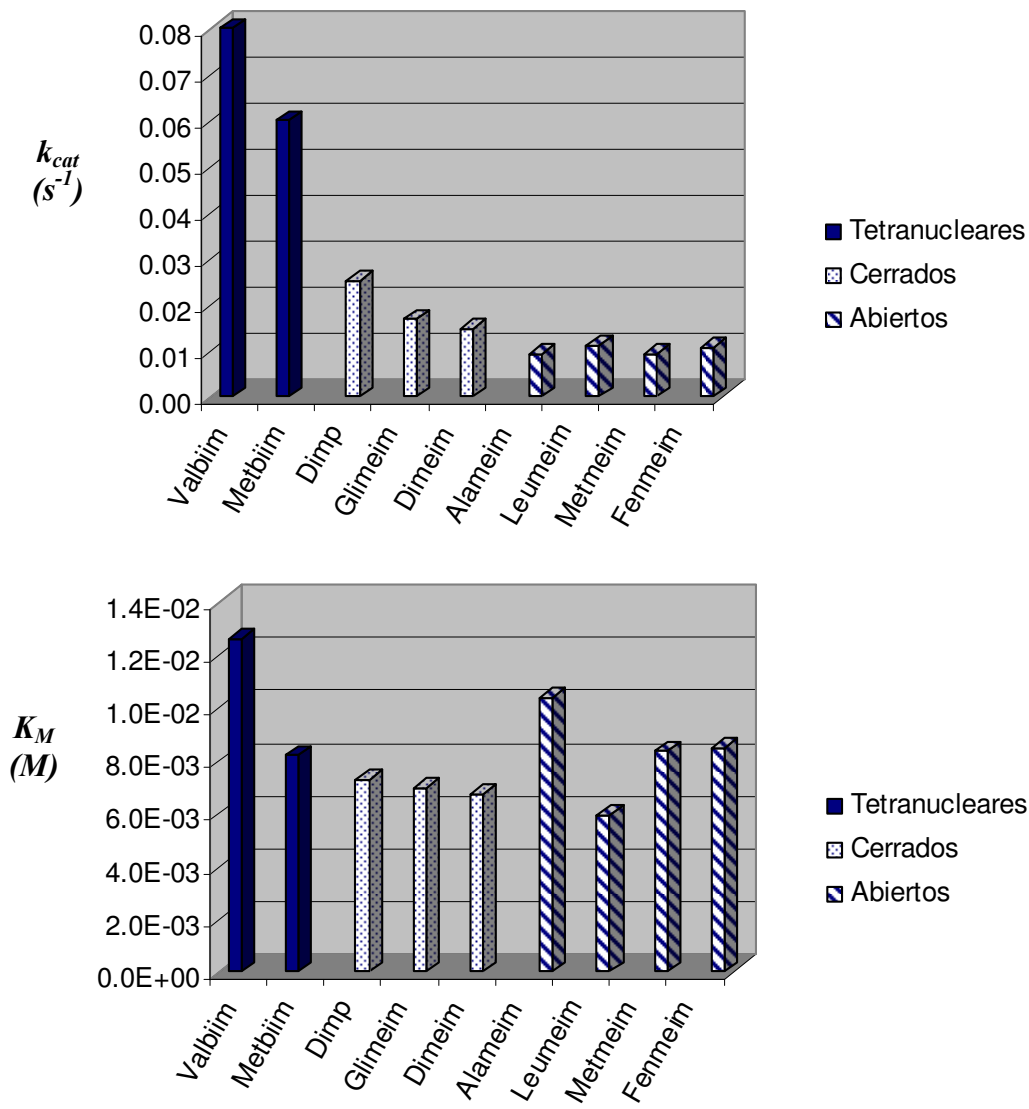


Figura 4.3.28. Comparación de los valores de constante catalítica (k_{cat} , arriba) y de constante de Michaelis (K_M , abajo) obtenidos para los sistemas abiertos, cerrados y tetranucleares en mezcla MeCN/H₂O a pH 7.5 a 25 °C. Los valores de constante catalítica están presentados por mol de complejo.

Es necesario mencionar que los valores de los parámetros cinéticos de los tres sistemas están calculados por unidad de catalizador, y no por unidad de cobre(II), por lo que en los compuestos tetranucleares se encontrará el doble de los sitios activos que en los otros dos sistemas. Siendo k_{cat} el parámetro que depende de la concentración del catalizador

de manera inversa, se obtendrían valores de la mitad de la intensidad, pero al ser estos valores mayores al doble de la intensidad de los otros dos sistemas, seguirían siendo mayores a éstos y por lo tanto el análisis realizado seguirá siendo válido.

Otro punto importante a destacar, es la similitud estructural entre los ligantes tetranucleantes y los ligantes de tipo *abierto*. Con ellos se obtienen compuestos isoestructurales (ver Figuras 4.3.7 y 4.3.16) a valores de pH bajos, en donde la diferencia radica en que los compuestos con los ligantes tetranucleantes son aproximadamente un dímero de los compuestos con los ligantes *abiertos*. Sin embargo, al analizar los valores de k_{cat} y K_M obtenidos para ambos sistemas, queda de manifiesto la importancia de la cercanía del otro par de átomos de cobre(II) en los sistemas tetranucleares, ya que los valores de k_{cat} son mayores al doble en estos compuestos.

De igual forma, es importante mencionar la diferencia estructural entre los complejos con los ligantes *cerrados* y los ligantes *abiertos* (similares a los ligantes tetranucleantes). En los complejos con los ligantes *cerrados* encontramos dos sitios *tricoordinados* idénticos, equivalentes al sitio *tricoordinado* en los complejos con los ligantes *abiertos*. En estos sitios el átomo de cobre(II) se encuentra coordinado a un grupo imidazol. Este grupo es importante ya que al ser un ligante aceptor π aumentará la dureza relativa de los iones de Cu(II) favoreciendo así la coordinación por ligantes duros, como es el caso del DTBC²⁻. Así, la mayor afinidad por el sustrato que presentan los complejos *cerrados* puede atribuirse a que sus dos sitios metálicos incluyen en su esfera de coordinación al grupo imidazol, mientras que los complejos con ligantes *abiertos* y tetranucleantes sólo presentan esta característica en la mitad de sus sitios de Cu(II).

Por otro lado, es posible comparar los valores de los parámetros cinéticos en MeCN/H₂O; 1:1 a pH = 8.5, para los complejos con los ligantes tetranucleantes y los ligantes *cerrados*.^{90, 91, 98} Como se puede apreciar en la Figura 4.3.29, los valores de la eficiencia catalítica de los complejos Cu₄L son ligeramente mayores a los obtenidos con los ligantes *cerrados* por mol de complejo.

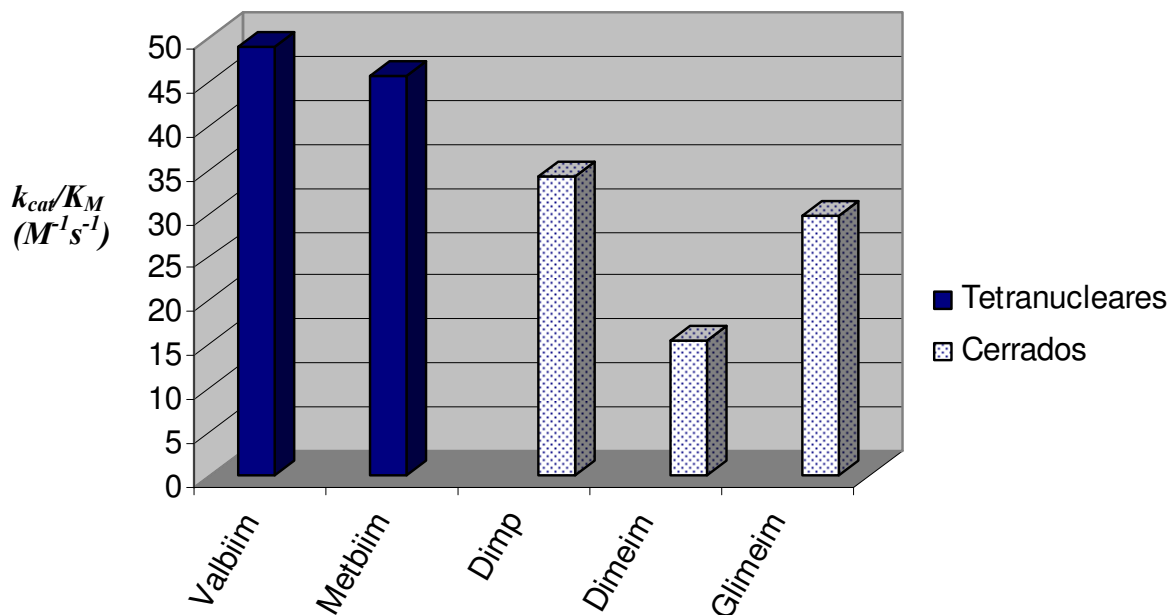


Figura 4.3.29. Comparación de los valores de eficiencia catalítica entre los sistemas cerrados y tetranucleares obtenidos en mezcla MeCN/H₂O a pH 8.5 a 25 °C. Los valores de eficiencia catalítica están presentados por mol de complejo.

Al comparar nuevamente los valores de k_{cat} y K_M por separado (Figura 4.3.30) observamos que el parámetro k_{cat} es quien contribuye mayoritariamente al cociente k_{cat}/K_M , siendo ahora la diferencia mucho mayor que a pH 7.5.

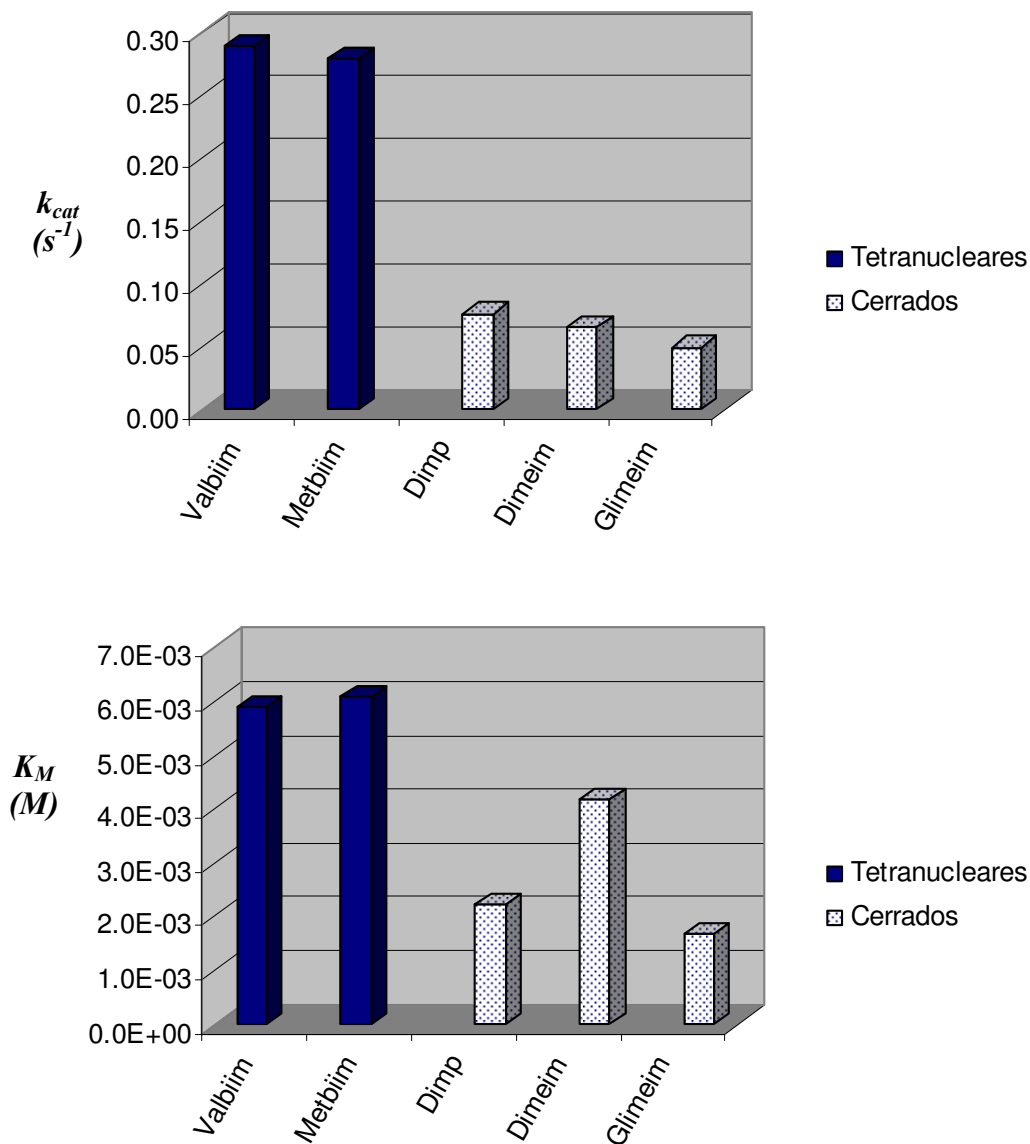
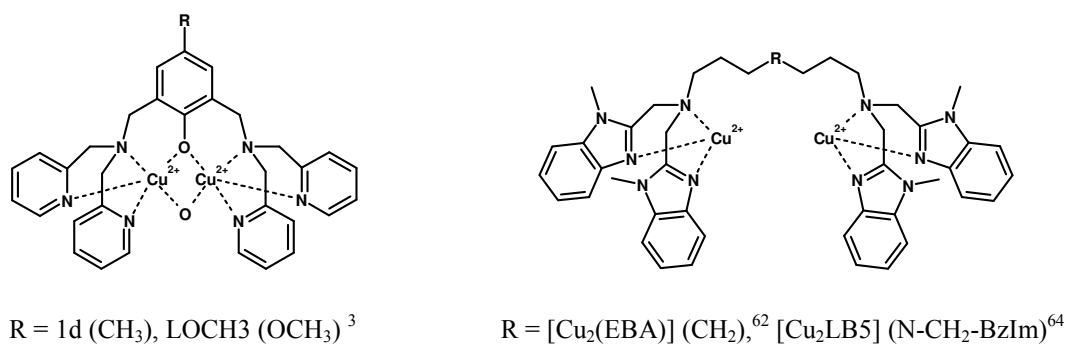
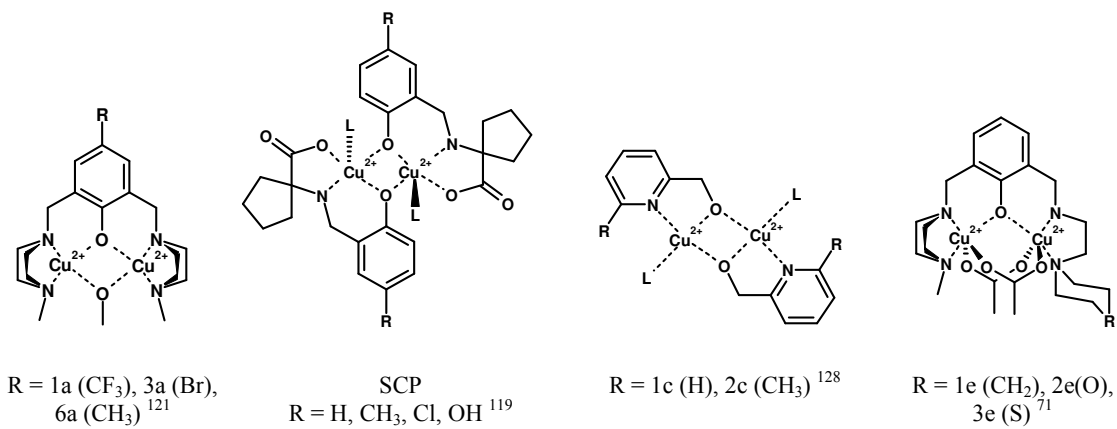
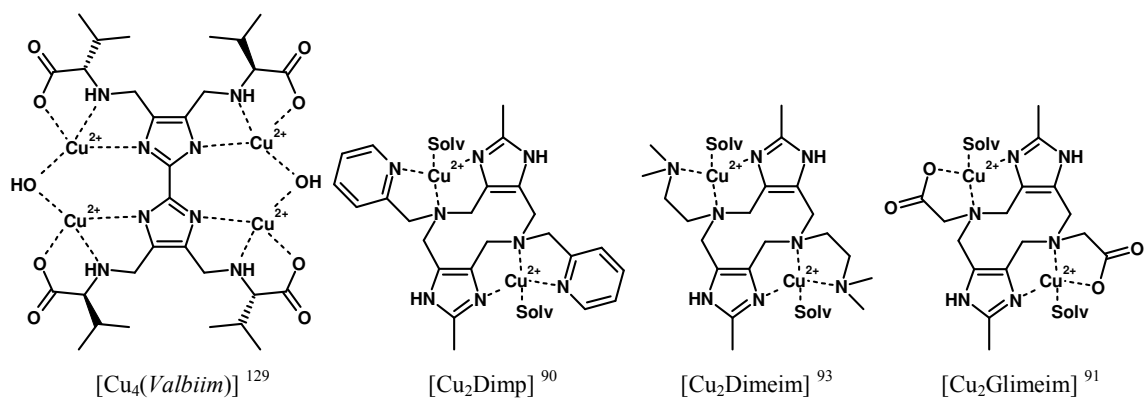


Figura 4.3.30. Comparación de los valores de constante catalítica (k_{cat} , arriba) y de constante de Michaelis (K_M , abajo) obtenidos para los sistemas cerrados y tetranucleares en mezcla MeCN/H₂O a pH 8.5 a 25 °C. Los valores de constante catalítica están presentados por mol de complejo.

Finalmente, al comparar los valores obtenidos de eficiencia catalítica de nuestros compuestos con algunos ejemplos encontrados en la literatura,^{3, 5, 62-64, 66, 71, 118-121, 128, 129} observamos que nuestros compuestos presentan valores intermedios entre los informados (Figura 4.3.31).



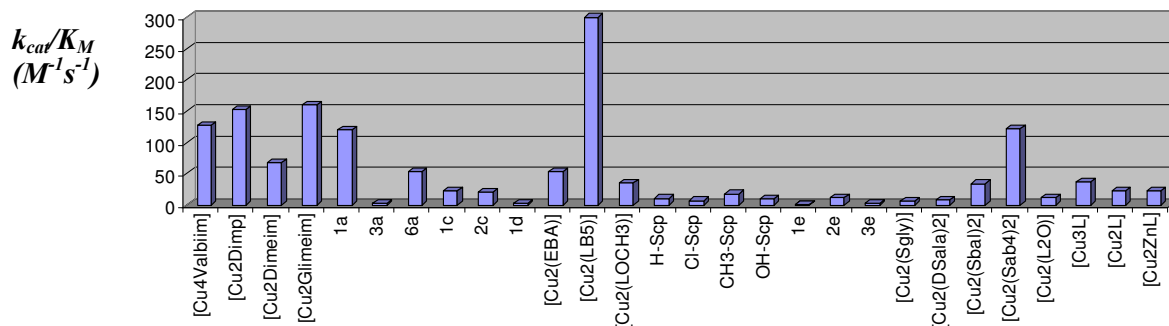


Figura 4.3.31. Comparación de los valores de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) entre los sistemas los nuevos sistemas tetranucleares y algunos ejemplos reportados en la literatura bajo las condiciones óptimas de cada sistema. Los valores de eficiencia catalítica están presentados por mol de complejo.

Al analizar la estructura de los complejos Cu_4L , observamos que estos sistemas presentan dificultad para adoptar distintas geometrías por la rigidez del grupo bisimidazol debido a la aromaticidad de éste. Esta rigidez provoca a su vez una disminución en la estabilidad de la especie de Cu(I), debido a la dificultad del sistema para adoptar una geometría tetraédrica característica de este ion.

Cuando se examinan las estructuras de los complejos con un valor de eficiencia catalítica sobresaliente, observamos que en la mayoría de los casos, éstos presentan sistemas con una alta flexibilidad. Esta característica estructural debe de ser tomada en cuenta en el desarrollo de nuevos sistemas miméticos.

5. Conclusiones y perspectivas

5.1. Conclusiones

Por medio de la reacción de Mannich en medio básico, es posible realizar una amino-metilación de los anillos imidazólicos en el 2,2'-bisimidazol por la condensación de formaldehído y aminoácidos. Dicha condensación se realiza en cada una de las posiciones libres en el Biim, dando como resultado un nuevo sistema de ligantes.

Los ligantes sintetizados en este trabajo contienen seis protones en su forma eléctricamente neutra (H_6L), la cual corresponde a la especie zwitteriónica. En las condiciones de trabajo, sólo es posible determinar cuatro de las doce protonaciones probables. Por medio de estudios de RMN 1H se demostró que los sitios protonables en los ligantes corresponden a las cuatro aminas presentes en ellos, las cuales presentan valores de pK_a ente 7 y 12. Los grupos carboxílicos en el ligante muestran valores de pK_a muy pequeños y por lo tanto se encuentran desprotonados en disolución acuosa. Los grupos imidazólicos en ausencia de ion metálico no presentan protonación (formación de grupo imidazolio) o desprotonación (formación de grupo imidazolato) en las condiciones de trabajo.

Este nuevo sistema de ligantes es capaz de formar complejos polinucleares con cobre(II). En disolución acuosa se ve favorecida la formación de complejos tetranucleares con valores de constantes de formación altos, mostrando así una gran afinidad hacia los iones $Cu(II)$, mientras que las especies de menor nuclearidad son casi imperceptibles en disolución.

Al someter a estos ligantes a bajas concentraciones de cobre(II) es posible obtener sistemas de menor nuclearidad. Estos sistemas se estabilizan en estado sólido, con una proporción de seis átomos de cobre(II) por dos moléculas de ligante presentando puentes μ -OH e imidazolato entre los iones metálicos.

Los sistemas tetranucleares exhiben distintas estructuras en disolución acuosa. En medio ácido estos sistemas presentan una estructura similar a la de los complejos *abiertos*, en la cual dos de los iones metálicos se encuentran *tricoordinados* mientras que los dos restantes se encuentran *dicoordinados* por el ligante. El aumento en la basicidad del medio favorece la formación de grupos puente en los complejos llevando a la formación de grupos imidazolato puente y posteriormente a la formación de grupos hidroxio puente. Los valores de pK_a obtenidos para estos sistemas concuerdan con los reportados en la literatura.

En disolución metanólica los valores de pK_a disminuyen y la aparición de los grupos puente se da de manera concertada.

La presencia de los grupos imidazolato e hidroxio puente provocan un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los iones de cobre(II), siendo mayor el acoplamiento provocado por los puentes μ -OH. Este acoplamiento magnético se observa tanto en estado sólido como en disolución.

Los sistemas tetranucleares presentan actividad catalítica en la reacción de oxidación del 3,5-di-*tert*-butilcatecol, empleando como oxidante, oxígeno molecular. Esta actividad se ve afectada por diversos factores.

El aumento en la basicidad del medio conlleva a un aumento en la actividad catalítica de los sistemas lo cual coincide con la formación de grupos puente entre los iones metálicos. Este incremento es aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor al observado por el cambio en la hidrofobia del residuo del aminoácido, revelando que los cambios en la esfera de coordinación de los iones de Cu(II) son más importantes que las interacciones hidrofóbicas con el medio.

La actividad catalítica de estos sistemas en mezcla MeOH/H₂O es mayor que en mezcla MeCN/H₂O. Esta diferencia puede atribuirse a la estabilización que sufren las especies de Cu(I) en acetonitrilo, lo que dificulta la regeneración del catalizador de cobre(II).

Estos sistemas presentan dificultad para adoptar distintas geometrías por la rigidez del grupo bisimidazol debido a la aromaticidad de éste. Esta rigidez provoca a su vez una disminución en la estabilidad de las especies de Cu(I), induciendo la descoordinación del ion metálico y consecuentemente una disminución de la actividad catalítica.

5.2. Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos, se proponen las siguientes recomendaciones para el desarrollo de nuevos sistemas biomiméticos de la enzima catecol oxidasa:

Estos sistemas son altamente solubles lo que dificulta en gran medida su aislamiento, esto es probablemente debido a la alta carga eléctrica que presentan. Trabajando con sistemas de menor nuclearidad, como pueden ser sistemas dinucleares, la carga total del complejo disminuiría, facilitando así su aislamiento. De igual forma se recomienda trabajar con sistemas que no sean zwitteriónicos para facilitar su aislamiento.

El diseño de nuevos ligantes debe de contemplar sitios tricoordinados para cada átomo de cobre y que la disposición de estos sitios favorezca la formación de grupos μ -OH entre los núcleos metálicos, ya que esta característica estructural incrementa la actividad catalítica de los complejos.

Se recomienda sintetizar ligantes con una mayor proporción de grupos aceptores π , como son los grupos imidazol o pirazol, para aumentar la dureza relativa de los iones de Cu(II) favoreciendo así la coordinación por el DTBC²⁻.

Es recomendable aumentar el tamaño del anillo quelato a seis miembros para facilitar el intercambio de Cu(II)/Cu(I) sin que se presente una posible descoordinación del ión metálico. Con el mismo propósito, es aconsejable cambiar la distribución de los átomos donadores de un ligante “lineal” a un ligante tipo tripodal.

6. Sección experimental

En el presente capítulo se describen los reactivos, la preparación de muestras y los equipos empleados en la caracterización, así como la descripción detallada de las síntesis realizadas.

6.1. Reactivos

En la síntesis y caracterización de los compuestos presentados en esta tesis y en su análisis posterior se utilizaron los siguientes reactivos:

Carbonato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 99 %, Aldrich.

Glioxal bisulfito de sodio, $[-\text{CH}(\text{OH})\text{SO}_3\text{Na}]_2$, 99 %, Aldrich.

Etilenglicol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 99 %, Aldrich.

Carbón activado, Aldrich.

Formaldehído, 37.5 % en H_2O , Mallinckrodt.

L-alanina, 99 %, Aldrich.

L-valina, 99 %, Aldrich.

L-metionina, 99 %, Aldrich.

L-fenilalanina, 99 %, Aldrich.

Hidróxido de sodio, 98 %, Aldrich.

Hidróxido de potasio, 85 %, Aldrich.

Hidróxido de amonio, 25.0-30.0 % como NH_3 , Aldrich.

Hidróxido de tetrabutil amonio, Bu_4NOH , 1M en MeOH , Aldrich.

Ácido acético glacial, 98 %, J.T. Baker.

Ácido perclórico, 70 %, Mallinckrodt.

Ácido clorhídrico, 37.7 % J.T. Baker.
Ácido nítrico, 62.5 %, J.T. Baker.
Acetona, 99.5 %, Aldrich.
Metanol, 99.8 %, Aldrich.
Etanol, 99.5 %, Aldrich.
2-Propanol, 99.5 %, Aldrich.
Metanol grado espectroscópico, 99.9 %, Aldrich.
Acetonitrilo grado espectroscópico, 99.5 %, Aldrich.
Nitrato de cobre, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, 99 %, Aldrich.
Acetato de cobre, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 98 %, Aldrich.
Cloruro de cobre, CuCl_2 , 99.8 %, Aldrich.
Perclorato de cobre, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 98 %, Aldrich.
Carbonato básico de cobre, $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$, 98 %, Aldrich.
Tetrafluoroborato de cobre, $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12-22 % de cobre(II), Aldrich.
Agua deuterada, D_2O , 99.9 %, Aldrich.
Ácido clorhídrico deuterado, DCl , 20 % en D_2O al 99 %, Aldrich.
Hidróxido de sodio deuterado, NaOD , 40 % en D_2O al 99 %, Aldrich.
Biftalato de potasio, 99.95-100 %, Aldrich.
Bromuro de Potasio, grado espectroscópico, Aldrich.
Nitrato de potasio, KNO_3 , 99 % Aldrich.
MES, Ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico), 99.5 %, Sigma.
HEPES, Ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfónico]), 99.5 %, Sigma.
Sigma.
TRIS, (Tris(hidroximetil)aminometano, 99.5 %, Sigma.
3,5-Di-*tert*-butilcatecol, H_2DTBC , 99 %, Aldrich.
3,5-Di-*tert*-butil-*o*-benzoquinona, DTBQ , 99 %, Aldrich.

6.2. Equipos

A continuación se mencionan los equipos empleados en este trabajo para cada una de las técnicas descritas:

Los **análisis elementales** presentados en esta tesis se obtuvieron en un analizador elemental Fisons EA modelo 1108 de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

Los **análisis termogravimétricos** se realizaron en un termoanalizador Mattler Toledo con módulos TGA/SDTA851e usando para el análisis el programa STARe V8.4 (USAI).

Los espectros de **infrarrojo Mid-IR** se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer FTIR 1600 (USAI) y Nicolet Avatar FT-IR en pastilla de KBr operando en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** se obtuvieron en un espectrómetro VARIAN Unity Inova (USAI) operando a 300.2 MHz para ^1H y a 75.3 MHz para ^{13}C y en un espectrómetro VARIAN Unity Inova operando a 200 MHz de la Universidad de Guanajuato a 25 °C.

Los espectros de **masas** se obtuvieron por la técnica de FAB^+ , utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución JEOL JMS-5X 102 A acoplado a un cromatógrafo de gases (USAI).

La **susceptibilidad magnética** de los compuestos se determinó por medio del método de Gouy en una balanza magnética Jonson Matthey-Auto para muestra sólida de la Facultad de Química, UNAM.

Los análisis de **absorción atómica** se realizaron en un equipo GCV 932AA de la Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de **reflectancia difusa** se colectaron en un espectrofotómetro VARIAN Cary 5E UV-Vis-NIR.

Los **espectros electrónicos UV-Vis** se obtuvieron usando un espectrofotómetro Hewlett Packard Agilent 8452-A de arreglo de diodos operando en el intervalo de 190 a 1100 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Adicionalmente, se utilizó un equipo “Stopped-flow” de Applied Photophysics SX .18MV con un monocromador pbp Spectra Kinetics 05-109.

Los espectros de **resonancia paramagnética electrónica** en disolución congelada se obtuvieron en un espectrofotómetro JEOL RE2X operando en frecuencias de banda-X a 77 K, usando DPPH ($g = 2.0036$) como estándar de la Universidad de Leiden, Holanda. Los espectros de EPR en sólido fueron obtenidos en un equipo Bruker FA-300 (USAI) operando en banda-X a 77 K.

Las mediciones de **difracción de rayos X** se realizaron usando una radiación de sincrotrón monocromada Si(111) ($\lambda = 0.69110 \text{ \AA}$) y un difractómetro Bruker APEX II CCD empleando los procedimientos y programas usuales para una estación 9.8 de Daresbury SRS.¹³⁰ Los datos de intensidad se procesaron usando SAINT v7.06a.¹³¹ La estructura se resolvió usando métodos directos con la paquetería del programa SHELXTL.^{132, 133}

La medición de la **susceptibilidad magnética en función de la temperatura** para el compuesto **4** se determinó en el intervalo de temperaturas de 2-350 K en un magnetómetro Quantum Design MPMS-7XL SQUID, y un campo aplicado de 0.05 a 7 T. Los datos fueron corregidos por la contribución del contenedor de la muestra determinada experimentalmente. La contribución diamagnética del compuesto fue estimada usando las constantes de Pascal.¹⁰⁸

Las **titulaciones potenciométricas** realizadas para obtener los valores de las constantes de acidez y las constantes de formación se obtuvieron en un titulador automático Titrino 702 SM en una celda de 25 mL termostatada a 25 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

6.3. Síntesis

Preparación de 2,2'-Bisimidazol (H_2Biim)

De acuerdo al procedimiento publicado,¹³⁴ se mantiene a reflujo una suspensión de glioxal bisulfito de sodio (50 g) y de $(NH_4)_2CO_3$ (10 g) en 250 mL de NH_4OH concentrado por 2 h con agitación constante. Durante ese tiempo el glioxal bisulfito se disuelve, la disolución cambia de incolora a café oscuro, y se forman agujas del producto de color canela. El producto crudo se colecta por filtración y se lava con agua y acetona (2.5 g, 44 % basado en el glioxal). El producto se disuelve en 150 mL de etilenglicol en ebullición y se decolora con 1 g de carbón activado. El filtrado se enfría en baño de hielo y el producto cristaliza como agujas blancas que son lavadas con agua y acetona (rendimiento 2 g, 35 %). 1H RMN (300.2 MHz, D_2O/DCI pD = 1, TMS): δ 7.5 (s, H-Ar). Anal. Elem. Cal para $C_6H_6N_4$: C, 53.72 %; H, 4.51 %; N, 41.77 %. Encontrado: C, 53.88 %; H, 4.50 %; N, 41.81 %. PM = 134.14 g/mol

Ligante $H_4Alameim$ AcO • H_2O

El ligante se sintetizó de acuerdo al procedimiento previamente descrito⁹⁴. Se disuelven en 60 mL de agua, 3.56 g (40 mmol) de L-alanina y 1.642 g (20 mmol) de 2-metilimidazol. A esta disolución se le agregan, gota a gota y en agitación constante, 4.8 mL (60 mmol) de una disolución al 37 % de formaldehído diluidos en 40 mL de agua. La disolución resultante se ajusta a pH = 12.5, por adición de una disolución de KOH concentrada. La mezcla de reacción se deja en agitación a 55 °C por 24 h, después del cual se ajusta el pH a 5.7 por adición de ácido acético glacial. La disolución se lleva a una cuarta

parte de su volumen inicial (*ca.* 25 mL) y se deja reposar por dos días. El producto aislado se filtra y lava con etanol frío y se seca con vacío, obteniendo un polvo blanco estable al aire y a la humedad.

$H_4AlameimAcO \cdot H_2O$ (3.189 g, rendimiento del 44 %). Anal. Elem. Cal para $C_{14}H_{24}N_4O_6 \cdot H_2O$: C, 46.40 %; H, 7.23 %; N, 15.46 %. Encontrado: C, 47.13 %; H, 7.09 %; N, 15.9 %. (PM = 362.39 g/mol)

Ligante $H_6Alabiim$

En la síntesis del ligante $H_6Alabiim$, se disolvieron 5.31 g (60 mmol) de L-alanina en 120 mL de agua y se le agregaron, gota a gota, 7.2 mL (90 mmol, un exceso del 50 %) de formaldehído al 37.5 %, disuelto en 30 mL agua. Esta mezcla se ajustó a un pH de 12.5 con KOH y posteriormente se le agregaron 2 g (15 mmol) de H_2Biim . El resultado es una suspensión, que al dejar en agitación a 55 °C por 12 h, se obtiene una disolución amarillenta pálida. Esta disolución se deja agitando a temperatura ambiente por 2 días más y se obtiene una disolución con una tonalidad naranja tenue la cual presenta un ligero decremento en el valor de pH inicial, lo que concuerda con la desprotonación del H_2Biim por la aminometilación. Después del tiempo de reacción, esta disolución se lleva a un pH de 7.5 por adición de ácido acético glacial. En el proceso de neutralización, se observa la desaparición casi total de la coloración quedando un remanente de color amarillo. Una vez alcanzado el valor de pH deseado, la disolución se concentra a una cuarta parte del volumen inicial (~ 40 mL), empleando un rotavapor. El precipitado obtenido se filtra y las aguas madres se enfrían y filtran nuevamente. El producto obtenido se purifica con tres lavados sucesivos con poca agua fría y metanol obteniendo un polvo blanco estable al aire y a la humedad.

$H_6Alabiim$ (2.3 g, rendimiento del 23 %). 1H RMN (300.2 MHz, D_2O/DCI pD = 1, TMS): δ 4.24 (s, 2H, $Biim-CH_2-N$); δ 4.04 (c, J = 7.5 Hz, 1H, $\alpha-CH$); δ 1.38 (d, J = 7.5 Hz, 3H, $\beta-CH_3$). ^{13}C NMR (75.3 MHz, D_2O/DCI pD = 1): δ 15.5 ($\beta-CH_3$), δ 40.2

(Biiim-CH₂-N), δ 56.6 (α -CH), δ 128.8 (C4 y C5 Biiim), δ 138.3 (C2 Biiim), δ 172.6 (COOH). Anal. Elem. Cal para C₂₂H₃₄N₈O₈ • 7H₂O: C, 39.7 %; H, 7.3 %; N, 16.9 %. Encontrado: C, 39.6 %; H, 7.1 %; N, 16.7 %. El análisis TG confirma el contenido de agua por una pérdida de masa del 19 % a 170 °C. (PM = 664.7 g/mol)

Ligantes H₆Valbiiim, H₆Metbiiim y H₆Fenbiiim

Los ligantes H₆Valbiiim, H₆Metbiiim y H₆Fenbiiim fueron sintetizados de manera análoga al ligante H₆Alabiiim. Para ello se disolvieron en 120 mL de agua 6.982 g, 8.953 g, 7.870 g y 9.912 g (60 mmol) de L-valina, L-metionina, y L-fenilalanina, respectivamente agregando KOH para lograr disolverlos en su totalidad. A las disoluciones obtenidas se les agregaron, 7.2 mL (90 mmol) de formaldehído al 37.5 %, disuelto en 30 mL agua y se les ajustó el pH a 12.5 con KOH. Posteriormente, se les agregaron 2 g (15 mmol) de H₂Biiim. La suspensión resultante se dejó en agitación a 55 °C por 12 h, obteniendo una disolución amarillenta pálida que se deja agitando a temperatura ambiente por 2 días más hasta obtener una disolución con una tonalidad naranja tenue. Esta disolución se lleva a un pH = 6.5 por adición de ácido acético glacial. El producto empieza a precipitar a partir de un pH \approx 10. El precipitado obtenido se filtra y purifica en un equipo soxhlet con agua durante 4 horas y posteriormente con metanol durante 2 horas más, obteniendo un polvo blanco estable al aire y a la humedad.

H₆Valbiiim (2.1 g, rendimiento del 17.3 %). ¹H RMN (300.2 MHz, D₂O/DCl pD = 1, TMS): δ 4.21 (s, 2H, Biiim-CH₂-N); δ 3.86 (d, J = 3.9 Hz, 1H, α -CH); δ 2.15 (m, 1H, β -CH); δ 0.83 (d, J = 7.2 Hz, 3H, -CH₃); δ 0.76 (d, J = 6.9 Hz, 3H, -CH₃). ¹³C RMN (75.3 MHz, D₂O/DCl pH = 1): δ 19.0 (-CH₃), δ 20.6 (-CH₃), δ 31.8 (β -CH), δ 43.3 (Biiim-CH₂-N), δ 68.1 (α -CH), δ 130.4 (C4 y C5 Biiim), δ 140.4 (C2 Biiim), δ 172.6 (COOH). Anal. Elem. Cal para C₃₀H₅₀N₈O₈ • 9H₂O: C, 44.3 %; H, 8.4 %; N, 13.8 %. Encontrado: C, 44.9 %; H, 8.2 %; N, 13.8 %. El análisis TG confirma el contenido de agua por una pérdida de masa del 20 % a 150 °C. (PM = 812.9 g/mol)

$H_6Metbiim$ (3.3 g, rendimiento del 25.8 %). 1H RMN (300.2 MHz, D_2O/DCI pD = 1, TMS): δ 4.20 (s, 2H, Biim- CH_2-N); δ 4.03 (t, J = 6 Hz, 1H, α -CH); δ 2.32 (m, 2H, β - CH_2); δ 1.96 (t-d, 2H, - CH_2); δ 1.71 (s, 3H, - CH_3). ^{13}C RMN (75.3 MHz, D_2O/DCI pH = 1): δ 16.2 (- CH_3), δ 30.6 (β & γ - CH_2), δ 42.4 (Biim- CH_2-N), δ 60.8 (α -CH), δ 130.5 (C4 y C5 Biim), δ 140.5 (C2 Biim), δ 172.8 (COOH). Anal. Elem. Cal para $C_{30}H_{50}N_8O_8S_4 \cdot H_2O$: C, 42.3 %; H, 6.9 %; N, 13.2 %, S, 15.1 %. Encontrado: C, 42.0 %; H, 6.6 %; N, 13.7 %; S, 14.8 %. El análisis TG confirma el contenido de agua por una pérdida de masa del 10 % a 150 °C. (PM = 851.1 g/mol)

$H_6Fenbiim$ (3.9 g, rendimiento del 30.3 %). 1H RMN (300.2 MHz, $D_2O/NaOD$ pD = 12, TMS): δ 6.97 (m, 5H, H-Ar); δ 3.25 (sistema AB, J = 13.3 Hz, $2C = 47.3$ Hz, 2H, Biim- CH_2-N); δ 3.07(t, J = 6.9 Hz, 1H, α -CH); δ 2.61 (d, J = 6.9 Hz, 2H, β - CH_2). ^{13}C RMN (75.3 MHz, $D_2O/NaOD$ pD = 12, TMS): δ 39.2 (β - CH_2), δ 42.3 (Biim- CH_2-N), δ 64.6 (α -CH), δ 126.7 (CH-*p*-Ar), δ 128.9 (CH-*m*-Ar), δ 129.4 (CH-*o*-Ar), δ 133.1 (C4 y C5 Biim), δ 138.4 (C-Ar), δ 144.3 (C2 Biim), δ 181.4 (COOH). Anal. Elem. Cal para $C_{46}H_{50}N_8O_8 \cdot 1H_2O$: C, 64.2 %; H, 6.1 %; N, 13.0 %. Encontrado: C, 63.5 %; H, 6.1 %; N, 13.3 %. (PM = 860.9 g/mol)

[Cu₄(H₂Valbiim)(H₂O)₁₀](BF₄)₄ • 6H₂O (1)

Para sintetizar el compuesto **1** se disolvieron 84.9 mg (246 μ mol) de $Cu(BF_4)_2 \cdot 6H_2O$ y 50 mg (61.5 μ mol) de $H_6Valbiim \cdot 9H_2O$ en 20 mL de metanol. La disolución verde resultante se concentró en una parrilla de calentamiento a un volumen menor a 5 mL y posteriormente se agregó éter etílico para inducir la precipitación. El precipitado azul aislado fue lavado con *i*-propanol frío y secado a vacío. El producto obtenido es estable al aire y a la humedad.

(25 mg, rendimiento del 26.5 %). Anal. Elem. Cal para $Cu_4C_{30}H_{46}N_8O_8B_4F_{16} \cdot 16H_2O$: C, 23.45; H, 5.12; N, 7.29; Cu, 16.54. Encontrado: C, 23.32; H, 5.02; N, 7.18; Cu, 16.49. Reflectancia Difusa: $\lambda_{max} = 316$ nm TC y 694 nm d-d (PM = 1536.38 g/mol)

[Cu₄(*Valbii*m)(μOH)₂(H₂O)₄] • 5H₂O (2)

El compuesto **2** fue sintetizado disolviendo 84.9 mg (246 μmol) de Cu(BF₄)₂ • 6H₂O con 50 mg (61.5 μmol) de H₆*Valbii*m • 9H₂O en 20 mL de metanol. Posteriormente se le agregaron 490 μL de una disolución metanólica 1 M de Bu₄NOH (8 equivalentes de base). El precipitado verde obtenido se lavó con metanol frío y se secó con vacío y es estable al aire y a la humedad.

(77 mg, rendimiento del 81.5 %). Anal. Elem. Cal para Cu₄C₃₀H₄₈N₈O₁₀ • 9H₂O: C, 32.84; H, 6.06; N, 10.21; Cu, 23.17. Encontrado: C, 32.35; H, 5.88; N, 10.00; Cu, 23.19. El análisis TG confirmó el contenido de agua en la muestra por una pérdida de 14.3 % de la masa total en el intervalo de 50-100 °C. Reflectancia Difusa: λ_{max} = 328 nm TC (Cu-OH Cu), 366 nm TC (Cu-imd-Cu), 658 nm d-d. (PM = 1097.07 g/mol)

Bu₄N [Cu₄(*Valbii*m)(μ-OH)₂(OH)(H₂O)₃] • 5H₂O (3)

El compuesto **3** se obtuvo disolviendo 75 mg (68.4 μmol) de **2** y en 5 mL de metanol por la adición de 100 mL de Bu₄NOH, 1 M (~2 equivalentes). La disolución de color verde intenso resultante se concentró hasta casi sequedad y se le agregó éter etílico para inducir la precipitación. El precipitado verde aislado se lavó con *i*-propanol frío y se secó con vacío. El polvo verde obtenido es estable al aire y a la humedad.

(22 mg, rendimiento del 24.0 %). Anal. Elem. Cal para Cu₄C₄₆H₈₅N₉O₁₁ • 8H₂O: C, 41.28; H, 7.61; N, 9.42; Cu, 18.99. Encontrado: C, 40.55; H, 7.3; N, 9.27; Cu, 19.03. El análisis TG confirmó el contenido de agua en la muestra por una pérdida de 11 % de la masa total en el intervalo de 50-100 °C. Reflectancia Difusa: λ_{max} = 340 nm TC (Cu-OH-Cu), 367 nm TC (Cu-imd-Cu), 634 nm d-d. (PM = 1338.53 g/mol)

[Cu₃(H*Valbiim*)(μ-OH)(H₂O)] • 4H₂O (4)

Para sintetizar el compuesto 4 se dejó en reflujo una suspensión que contenía 55 mg de CuCO₃•Cu(OH)₂ (250 μmol) y 102 mg (125 μmol) de H₆*Valbiim* • 9H₂O en 100 mL de metanol por cuatro días. Al cabo del tiempo de reacción la disolución verde se filtró y se dejó en evaporación lenta. Los cristales verdes obtenidos son estables al aire y a la humedad.

(45 mg, rendimiento del 35 %). Anal. Elem. Cal para Cu₃C₃₀H₄₆N₈O₉ • 5H₂O: C, 38.19; H, 5.98; N, 11.88. Encontrado: C, 38.48; H, 5.13; N, 11.48. El análisis TG confirmó el contenido de agua en la muestra por una pérdida de 10.5 % de la masa total en el intervalo de 50-100 °C. Reflectancia Difusa: λ_{max} = 346 nm TC (Cu-OH-Cu), 386 nm TC (Cu-imd-Cu), 545 y 655 nm d-d. (PM = 943.45 g/mol)

6.4. Difracción de rayos-X

Para el estudio de difracción de rayos X se seleccionó un pequeño monocristal del compuesto 4 de un tamaño aproximado de 0.03 × 0.08 × 0.08 mm³ y fue colocado en el difractómetro a *ca.* 150(2) K. La estructura se resolvió usando métodos directos con la paquetería del programa SHELXTL. Todos los átomos excepto los átomos de hidrógeno fueron refinados anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno se encontraron por mapas de Fourier diferenciados y se colocaron geoméricamente en sus átomos circundantes, excepto H12A, H21A, H30A, H39A, H39B y H47A que fueron refinados con distancias restringidas a sus respectivos átomos (hidróxido O47, N12, N21, N30 y N39) y para H39A y H39B a los átomos cercanos (C38 y C40). Los átomos de hidrógeno de las cuatro moléculas de agua de hidratación no se localizaron exitosamente y por lo tanto no se incluyen en el modelo estructural. La función minimizada fue $[w(F_o^2 - F_c^2)]$ con el peso de las reflexiones como $w^{-1} = [2F_o^2 + (g_1P)^2 + (g_2P)]$ y en donde $P = [\max F_o^2 + 2 F_c^2]/3$. Los detalles del análisis de refinamiento se presentan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Datos cristalográficos y de refinamiento del compuesto 4.

empirical formula	C ₃₀ H ₄₈ Cu ₃ N ₈ O ₁₄
fw	933.40
space group	P6122
	$a = 15.270(1)$
	$b = 15.270(1)$
Unit cell dimensions	$c = 61.093(5)$
(Å, deg.)	$\alpha = 90.00$
	$\beta = 90.00$
	$\gamma = 120.00$
V (Å ³), Z	12336.6(14), 12
temp (K)	150(2)
λ (Å)	0.69110
D_{calcd} (mg m ⁻³)	1.508
μ (mm ⁻¹)	1.589
final R indices [$I > 2\sigma(I)$] ^[a]	$R_1 = 0.0399$
	$wR_2 = 0.1039$
final R indices (all data) ^[a]	$R_1 = 0.0422$
	$wR_2 = 0.1053$

$$[a] R_1 = \Sigma|F_0 - F_c|/|F_0|. R_2 = \{\Sigma[w(F_0^2 - F_c^2)^2]/\Sigma[wF_0^4]\}^{1/2}.$$

Los datos cristalográficos de la estructura del compuesto 4 en la base de datos de Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC 649293) y pueden obtenerse de manera gratuita en CCDC, 12 union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: (+44) 1223- 336-033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

6.5. Constantes de equilibrio

Para determinar de las constantes de equilibrio se realizaron titulaciones potenciométricas tanto de los ligantes como de los complejos formados *in situ*, usando disoluciones de NaOH y HNO₃ normalizadas (0.1 N). Todas las titulaciones fueron hechas a 25 °C con una fuerza iónica 0.1 M (KNO₃) bajo atmósfera de nitrógeno. Es necesario que las disoluciones se encuentren libres de carbonatos (concentración total de CO₃²⁻ menor al 2 %), de lo contrario esta especie tiene que ser considerada en los modelos, lo que dificultaría los cálculos.

Preparación y normalización del NaOH 0.1N

En la preparación del NaOH libre de carbonatos es necesario partir de una disolución saturada de NaOH, ya que los carbonatos son insolubles en estas condiciones. Para ello se pesan 6 g de NaOH y se disuelven en agua, obteniendo un volumen final de 6 mL. Esta disolución se deja reposar hasta que los carbonatos sedimenten. Se toman 4 mL de la disolución saturada y se aforan a 1 L con H₂O destilada y previamente hervida.

Para normalizar el hidróxido de sodio se utiliza biftalato de potasio (C₈H₅O₄K, PM = 204.23 g/mol) como patrón primario. El biftalato se deja secar a 80 °C por 24 h en una estufa con vacío. Se pesan 0.4089 g de biftalato de potasio y se aforan a 100 mL con una disolución de KNO₃ 0.1 M. Se toman 25 mL de esta disolución y se le burbujea N₂ por 10 minutos antes de empezar con la valoración. La valoración se hace por triplicado.

Preparación y normalización del HNO₃ 0.1 N

La preparación del HNO₃ se realiza a partir de ácido nítrico concentrado (62.5 %, ~ 14.5 M), tomando 7 mL de HNO₃ y aforando a 1 L con agua destilada.

Para la normalización del HNO₃ se toman 20 mL de la disolución y se aforan a 100 mL con una disolución de KNO₃ 0.1 M. Se toman 25 mL de esta disolución y se burbujan con N₂ por 10 minutos antes de empezar la titulación, manteniendo en agitación constante. La disolución es titulada con la de NaOH previamente normalizada.

Determinación del % de CO₃²⁻ en el NaOH

La determinación del porcentaje de carbonatos se realiza con los datos de la titulación de HNO₃ con NaOH usando el método de Gran.

El método de Gran¹³⁵ ha probado ser excelente para la determinación de los puntos de equivalencia. De acuerdo a este método, en una titulación ideal los puntos anteriores al punto de equivalencia deben dar una recta al aplicárseles la función $\phi = (V_{\text{inc}} + v) * 10^{-\text{pH}}$, así como los puntos posteriores al punto de equivalencia al aplicarse la función $\phi = (V_{\text{inc}} + v) * 10^{\text{pH}}$. Las rectas se intersectarán en $\phi = 0$ en el volumen de equivalencia. Sin embargo, si hay carbonato contaminando la disolución de hidróxido de sodio, los puntos posteriores a la equivalencia presentarán una curvatura para finalmente seguir un comportamiento lineal.

Para determinar el % de CO₃²⁻ se aplican las funciones anteriormente descritas a los datos de la titulación del HNO₃ con NaOH obteniendo dos rectas (Figura 6.1). De las regresiones lineales de éstas se obtienen ecuaciones del tipo $y = b + mx$. Entonces, cuando y_1 y y_2 se igualan a cero se obtienen los valores de x_1 y x_2 , los cuales alimentan la siguiente ecuación para determinar el % de CO₃²⁻.

$$\%CO_3^{2-} = \frac{x_2 - x_1}{2x_2}$$

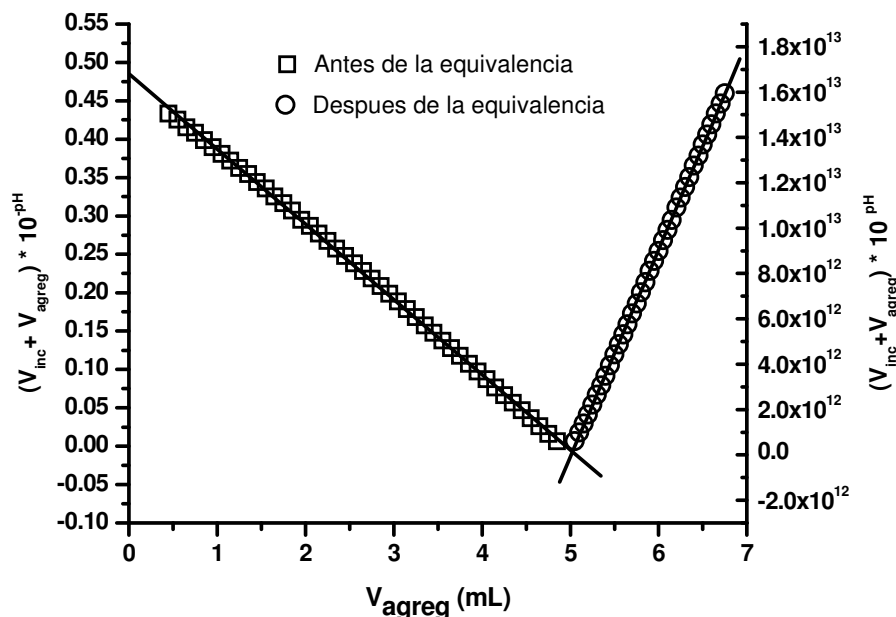


Figura 6.1. Ejemplo de las rectas obtenidas al aplicar la función de Gran a las curvas de titulación potenciométrica de HCl con NaOH. La curva \square representa los valores antes del punto de equivalencia a los que se les aplicó la función $\varnothing = (V_{inc} + v) * 10^{pH}$ mientras que la curva \circ representa los valores después del punto de equivalencia a los que se les aplicó la función $\varnothing = (V_{inc} + v) * 10^{pH}$.

El porcentaje de carbonatos calculado para las disoluciones de hidróxido de sodio que se utilizaron en las titulaciones presentadas en esta tesis fue menor al 0.5 %.

Determinación de las constantes de acidez (pK_a s)

Para determinar las constantes de acidez de los ligantes $H_6Alabiim$ y $H_6Valbiim$ se titularon disoluciones 1 mM de éstos con la disolución de NaOH normalizada y libre de carbonatos. Para ello se pesaron 66.5 mg (0.1 mmol) de $H_6Alabiim \cdot 7H_2O$ ó 81.3 mg (0.1 mmol) de $H_6Valbiim \cdot 9H_2O$ y se disolvieron cada uno con 7 mL de HNO_3 0.1 N (0.7 mmol) en 100 mL de KNO_3 0.1 M.

De las disoluciones anteriores, se tomaron 25 mL y se colocaron en la celda del titulador y se burbujearon por diez minutos con nitrógeno bajo agitación constante antes de iniciar la titulación. Ambos ligantes fueron titulados por triplicado. Los datos obtenidos de cada titulación se ajustaron con el programa Hyperquad 2003 para obtener los valores de los pK_a s correspondientes. Los diagramas de predominio de especies se obtuvieron en el programa MEDUSA.¹³⁶

Determinación de las constantes de formación ($\log\beta$)

Para determinar las constantes de formación ($\log\beta$) de los compuestos tetranucleares con los ligantes $H_6Alabiim$ y $H_6Valbiim$ se titularon disoluciones 1 mM de los complejos formados *in situ*, esto es 1 mM de ligante y 4 mM de Cu(II). Para ello se pesaron 66.5 mg (0.1 mmol) de $H_6Alabiim \cdot 7H_2O$ ó 81.3 mg (0.1 mmol) de $H_6Valbiim \cdot 9H_2O$ y se disolvieron con 7 mL de HNO_3 0.1N (0.7 mmol) y 2.1 mL de un estándar de $Cu(NO_3)_2$ 0.1906 M (0.4 mmol). Estas disoluciones se aforaron a 100 mL con KNO_3 0.1 M.

De las disoluciones anteriores, se tomaron 25 mL y se colocaron en la celda del titulador y se burbujearon por diez minutos con nitrógeno bajo agitación constante antes de iniciar la titulación. Ambos complejos fueron titulados por triplicado. Los datos obtenidos de cada titulación se ajustaron con el programa Hyperquad 2003 para obtener los valores de $\log\beta$ correspondientes. Los diagramas de predominio de especies se obtuvieron en el programa MEDUSA.¹³⁶

Adicionalmente se titularon disoluciones de ácido nítrico con una concentración 7 y 11 mM, para lo cual se adicionaron 3.5 y 5.5 mL de HNO_3 0.1 N en matraces volumétricos de 50 mL y se aforaron con KNO_3 0.1 M. En la titulación de estas muestras se siguió el procedimiento anteriormente descrito. Estas titulaciones sólo se usaron con fines de comparación.

Asignación de los pK_as

La asignación de los valores de pK_a obtenidos se realizó por medio de una titulación de los ligantes seguida por RMN ¹H. 20mg de cada ligante fueron disueltos en 1 mL de D₂O agregando NaOD hasta alcanzar un pD ≈ 13. Posteriormente la muestra fue acidificada por adiciones de DCl hasta alcanzar un pD ≈ 7.5. Los espectros de RMN ¹H se adquirieron a 25 °C en un equipo VARIAN Unity Inova de 200 MHz en la Universidad de Guanajuato.

6.6. Estudios de EPR

Los estudios de EPR en función de la acidez del medio se realizaron en un espectrofotómetro JEOL RE2X operando en frecuencias de banda-X a 77 K, usando DPPH (g = 2.0036) como estándar de la Universidad de Leiden, Holanda.

Por razones de solubilidad de los compuestos, se usó sólo el ligante H₆Valbiim. Para asegurar la misma concentración de los compuestos de Cu(II) a lo largo de todo el experimento, se preparó una disolución patrón de la especie formada *in situ* con una concentración 5 mM, disolviendo 69.0 mg (0.2 mmol) de Cu(BF₄)₂ • 6H₂O con 40.7 mg (50 μmol) de H₆Valbiim • 9H₂O en 10 mL de MeOH. Adicionalmente se prepararon disoluciones de Cu₂Alameim y de Cu(BF₄)₂ de concentración 10 mM y 20 mM, respectivamente, esto con la finalidad de tener la misma cantidad de núcleos activos en todas las disoluciones. Para ello, se disolvieron 38.5 mg (0.1 mmol) de H₃Alameim • HClO₄ y/o 69.0 mg (0.2 mmol) de Cu(BF₄)₂ • 6H₂O en 10 mL de MeOH. También se preparó una disolución de Bu₄NOH 62.5 mM, diluyendo 312.5 μL de una disolución 1 M de Bu₄NOH en 5 mL de MeOH.

Con estas disoluciones se prepararon nuevas disoluciones de los complejos con distintas cantidades de base agregada, desde 0 hasta 7.0 equivalentes. La preparación de las muestras se realizó mezclando 500 μL de las disoluciones de los compuestos de Cu(II) con

distintos volúmenes de Bu₄NOH y completando a un volumen final de 1 mL con MeOH, de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 6.2. *Volúmenes usados de las disoluciones patrón en la preparación de las distintas disoluciones empleadas en al titulación espectrofotométrica.*

Número de Equivalentes de base	Alicuota del Compuesto de Cu(II) (μL)	Alicuota de Bu ₄ NOH [62.5 mM] (μL)	MeOH (μL)
0.0	500	0	500
0.5	500	20	480
1.0	500	40	460
1.5	500	60	440
2.0	500	80	420
2.5	500	100	400
3.0	500	120	380
3.5	500	140	360
4.0	500	160	340
4.5	500	180	320
5.0	500	200	300
5.5	500	220	280
6.0	500	240	260
6.5	500	260	240
7.0	500	280	220

Cabe mencionar que la disolución de Cu(BF₄)₂ sin alguno de los ligantes precipita al agregar 3.5 equivalentes de base y que con el ligante H₃Alameim precipita al agregar 6.5 equivalentes.

6.7. Actividad catalítica

Los estudios de actividad catalítica se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett Packard Agilent 8452-A de arreglo de diodos operando en el intervalo de 190 a 1100 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico a 25 °C. Los espectros fueron adquiridos durante 60 s y se usaron para el análisis los datos de 10 a 60 s. Adicionalmente, se utilizó

un equipo “Stopped-flow” operando a 400 nm y adquiriendo datos durante 20 s y usando para el análisis los datos a partir de 10 s.

La evaluación catalítica se realizó midiendo el incremento en la señal la 3,5-di-*tert*-butil-*o*-benzoquinona (producto de oxidación del 3,5-di-*tert*-butilcatecol) con respecto al tiempo. Los absorbancia molar de la DTBQ se determinó con una curva patrón en las mezclas de disolventes usadas, obteniendo un ϵ_0 de $1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeCN/H₂O; 1:1 y $1650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeOH/H₂O; 1:1 a 400 nm.

El blanco para cada uno de los estudios estaba constituido por la mezcla de disolventes con el amortiguador al pH con el cual se estuviera trabajando.

Los valores de pH mantuvieron constantes utilizando alguno de los siguientes amortiguadores con una concentración 0.1 M en celda:

- **MES** Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico,
($pK_a = 6.15$, PM = 206.7 g/mol)

- **HEPES** Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'(2-etanosulfónico)
($pK_a = 7.55$, PM = 238.3 g/mol)

- **TRIS** Tris(hidroximetil)aminometano
($pK_a = 8.30$, PM = 121.2 g/mol)

Los valores de pH de las disoluciones amortiguadoras se ajustaron con HNO₃ ó NaOH.

Dependencia de la velocidad en la concentración del catalizador

El efecto de la concentración del catalizador sobre la velocidad de la reacción se determinó para cada uno de los complejos de interés manteniendo la concentración del sustrato constante (20 mM) a pH = 7.5. Este experimento se realizó con los ligantes $H_6Alabiim$, $H_6Valbiim$, $H_6Metbiim$ y $H_6Fenbiim$ en mezcla MeCN/H₂O; 1:1 a 25 °C.

Para este experimento se prepararon las siguientes disoluciones: una disolución amortiguadora de HEPES 0.3M en H₂O a pH = 7.5, una disolución de H₂DTBC 60 mM en MeCN y disoluciones de los complejos formados *in situ* Cu₄L de concentraciones 150, 300, 450, 600, 750 y 900 μM en MeCN/H₂O. Para iniciar las lecturas se mezclaron primero, 1 mL del amortiguador acuoso con 1 mL de la disolución del complejo correspondiente disuelto en la mezcla CH₃CN/H₂O y se les agregó 1 mL de H₂DTBC disuelto en CH₃CN justo antes de iniciar cada experimento. La concentración final (en la celda) de cada uno de los reactivos es de una tercera parte de la concentración inicial. Cada una de las mediciones se realizó por quintuplicado. Los resultados presentados son el promedio de las cinco lecturas.

Dependencia de la velocidad en el pH

El efecto del pH sobre la velocidad de la reacción se determinó para los complejos con los ligantes $H_6Valbiim$ y $H_6Metbiim$ con una concentración constante en celda de 150 μM y manteniendo también la concentración del sustrato constante en 20 mM. Este experimento se realizó en mezcla MeCN/H₂O; 1:1 a 25 °C.

Para este experimento se prepararon las siguientes disoluciones: una disolución de los complejos formados *in situ* Cu₄L 450 μM en MeCN/H₂O, una disolución de H₂DTBC 60 mM en MeCN y disoluciones acuosas de los amortiguadores 0.3 M ajustadas al pH deseado: MES a pH 5.5, 6.0 y 6.5; HEPES a pH 7.0, 7.5 y 8.0; TRIS a pH 8.5, 9.0 y 9.5.

Las disoluciones se mezclaron agrando 1 mL del amortiguador acuoso con 1 mL de la disolución del complejo correspondiente disuelto en la mezcla CH₃CN/H₂O y se les agregó justo antes de iniciar cada experimento 1 mL de H₂DTBC disuelto en CH₃CN. La concentración final de cada uno de los reactivos es de una tercera parte de la concentración inicial. Cada una de las mediciones se realizó por quintuplicado. Los resultados presentados son el promedio de las cinco lecturas.

Dependencia de la velocidad en la concentración del sustrato

La dependencia de la velocidad de la reacción en la concentración del sustrato se determinó en dos mezclas de disolventes distintas: MeCN/H₂O; 1:1 y MeOH/H₂O; 1:1.

Los estudios en mezcla MeCN/H₂O; 1:1 se realizaron para los complejos con los ligantes H₆*Valbiim* y H₆*Metbiim* con una concentración constante en celda de 150 μM, en el intervalo de concentraciones de H₂DTBC de 6 a 20 mM a pH 7.5 y 8.5 en un espectrofotómetro Hewlett Packard Agilent 8452-A a 25 °C.

Para este experimento se prepararon las siguientes disoluciones: Disoluciones amortiguadoras de HEPES 0.3 M en H₂O a pH = 7.5 y TRIS 0.3 M en H₂O a pH = 8.5, disoluciones de los complejos formados *in situ* Cu₄L de concentración 150 μM en MeCN/H₂O y disoluciones de H₂DTBC de concentraciones 18, 21, 24, 27, 33, 42, 60 mM en MeCN. Para iniciar las lecturas se mezclaron primero, 1 mL del amortiguador acuoso con 1 mL de la disolución del complejo correspondiente disuelto en la mezcla CH₃CN/H₂O y se les agregó 1 mL de H₂DTBC disuelto en CH₃CN justo antes de iniciar cada experimento. La concentración en la celda de cada uno de los reactivos es de una tercera parte de la concentración inicial. Cada una de las mediciones se realizó por quintuplicado. Los resultados presentados son el promedio de las cinco lecturas.

Los estudios en mezcla MeOH/H₂O; 1:1 se realizaron para el complejo [Cu₄(*Valbiim*)] con una concentración constante en celda de 12.5 μM, variando la

concentración del H₂DTBC desde 0.16 mM hasta 8 mM en el intervalo de pH de 6.5 a 8.5 en un equipo “Stopped-flow” a 25 °C.

Para este experimento se prepararon disoluciones de [Cu₄(Valbim)] 25 μM con HEPES 0.2 M en MeOH/H₂O; 1:1 a pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5. Para ello se partió de disoluciones patrón de [Cu₄(Valbim)] 250 μM (1 mL) y HEPES 0.5 M (4 mL) ajustado al pH deseado en H₂O y posteriormente se aforó (10 mL) con MeOH para obtener una mezcla 1:1.

Para las disoluciones de H₂DTBC se partió de una disolución stock 16 mM en MeOH/H₂O; 1:1. Se tomaron distintas alícuotas de esta disolución y se aforaron a un volumen de 5 mL con mezcla MeOH/H₂O; 1:1 de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 6.3. *Volúmenes usados de la disolución patrón de H₂DTBC en la preparación de las distintas disoluciones usadas en los estudios cinéticos.*

Alícuota de H ₂ DTBC [16 mM] (μL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de la dilución (mM)	Concentración en celda (mM)
0	5.00	0.00	0.00
100	5.00	0.32	0.16
200	5.00	0.64	0.32
300	5.00	0.96	0.48
400	5.00	1.28	0.64
500	5.00	1.60	0.80
750	5.00	2.40	1.20
1000	5.00	3.20	1.60
2000	5.00	6.40	3.20
3000	5.00	9.60	4.80
5000	5.00	16.00	8.00

La concentración en la celda de cada uno de los reactivos es mitad de la concentración inicial. Cada una de las mediciones se realizó diez veces. Los resultados presentados son el promedio de las diez lecturas.

7. Referencias

1. K. D. Karlin, Y. Gultneh, T. Nicholson and J. Zubieta, *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 3725-3727.
2. C. H. Kao, H. H. Wei, Y. H. Liu, G. H. Lee, Y. Wang and C. J. Lee, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **84**, 171-178.
3. S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, E. Saint-Aman, J. M. Latour, L. Le Pape and D. Luneau, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 3526-3536.
4. I. A. Koval, M. Huisman, A. F. Stassen, P. Gamez, O. Roubeau, C. Belle, J. L. Pierre, E. Saint-Aman, M. Luken, B. Krebs, M. Lutz, A. L. Spek and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004, 4036-4045.
5. C. Belle, C. Beguin, I. Gautier-Luneau, S. Hamman, C. Philouze, J. L. Pierre, F. Thomas and S. Torelli, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 479-491.
6. I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeczi and J. Reedijk, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 814-840.
7. J. A. Guckert, M. D. Lowery and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 2817-2844.
8. H. B. Gray, B. G. Malmstrom and R. J. P. Williams, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 551-559.
9. P. M. Colman, H. C. Freeman, J. M. Guss, M. Murata, V. A. Norris, J. A. M. Ramshaw and M. P. Venkatappa, *Nature*, 1978, **272**, 319-324.
10. E. I. Solomon, U. M. Sundaram and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2563-2605.
11. E. I. Solomon, M. J. Baldwin and M. D. Lowery, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 521-542.
12. M. J. Ettinger, *Biochemistry*, 1974, **13**, 1242-1247.
13. N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav and P. F. Knowles, *Nature*, 1991, **350**, 87-90.

14. A. Volbeda and W. G. J. Hol, *J. Mol. Biol.*, 1989, **209**, 249-279.
15. T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini and B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, **5**, 1084-1090.
16. T. Bertrand, C. Jolivald, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak and C. Mougin, *Biochemistry*, 2002, **41**, 7325-7333.
17. H. Claus, *Micron*, 2004, **35**, 93-96.
18. K. Piontek, M. Antorini and T. Choinowski, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 37663-37669.
19. A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Gatti, A. Marchesini, R. Petruzzelli and A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.*, 1989, **206**, 513-529.
20. G. Musci, *Prot. Pept. Lett.*, 2001, **8**, 159-169.
21. R. L. Lieberman and A. C. Rosenzweig, *Nature*, 2005, **434**, 177-182.
22. S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel, *Nature*, 1995, **376**, 660-669.
23. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawaitoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, *Science*, 1995, **269**, 1069-1074.
24. M. Wilmanns, P. Lappalainen, M. Kelly, E. Sauer-Eriksson and M. Saraste, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 11955-11959.
25. M. Prudencio, A. S. Pereira, P. Tavares, S. Besson, I. Cabrito, K. Brown, B. Samyn, B. Devreese, J. Van Beeumen, F. Rusnak, G. Fauque, J. J. G. Moura, M. Tegoni, C. Cambillau and I. Moura, *Biochemistry*, 2000, **39**, 3899-3907.
26. B. Kadenbach, *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.*, 1996, **34**, 2635-2637.
27. K. Brown, K. Djinovic-Carugo, T. Haltia, I. Cabrito, M. Saraste, J. J. G. Moura, I. Moura, M. Tegoni and C. Cambillau, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 41133-41136.
28. T. Haltia, K. Brown, M. Tegoni, C. Cambillau, M. Saraste, K. Mattila and K. Djinovic-Carugo, *Biochem. J.*, 2003, **369**, 77-88.
29. B. J. Deverall, *Nature*, 1961, **189**, 311.
30. A. M. Mayer and E. Harel, *Phytochem.*, 1979, **18**, 193-215.
31. C. Gerdemann, C. Eicken and B. Krebs, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 183-191.
32. C. Eicken, F. Zippel, K. Buldt-Karentzopoulos and B. Krebs, *FEBS Lett.*, 1998, **436**, 293-299.

33. A. Rompel, H. Fischer, K. Buldt-Karentzopoulos, D. Meiwes, F. Zippel, H. F. Nolting, C. Hermes, B. Krebs and H. Witzel, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **59**, 715.
34. D. E. Wilcox, A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 4015-4027.
35. C. Eicken, B. Krebs and J. C. Sacchettini, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, **9**, 677-683.
36. P. E. M. Siegbahn, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, **9**, 577-590.
37. P. E. M. Siegbahn, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 567-576.
38. S. Y. Lee and J. D. Lipscomb, *Biochemistry*, 1999, **38**, 4423-4432.
39. A. M. Orville, J. D. Lipscomb and D. H. Ohlendorf, *Biochemistry*, 1997, **36**, 10052-10066.
40. R. R. Grinstead, *Biochemistry*, 1964, **3**, 1308-1314.
41. J. Tsuji and H. Takayanagi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 7349-7350.
42. M. M. Rogic, T. R. Demmin and W. B. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 7441-7443.
43. S. Thuruya and R. L. Lintvedt, 176th National Meeting of the American Chemical Society, Miami, 1978.
44. T. R. Demmin, M. D. Swerdloff and M. M. Rogic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5795-5804.
45. N. Oishi, Y. Nishida, K. Ida and S. Kida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, **53**, 2847-2850.
46. M. R. Malachowski and M. G. Davidson, *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **162**, 199-204.
47. U. Casellato, S. Tamburini, P. A. Vigato, A. De Stefani, M. Vidali and D. E. Fenton, *Inorg. Chim. Acta*, 1983, **69**, 45-51.
48. J. S. Thompson and J. C. Calabrese, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 1903-1907.
49. J. Kaizer, J. Pap, G. Speier, L. Parkanyi, L. Korecz and A. Rockenbauer, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 190-198.
50. M. Kodera, T. Kawata, K. Kano, Y. Tachi, S. Itoh and S. Kojo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2003, **76**, 1957-1964.
51. G. Speier, *New J. Chem.*, 1994, **18**, 143-147.
52. J. Balla, T. Kiss and R. F. Jameson, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 58-62.

53. J. P. Chyn and F. L. Urbach, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **189**, 157-163.
54. A. E. Martell, R. J. Motekaitis, R. Menif, D. A. Rockcliffe and A. Llobet, *J. Mol. Catal. A*, 1997, **117**, 205-213.
55. D. A. Rockcliffe and A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3143-3152.
56. D. A. Rockcliffe and A. E. Martell, *J. Mol. Catal. A*, 1995, **99**, 87-99.
57. D. A. Rockcliffe and A. E. Martell, *J. Mol. Catal. A*, 1995, **99**, 101-114.
58. D. A. Rockcliffe and A. E. Martell, *J. Mol. Catal. A*, 1996, **106**, 211-221.
59. D. A. Rockcliffe and A. E. Martell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 1758-1760.
60. D. A. Rockcliffe, A. E. Martell and J. H. Reibenspies, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 167-175.
61. A. Granata, E. Monzani and L. Casella, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, **9**, 903-913.
62. E. Monzani, G. Battaini, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Santagostini, G. Nardin, L. Randaccio, S. Geremia, P. Zanello and G. Opromolla, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 5359-5369.
63. E. Monzani, L. Casella, G. Zoppellaro, M. Gullotti, R. Pagliarin, R. P. Bonomo, G. Tabbi, C. Nardin and L. Randaccio, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **282**, 180-192.
64. E. Monzani, L. Quinti, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, P. Faleschini and G. Tabbi, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 553-562.
65. G. Battaini, E. Monzani, L. Casella, L. Santagostini and R. Pagliarin, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 262-268.
66. K. Selmeczi, M. Reglier, M. Giorgi and G. Speier, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **245**, 191-201.
67. K. Selmeczi, M. Reglier, G. Speier and G. Peintler, *Reac. Kinet. Catal. Lett.*, 2004, **81**, 143-151.
68. J. Ackermann, F. Meyer, E. Kaifer and H. Pritzkow, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 247-258.
69. J. Mukherjee and R. Mukherjee, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **337**, 429-438.
70. C. Fernandes, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, A. S. Mangrich, E. Rentschler, B. Szpoganicz and E. Schwingel, *Inorg. Chim. Acta*, 2001, **320**, 12-21.

71. M. Merkel, N. Moller, M. Piacenza, S. Grimme, A. Rompel and B. Krebs, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 1201-1209.
72. A. Neves, L. M. Rossi, A. J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, C. Wiezbicki and E. Schwingel, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 1788-1794.
73. J. Reim and B. Krebs, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 3793-3804.
74. R. Wegner, M. Gottschaldt, H. Gorls, E. G. Jager and D. Klemm, *Chem. Eur. J.*, 2001, **7**, 2143-2157.
75. H. Borzel, P. Comba and H. Pritzkow, *Chem. Commun.*, 2001, 97-98.
76. C. Benelli, A. Dei, D. Gatteschi and L. Pardi, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 3409-3415.
77. M. Gupta, P. Mathur and R. J. Butcher, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 878-885.
78. T. Plenge, R. Dillinger, L. Santagostini, L. Casella and F. Tuczek, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2003, **629**, 2258-2265.
79. G. Speier, S. Tisza, Z. Tyeklar, C. W. Lange and C. G. Pierpont, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 2041-2045.
80. R. Than, A. A. Feldmann and B. Krebs, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **182**, 211-241.
81. S. Torelli, C. Belle, S. Hamman, J. L. Pierre and E. Saint-Aman, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 3983-3989.
82. F. Zippel, F. Ahlers, R. Werner, W. Haase, H. F. Nolting and B. Krebs, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3409-3419.
83. A. M. Sosa, V. M. Ugalde-Saldivar, I. Gonzalez and L. Gasque, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, **579**, 103-111.
84. J. Gao, J. H. Reibenspies and A. E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 2003, **346**, 67-75.
85. M. Thirumavalavan, P. Akilan, M. Kandaswamy, K. Chinnakali, G. S. Kumar and H. K. Fun, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 3308-3317.
86. A. Rompel, H. Fischer, D. Meiwes, K. Buldt-Karentzopoulos, R. Dillinger, F. Tuczek, H. Witzel and B. Krebs, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, **4**, 56-63.
87. W. L. Driessen, D. Rehorst, J. Reedijk, P. Mutikainen and U. Turpeinen, *Inorg. Chim. Acta*, 2005, **358**, 2167-2173.
88. L. Gasque, E. Mijangos and L. Ortiz-Frade, *Acta Crystallogr. Sect. E.-Struct Rep. Online*, 2005, **61**, M673-M676.

89. L. Gasque, J. Olguin and S. Bernes, *Acta Crystallogr. Sect. E.-Struct Rep. Online*, 2005, **61**, M274-M276.
90. L. Gonzalez, Tesis de licenciatura, UNAM, 2005.
91. I. A. Membrillo, Tesis de licenciatura, UNAM, 2006.
92. G. Mendoza-Diaz, W. L. Driessen, J. Reedijk, S. Gorter, L. Gasque and K. R. Thompson, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **339**, 51-59.
93. J. Olguin, Tesis de licenciatura, UNAM, 2003.
94. L. Gasque, E. Mijangos and S. Bernes, *Acta Crystallogr. Sect. E.-Struct Rep. Online*, 2005, **61**, O284-O286.
95. K. S. Luna, Tesis de licenciatura, UNAM, 2003.
96. E. Mijangos, Tesis de licenciatura, UNAM, 2001.
97. F. B. Stocker, J. L. Kurtz, B. L. Gilman and D. A. Forsyth, *J. Org. Chem.*, 1970, **35**, 883.
98. A. M. Sosa, Tesis de doctorado, UNAM, 2006.
99. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th edn., John Wiley & Sons, Canada, 1986.
100. P. Tarte, *Spectrochim. Acta*, 1958, **13**, 107-119.
101. I. A. Koval, K. van der Schilden, A. M. Schuitema, P. Gamez, C. Belle, J. L. Pierre, M. Luken, B. Krebs, O. Roubeau and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 4372-4382.
102. G. Tabbi, W. L. Driessen, J. Reedijk, R. P. Bonomo, N. Veldman and A. L. Spek, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1168-1175.
103. W. Mazurek, K. J. Berry, K. S. Murray, M. J. Oconnor, M. R. Snow and A. G. Wedd, *Inorg. Chem.*, 1982, **21**, 3071-3080.
104. M. Kato, T. Tanase and M. Mikuriya, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2925-2941.
105. R. E. Marsh, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, 1999, **55**, 931-936.
106. B. L. Feringa, R. A. van Delden, N. Koumura and E. M. Geertsema, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 1789-1816.
107. M. S. Haddad, E. N. Duesler and D. N. Hendrickson, *Inorg. Chem.*, 1979, **18**, 141-148.
108. O. Kahn, *Molecular Magnetism*, Wiley-VCH, New York, 1993.

109. L. Lecren, O. Roubeau, C. Coulon, Y. G. Li, X. F. Le Goff, W. Wernsdorfer, H. Miyasaka and R. Clerac, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 17353-17363.
110. P. Gans, Sabatini, A., Vacca, A., 2003.
111. P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739-1753.
112. A. E. Martell and R. M. Smith, *Critical stability constants*, Plenum press, N.Y., 1977.
113. D. T. Burns and B. D. Flockhart, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 1990, **333**, 37-48.
114. A. Dogan and E. Kilic, *Anal. Biochem.*, 2007, **365**, 7-13.
115. A. Dogan and E. Kilic, *Indian J. Chem. Sect A-Inorg. Bio-Inorg. Phys. Theor. Anal. Chem.*, 2003, **42**, 1632-1635.
116. A. Dogan and E. Kilic, *Turk. J. Chem.*, 2005, **29**, 41-47.
117. A. Dogan, F. Koseoglu and E. Kilic, *Anal. Biochem.*, 2001, **295**, 237-239.
118. C. T. Yang, M. Vetrichelvan, X. D. Yang, B. Moubaraki, K. S. Murray and J. J. Vittal, *Dalton Trans.*, 2004, 113-121.
119. B. Sreenivasulu, F. Zhao, S. Gao and J. J. Vittal, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 2656-2670.
120. X. B. Wang, J. Ding and J. J. Vittal, *Inorg. Chim. Acta*, 2006, **359**, 3481-3490.
121. J. Anekwe, A. Hammerschmidt, A. Rompel and B. Krebs, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2006, **632**, 1057-1066.
122. I. A. Koval, M. Huisman, A. F. Stassen, P. Gamez, M. Lutz, A. L. Spek and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004, 591-600.
123. M. Thirumavalavan, P. Akilan, P. Amudha and M. Kandaswamy, *Polyhedron*, 2004, **23**, 519-527.
124. I. H. Segel, *Biochemical calculations*, 2nd edn., J. Wiley, N.Y., 1976.
125. N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa and R. M. M. Singh, *Biochemistry*, 1966, **5**, 467-477.
126. J. A. Dean, *Lange manual de quimica*, 13a edn., McGraw-Hill, Mexico, 1989.
127. L. Gonzalez, Tesis de maestría, UNAM, 2008.
128. S. C. Cheng and H. H. Wei, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **340**, 105-113.
129. E. Mijangos, J. Reedijk and L. Gasque, *Dalton Trans.*, in press, DOI: 10.1039/b714283h.

130. R. J. Cernik, W. Clegg, C. R. A. Catlow, G. BushnellWye, J. V. Flaherty, G. N. Greaves, I. Burrows, D. J. Tayloe, S. J. Teat and M. Hamichi, *J. Synchronot. Radiat.*, 1997, **4**, 279-286.
131. S. SAINT, a. SiemensAnalytical X-ray Instruments Inc., Madison, Wisconsin.
132. G. M. Sheldrick, *SHELXS-97 Program for Crystal Structure Determination*, (1997) University of Göttingen, Germany.
133. G. M. Sheldrick, *SHELXL-97-2 Program for Crystal Structure Refinement*, (1997) University of Göttingen, Germany.
134. E. E. Bernarducci, P. K. Bharadwaj, R. A. Lalancette, K. Kroghjerspersen, J. A. Potenza and H. J. Schugar, *Inorg. Chem.*, 1983, **22**, 3911-3920.
135. F. J. C. Rossotti and H. Rossotti, *J. Chem. Ed.*, 1965, **42**, 375.
136. I. Puigdomenech, <http://www.kemi.kth.se/medusa/>, 1998.