



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio de un complejo dinuclear de cobre (II)
con un ligante derivado de 2-metilimidazol y
propanolamina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA

CARMEN LEAL CERVANTES



MÉXICO, D.F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

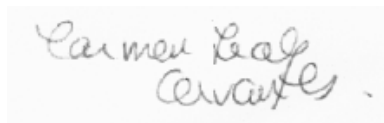
JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Noráh Yolanda Barba Behrens
Vocal: Prof. Rafael Moreno Esparza
Secretario: Prof. Laura María Gasque Silva
Primer suplente: Prof. Claudia Paola Gómez Tagle Chávez
Segundo suplente: Prof. María Elena Bravo Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema:
Lab. 216, Departamento de Química Inorgánica,
División de Estudios de Posgrado, Edificio B
Facultad de Química, U.N.A.M.



Dra. Laura María Gasque Silva
Asesora



Carmen Leal Cervantes
Sustentante

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a mi familia. A mis padres por todo el amor y el apoyo incondicional que me han brindado todos estos años. No lo hubiera logrado sin ustedes. A Ana, porque siempre, y aun a distancia, has encontrado la manera y el tiempo de estar ahí para mí. A Rodri, gracias por tu apoyo y paciencia. A la familia extendida por estar ahí y compartir esta etapa conmigo.

Agradezco especialmente a mi tutora la Dra. Laura Gasque Silva por toda la paciencia y sus enseñanzas. Gracias por todo el apoyo recibido.

A mis compañeros del laboratorio Inés, Rosita y Memo. Muchas gracias por sus enseñanzas y su ayuda, pero sobre todo, por su amistad. Esta etapa de mi vida no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Agradezco a mis amigos Diego, Marisol, Midori, Majo, Elizabeth, Víctor, Gustavo por los buenos momentos que pasamos juntos y por el apoyo durante la carrera. ¡Gracias!

Gracias a los miembros del jurado y al Dr. Víctor Ugalde por sus sugerencias y comentarios para este trabajo.

Agradezco al subprograma 127 de la Facultad de Química por el apoyo económico recibido para la elaboración de esta tesis.

Este trabajo no estaría completo sin la colaboración del personal de la USAI. Gracias a Marisela (IR), Víctor y Nayeli (AE), Nuria y Rosa Isela (RMN), Marcos (Rayos X), Alejandro (RPE).

Índice

Índice	i
Lista de abreviaturas	iii
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	
1. El cobre en los sistemas biológicos	3
2. Los sistemas modelo en la química bioinorgánica	6
3. La catecol oxidasa	7
3.1. La actividad catecolasa	9
4. El trabajo en nuestro grupo de investigación	10
5. Modelos sintéticos de la catecol oxidasa	12
5.1. Estudios previos con modelos biomiméticos	12
5.2. Evaluación de la actividad catecolasa en nuestro grupo	14
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis	16
Capítulo 3. Material y métodos	
1. Reactivos y disolventes utilizados	17
2. Síntesis	18
2.1. Síntesis del ligante dihp	18
2.2. Síntesis de complejos dinucleares con Cu(II)	19
a. $[\text{Cu}_2\text{dihp}](\text{ClO}_4)_4$	20
b. $[\text{Cu}_2\text{dihp}]\text{Cl}_4$	20
c. $[\text{Cu}_2\text{dihp}](\text{BF}_4)_4$	20
3. Caracterización de los compuestos obtenidos	21
3.1. Difracción de rayos X	21
3.2. Susceptibilidad magnética y momento magnético	22
3.3. Determinación de los espectros de UV-vis y de Resonancia Paramagnética Electrónica	22
4. Determinación potenciométrica de las constantes de acidez del ligante y de formación y de hidrólisis del complejo	23
4.1. Titulaciones en agua	23
4.2. Titulaciones en la mezcla metanol:agua (1:1)	24

5. Estudios cinéticos	25
5.1. Influencia del pH	28
5.2. Variación de la concentración de $[\text{Cu}_2\text{dihp}]^{4+}$	29
5.3. Variación de la concentración de DTBC	30
Capítulo 4. Resultados y discusión	
1. Síntesis y caracterización del ligante dihp	32
2. Síntesis y caracterización de los complejos dinucleares	35
3. Difracción de Rayos X	43
3.1. Estructura cristalina del ligante dihp	43
3.2. Estructura del complejo dinuclear $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$	44
4. Estudios en disolución: especiación del sistema	46
4.1. Determinación de las constantes de acidez del ligante	47
4.2. Determinación de las constantes de equilibrio del complejo de Cu(II)	51
5. Evaluación catalítica	54
5.1. Modelo de Michaelis-Menten	55
5.2. Efecto de la variación del pH en la actividad catecolasa	60
5.3. Variación de la concentración de catalizador	62
5.4. Variación de la concentración de sustrato	63
Capítulo 5. Conclusiones	68
Capítulo 6. Referencias	69

Lista de abreviaturas

His	Histidina
Cys	Cisteína
Met	Metionina
dihp	2,8-dimetil-5,11-di-(hidroxipropil)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5h]-imidazo[4,5c][1,6] diazecina
dihe	2,8-dimetil-5,11-di-(hidroxietil)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5h]-imidazo[4,5c][1,6] diazecina
dmpa	2,8-dimetil-5,11-di-(dimetilpropilendiamina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo- [4,5h]-imidazo[4,5c][1,6] diazecina
diep	2,8-dimetil-5,11-di-(2-etilpiridina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5h]-imidazo[4,5c][1,6] diazecina
MeOH	Metanol
L	Ligante
Cu ₂ L	Complejo dinuclear de Cu(II) con el ligante L
DTBC	3,5-di- <i>ter</i> -butilcatecol
DTBQ	3,5-di- <i>ter</i> -butilquinona
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
UV-vis	Ultravioleta-visible
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico]
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
ϵ	Coeficiente de absortividad molar
V ₀	Velocidad inicial
K _M	Constante de Michaelis-Menten
V _{max}	Velocidad máxima
k _{cat}	Constante catalítica

Introducción

En los seres vivos, las proteínas cumplen con una gran variedad de procesos: están involucradas en transporte de electrones y de metales; almacenamiento, transporte y activación de oxígeno; hidrólisis de enlaces, procesos de oxidoreducción y síntesis de compuestos bioquímicos. En particular, aquéllas que funcionan como catalizadores en las reacciones químicas necesarias para la vida se conocen como enzimas. Se trata de catalizadores muy selectivos, sumamente efectivos, con superficies proquirales, que funcionan en disoluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH [1, 2, 3]. Su actividad depende de la conformación de la proteína [3] y muchas veces, requieren de algún cofactor.

Es bien conocido el papel esencial para los seres vivos que juegan varios elementos metálicos como el hierro, el cobre, el cobalto, el manganeso y el zinc. Hoy se sabe que estos elementos cumplen funciones esenciales en todas las células al ser incorporados a las metaloproteínas y a las metaloenzimas: más del 50% de todas las enzimas conocidas necesitan un ion metálico para ser activas [2, 4, 5]. En las últimas décadas, el estudio de estos elementos, considerados tradicionalmente inorgánicos, en los sistemas biológicos se ha consolidado en una nueva disciplina: la química bioinorgánica [1, 4, 5].

El estudio de los centros metálicos de las metaloproteínas es sumamente interesante pues funcionan como portadores de electrones, como facilitadores en el transporte de oxígeno, como sitios en dónde ocurre la catálisis enzimática [1, 5] y usualmente, los intermediarios de reacción residen en el ion metálico de la enzima [4]. Sin embargo, existen muchas dificultades inherentes al estudio de las proteínas. Es por esto que es usual trabajar con compuestos modelo de bajo peso molecular que reproducen algunas de las características y propiedades de los centros activos [5, 6].

Una de las enzimas que presenta gran interés es la catecol oxidasa, presente en las plantas, que cataliza la oxidación de *o*-difenoles a las *o*-quinonas correspondientes [7]. Por ello, se ha producido un gran número de compuestos sintéticos análogos para estudiar su actividad como catalizadores en la reacción llevada a cabo por la enzima. Desde hace algunos años, los estudios de nuestro grupo de trabajo se han enfocado en encontrar una correlación entre la actividad catalítica y distintos factores estructurales de complejos dinucleares con ligantes derivados del imidazol.

En este trabajo se estudia el comportamiento de un compuesto de coordinación de Cu(II) con el ligante dihp, análogo a un sistema estudiado previamente [8], con un átomo adicional en la cadena lateral lo que le permite formar un anillo quelato de seis miembros en vez de cinco. Comparado con otros sistemas estudiados previamente [9], el ligante dihp también varía en cuanto a la naturaleza del átomo donador de la cadena lateral.

Los estudios realizados comprenden la caracterización del ligante y del complejo dinuclear en estado sólido y en disolución, así como la evaluación su actividad catalítica frente a la reacción de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol.

Capítulo 2. Antecedentes

1. El cobre en los sistemas biológicos

El cobre forma tan sólo 0.00007% de la corteza terrestre y un adulto contiene en promedio ~100 mg de él. Sin embargo, este elemento se encuentra entre los 25 elementos esenciales para la vida de la mayoría de los organismos aeróbicos, desde microbios hasta plantas y mamíferos, ya que funciona como cofactor catalítico y estructural en enzimas involucradas en una gran variedad de procesos bioquímicos celulares y de regulación. Al coordinarse el cobre en proteínas a través de diversos sitios (con diferentes tipos de átomos donadores: azufre, oxígeno y nitrógeno), les confiere a éstas cambios en su estructura, actividad catalítica y les permite interacciones proteína-proteína. De esta manera, el cobre puede controlar una gran diversidad de procesos biológicos y regulatorios [2, 10].

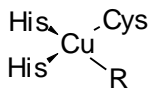
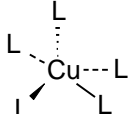
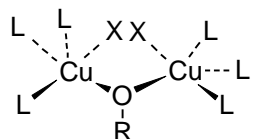
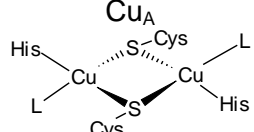
Los iones cobre tienen actividad redox, lo que quiere decir que pueden existir en dos estados de oxidación: como Cu^{1+} o Cu^{2+} . La química de coordinación de estos dos iones es muy distinta: el Cu(I) , un ácido blando de acuerdo a la clasificación de Pearson, prefiere ligantes con donadores por azufre, como la cisteína o la metionina, o insaturados como la *o*-fenantrolina o la 2,2'-bipiridina que tienen nubes electrónicas polarizables. Por su parte, el Cu(II) que es más duro, prefiere donadores por nitrógeno como la histidina o en menor medida, por oxígeno como el glutamato y el aspartato. Usualmente, las enzimas de cobre implicadas en catalizar reacciones redox poseen ambos tipos de ligantes de manera que los centros metálicos puedan existir en cualquiera de los dos estados de oxidación. Otra factor que favorece la presencia de Cu(I) es que el entorno orgánico que rodea a los centros metálicos excluye al agua, evitando la dismutación del Cu(I) a Cu^0 y Cu(II) , como ocurre en disolución acuosa [10, 11].

Además de esta preferencia por diferentes tipos de ligantes, los dos estados de oxidación del cobre tienden a adoptar diferentes geometrías: los iones de Cu(I) favorecen números de coordinación bajos y adoptan una geometría lineal (con dos átomos donadores), trigonal o piramidal (tres átomos donadores) o tetraédrica (con cuatro átomos donadores); los iones de Cu(II) prefieren complejos cuadrados, de pirámide cuadrada u octaédricos con distorsión tetragonal, debida al efecto de Jahn-Teller. En las enzimas, las geometrías del sitio alrededor de un ion de cobre son por lo general distorsionadas y cambiables [11].

En los sistemas biológicos, los iones metálicos pueden cumplir una función estructural o de catalizador. Los iones de cobre se encuentran en metaloenzimas que cumplen funciones de transporte de electrones, oxigenación y transporte de oxígeno. Estas funciones son llevadas a cabo en procesos de generación de energía, de adquisición de hierro, de metabolismo celular, de maduración de hormonas peptídicas, de coagulación de la sangre y de transducción de señales entre otros. La mayoría de los centros activos de cobre se encuentran en proteínas fuera de las células o en vesículas [10, 11], y sólo algunas metaloproteínas, en particular las de almacenamiento, y las llamadas chaperonas que contienen exclusivamente iones Cu(I) cumplen una función que no es redox [12].

Las metaloenzimas de cobre se clasifican en función de las características y las propiedades espectroscópicas de la forma oxidada de su centro activo. En la tabla 2.1 se muestra un breve resumen [11, 12, 13] de esta clasificación. En ella, se emplean las abreviaturas de tres letras de los aminoácidos: His es histidina; Cys, cisteína y Met, metionina. Algo notable es que, en casi todas las proteínas, el cobre se encuentra unido a por lo menos una histidina.

Tabla 2.1. Clasificación de los centros de cobre en biología. [11, 12, 13]

Tipo y esquema	Estructura	Características espectroscópicas	Función y ejemplos
<p>I</p> 	<p>Geometría trigonal, tetraédrica distorsionada o bipirámide trigonal El cuarto ligante puede ser un donador por N (His), por S (Met o Cys) o por O</p>	<p>- Absorción intensa entre 600 y 620 nm (TCLM Cys → Cu²⁺), les confiere el nombre de proteínas azules - En RPE: acoplamiento hiperfino entre electrón desapareado del Cu^{II} y el espín nuclear del Cu (con constantes de acoplamiento pequeñas)</p>	<p>Procesos de transferencia de electrones Ej: plastocianina, azurina</p>
<p>II</p> 	<p>Geometría cuadrada, piramidal, u octaédrica distorsionada Los diferentes ligantes tienen donadores por N o por O</p>	<p>- Absorción debida a transiciones d-d de los átomos de Cu(II) - Características de RPE son similares a complejos tetragonales de Cu(II) con donadores por O o N</p>	<p>Oxidaciones catalíticas Puede encontrarse combinados con centros tipo I o tipo III. Ej: Cu-Zn superóxido dismutasa, galactosa oxidasa</p>
<p>III</p> 	<p>Sitios dinucleares de Cu(II) L son ligantes donadores por N, R puede ser H, un grupo alquilo o aromático, X son otros ligantes o O₂^{x-}. Al coordinar al O₂, cada Cu^I proporciona un electrón para reducirlo a peroxo</p>	<p>- Fuerte acoplamiento antiferromagnético en el estado oxí, son silenciosas en RPE</p>	<p>Constituye el centro reductor de O₂ en muchas oxidasas, transporte de O₂ en la hemocianina. Ej: hemocianina, tirosinasa, catecol oxidasa</p>
<p>IV</p>	<p>Cúmulo trinuclear compuesto por un sitio tipo II y uno tipo III. En algunos casos, también hay un sitio tipo I</p>	<p>- Señal de RPE debida al centro tipo II</p>	<p>Oxidatas Ej: lacasa, ascorbato oxidasa, ceruloplasmina</p>
<p>Cu_A</p> 	<p>Sitio dinuclear de valencia mixta (oxidación formal + 1.5 para cada átomo), geometría tetraédrica, puentes tiolato</p>	<p>- Patrón de siete líneas en RPE</p>	<p>Transferencias electrónicas de largo alcance Ej: citocromo c oxidasa, óxido nitroso reductasa</p>
<p>Cu_B</p>	<p>Sitio de Cu con geometría de pirámide trigonal, coordinado por tres His, cuarta posición vacante Cercano a un centro de Fe</p>	<p>- Fuerte acoplamiento antiferromagnético Fe-Cu</p>	<p>El sitio Cu_B lleva a cabo la reducción de 4 electrones del O₂ a H₂O Citocromo c oxidasa</p>
<p>Cu_Z</p>	<p>Cuatro átomos de Cu en un tetraedro distorsionado, coordinados por siete His, un OH⁻, puente de S²⁻</p>	<p>- Espectro de cuatro líneas</p>	<p>Reducción de N₂O a N₂. Óxido nitroso reductasa</p>

2. Los sistemas modelo en la química bioinorgánica

Entre los mayores retos de la química bioinorgánica se encuentran los siguientes: caracterizar los sitios activos, estudiar la reactividad de las metaloenzimas [14], entender las bases moleculares de las interacciones entre los tejidos biológicos y los iones metálicos y aplicar este conocimiento en áreas tan diversas como la medicina, la biología, la catálisis etc [4]. Sin embargo, el alto peso molecular de las metaloproteínas y las dificultades asociadas a los procesos de purificación complican su estudio, así como la presencia de más de un centro metálico por enzima. Además, el comportamiento de los iones metálicos en las proteínas no puede separarse por completo de la química fundamental de ese metal [5, 6, 14].

Por todas estas razones, resulta muy útil el estudio de compuestos modelo de bajo peso molecular, análogos sintéticos de los sitios activos. El objetivo de estos compuestos es mimetizar tanto la estructura, como las propiedades y las funciones del sitio activo de la enzima y proporcionar un mayor entendimiento acerca de los sistemas biológicos por medio de información cinética, estructural y espectroscópica para compararla con el sistema biológico. Los análogos sintéticos permiten obtener información que es difícil de obtener de los estudios con las proteínas. Esto se debe a que es fácil hacer cambios sistemáticos a la geometría de coordinación, al tipo de ligantes, al ambiente local y a otros factores para estudiar el efecto de estas variaciones [1, 4, 5, 6]. Así, en los compuestos sintéticos, es muy fácil cambiar un grupo donador por N por uno donador por O. En la proteína, lograr este cambio de manera sistemática puede ser un reto, aún con las técnicas de mutagénesis dirigida que permiten cambiar un aminoácido en particular. Lo anterior sin contar que sólo es factible llevar a cabo un número limitado de modificaciones sin perturbar la estructura o la función de la proteína [5, 6, 14, 15].

El acercamiento por medio de modelos ha permitido valiosos avances en el entendimiento mecanístico y estructural, aun antes de que el sistema biológico

haya sido elucidado estructuralmente [6, 16]. Los modelos biomiméticos permiten asignar o verificar las cargas y los estados de oxidación de los metales, pueden reflejar el efecto del medio en los procesos llevados a cabo por la enzima (por ejemplo, el efecto en la rapidez de transferencia de electrones), especificar el papel de las contribuciones estéricas y electrónicas de los ligantes e identificar intermediarios posibles en los ciclos catalíticos llevados a cabo [5]. Un ejemplo de ello es la determinación del modo de enlace del oxígeno molecular en la hemocianina. Esta proteína de cobre con un centro tipo III es utilizada para transportar O_2 en los artrópodos. Los estudios llevados a cabo en complejos inorgánicos de Cu_2-O_2 mostraron un modo de enlace que ni siquiera había sido considerado y que resultó ser el modo de enlace en la proteína [6].

Actualmente, hay dos tendencias en cuanto a los compuestos sintetizados: compuestos biomiméticos, que tratan de imitar de la forma más fiel posible el entorno de coordinación y las estructuras que se encuentran en la naturaleza, y compuestos bioinspirados, con los cuales se busca alcanzar la función de la enzima bajo condiciones ambientales, sin importar los ligantes usados [16]. La obtención de estos compuestos tiene el potencial no sólo de proporcionar entendimiento acerca del funcionamiento de las enzimas, sino también de producir nuevos catalizadores que permitan efectuar transformaciones con aplicaciones prácticas, que son difíciles de llevar a cabo, en condiciones suaves de reacción. Algunos ejemplos son los de las oxidaciones selectivas llevadas a cabo con O_2 (en vez de los metales de transición utilizados normalmente como el Cr) en síntesis químicas, en particular en fármacos, o como sondas macromoleculares; la hidrólisis de péptidos proteínicos o de ácidos nucleicos para aplicaciones biotecnológicas; o la eliminación de contaminantes ambientales como los pesticidas con ésteres de fosfato u óxidos de nitrógeno (NO_x) [6, 15].

3. La catecol oxidasa

La catecol oxidasa o catecolasa es una enzima de cobre con un centro activo tipo III. Ha sido aislada de una gran variedad de plantas. Su función es catalizar la oxidación de una gran variedad de *o*-difenoles (catecoles) a las quinonas correspondientes, acoplada a la reducción del oxígeno molecular a agua. Las quinonas resultantes son muy reactivas y auto-polimerizan para formar melaninas, pigmentos polifenólicos cafés, en un proceso que, se piensa, protege el tejido dañado de las plantas de patógenos o insectos. La primera estructura cristalina (figura 2.1) se describió en 1998 [7].

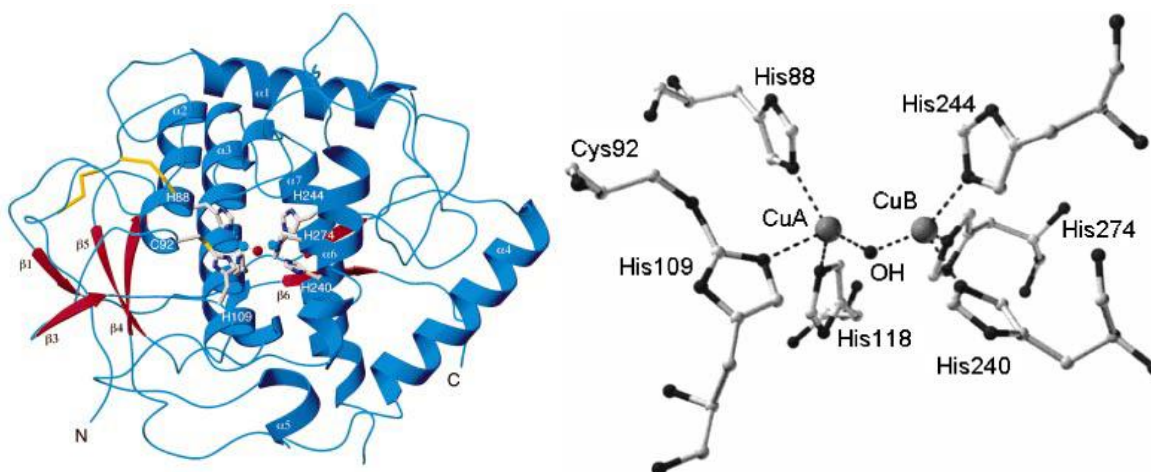


Figura 2.1. Estructura de la catecol oxidasa (a) en forma de listones [7] y (b) del sitio activo en su forma *met* [12]

La enzima caracterizada con difracción de rayos X se aisló de la especie *Ipomoea batata* y se analizó en tres estados: el estado nativo (o en reposo) *met* Cu(II)-Cu(II), el estado reducido *deoxi* Cu(I)-Cu(I) y formando un aducto con un inhibidor, la feniltiourea [7].

La enzima caracterizada es un monómero de 39 kDa compuesto principalmente de hélices α . Cada uno de los dos iones de cobre del sitio activo está coordinado a tres residuos de histidina. En la forma *met*, los dos iones cúpricos están a 2.9 Å de distancia. Además de las seis histidinas, un hidróxido puente completa la esfera de coordinación con geometría de pirámide trigonal. Los estudios de RPE muestran

un estado silencioso debido al acoplamiento antiferromagnético entre los dos cobres.

En la forma reducida, la separación metal-metal aumenta a 4.4 Å. La esfera de coordinación alrededor de uno de los cobres, el CuA, toma la forma de una pirámide trigonal distorsionada, con una molécula de agua en la cuarta posición, mientras que la coordinación alrededor del otro cobre, el CuB, se puede describir como un cuadrado con una posición vacante.

3.1. Evaluación de la actividad catecolasa

Para evaluar la actividad catalítica de los diferentes compuestos análogos a una enzima, se necesita una reacción modelo, similar a la reacción efectuada en la naturaleza, que permita comparar diferentes sistemas. En el caso de la catecol oxidasa, se utiliza la oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol, DBTC (fig. 2.2).

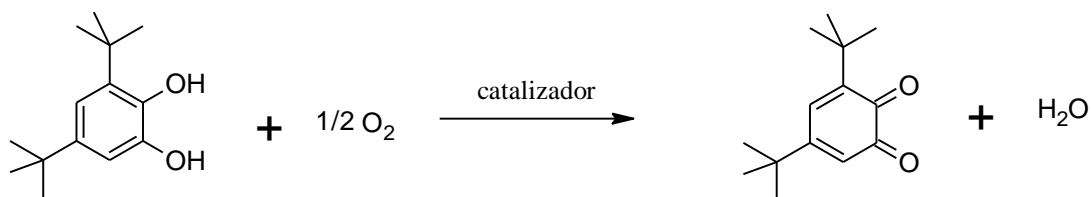


Figura 2.2. Esquema de la reacción modelo

En comparación con otros difenoles encontrados en los sistemas biológicos, el DTBC resulta ser un sustrato con el cual es práctico trabajar: la presencia de los grupos *ter*-butilo le confiere estabilidad frente a oxidaciones posteriores y a la ruptura del anillo e impide las reacciones de auto-polimerización de las quinonas formadas. Además su potencial rédox es bajo lo cual facilita su oxidación [17].

Esta reacción tiene una ventaja adicional: a diferencia del sustrato, el producto formado tiene una absorción característica alrededor de 400 nm con un coeficiente de absorción considerable ($\epsilon = 1630 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ en MeOH:H₂O) [18], lo que permite monitorear la reacción por medio de espectroscopía UV-vis.

4. El trabajo en nuestro grupo de investigación

Desde hace varios años, los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se han enfocado en compuestos dinucleares de cobre (II) con distintos ligantes derivados del imidazol que son compuestos bioinspirados por la catecol oxidasa. Se busca entender cuál es la influencia de la variación de propiedades estructurales en su actividad catecolasa.

Los ligantes se obtienen por medio de la reacción de Mannich en medio básico, que consiste en la formación de enlaces entre el carbono de un aldehído, un nucleófilo y una amina primaria o secundaria [19]. Se han obtenido dos familias de ligantes, con diferentes estructuras: los ligantes abiertos y los cerrados (fig. 2.3). En general, los ligantes abiertos se obtienen al partir de aminas quirales (como α -aminoácidos) y los ligantes cerrados a partir de aminas no quirales.

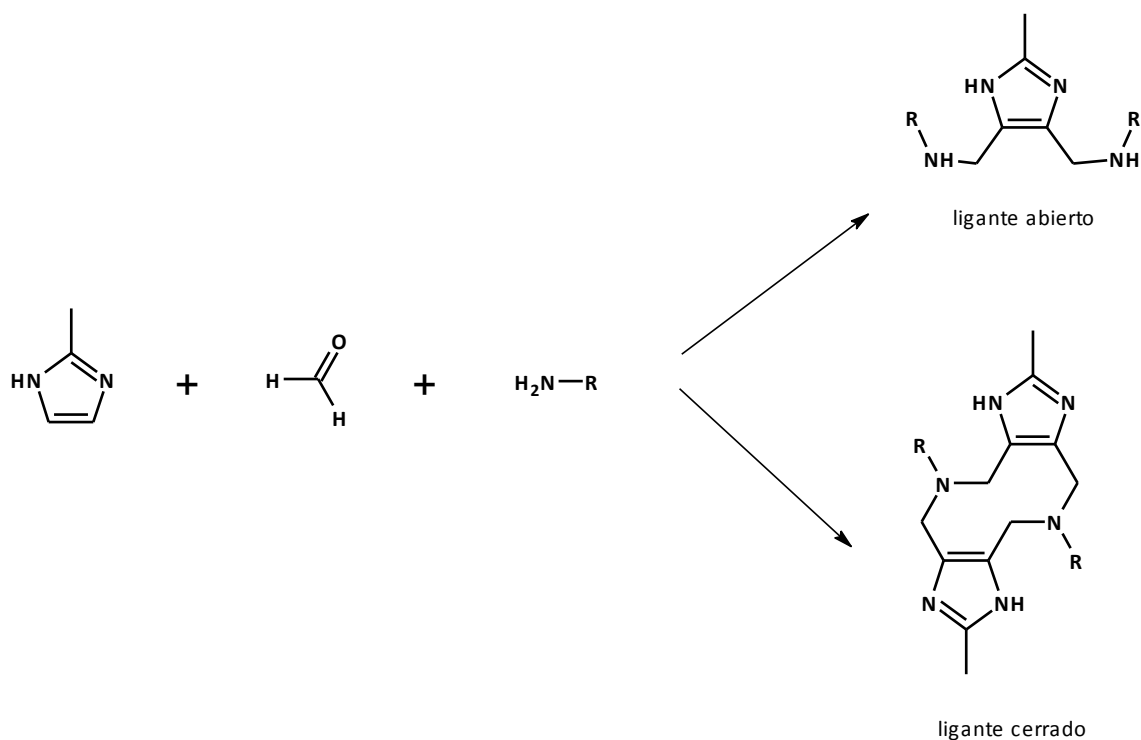


Figura 2.3. Reacción de Mannich para obtener ligantes abiertos y cerrados.

En los ligantes abiertos, dos aminas se adicionan a un anillo imidazólico. Los ligantes resultantes tienen dos sitios de coordinación que no son equivalentes a menos de que el anillo imidazólico pierda el protón del nitrógeno y se convierta en un imidazolato. Estos ligantes se han obtenido utilizando los siguientes L-aminoácidos: alanina [20], leucina [18, 21], fenilalanina [17, 18], metionina [17] y valina. En la familia de los ligantes cerrados, cada amina se adiciona a los dos anillos imidazólicos resultando en un ciclo de diez miembros: una diazecina. En estos ligantes, ambos sitios de coordinación son equivalentes. Se han obtenido a partir de propilamina, N,N-dimetiletilendiamina [22-24], glicina [25], 2-(aminometil)-piridina [26, 27], 2-(2-aminoetil)-piridina, 3-(dimetilamino)-1-propilamina, [9] y etanolamina [8] entre otras.

Ambas familias de ligantes son capaces de coordinarse con dos átomos de cobre por molécula. De un ligante a otro, varía el entorno de coordinación de los iones de cobre(II). En particular, en la familia de los ligantes cerrados, se ha variado el grupo funcional proveniente de la amina y el tamaño de uno de los anillos quelato.

Los ligantes presentan sitios tridentados (a excepción del ligante obtenido a partir de propilamina) y la esfera de coordinación de los iones de cobre(II) se completa con moléculas de disolvente (agua) o contraiones. Se ha podido determinar la estructura de algunos de los complejos obtenidos mediante difracción de rayos X. En la figura 2.4 se muestra la estructura de complejos obtenidos con ligantes cerrados.

Una característica que comparten estos complejos es que la distancia Cu-Cu es mayor de 7 Å, que es mayor a la distancia en la enzima o en la mayoría de los sistemas modelo. Aún así, todos presentan una actividad catecolasa importante.

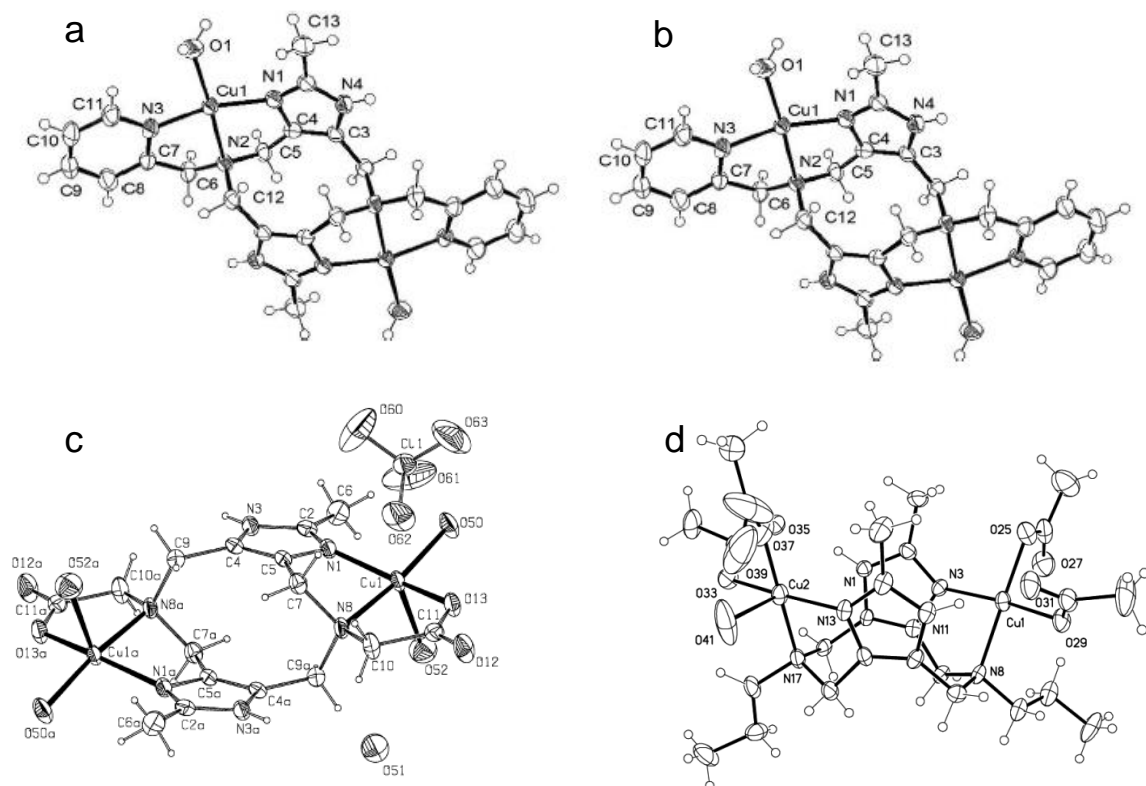


Figura 2.4. Estructuras cristalinas de algunos compuestos dinucleares obtenidos en nuestro grupo de trabajo con ligantes cerrados. Se muestra la estructura del: $[\text{Cu}_2\text{dimeim}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$ [24] (a), del $[\text{Cu}_2\text{dimp}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$ [27] (b), del $[\text{Cu}_2\text{glimeim}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4$ [25] (c) y del $[\text{Cu}_2\text{promeim}(\text{AcO})_4(\text{H}_2\text{O})]$ (d), el único de los complejos en los que la diazocina adopta una conformación de bote.

5. Modelos sintéticos de la catecol oxidasa

5.1. Estudios previos con modelos biomiméticos

Como se mencionó en la sección 2 de este capítulo, el uso de modelos sintéticos puede ayudar a elucidar el mecanismo de acción de la enzima y además, tiene aplicaciones potenciales como catalizadores en la industria. Es por esto que, al igual que sucede con otras enzimas, hay varios grupos de investigación que han centrado su atención en obtener compuestos análogos a la catecol oxidasa. Una gran variedad de compuestos ha sido evaluada como catalizadores en la reacción de oxidación del DTBC [12, 28-40].

Se ha estudiado la influencia de una serie de variaciones estructurales en la actividad catalítica de los compuestos. En particular, se ha variado el tipo y la naturaleza del átomo donador [28, 29], el tamaño del anillo quelato [30], el número de átomos donadores [31], la distancia Cu-Cu [32], la influencia del disolvente [33]; también se ha investigado la influencia del pH [34-38].

Por el momento, se conoce muy poco acerca de los factores que rigen la actividad catecolasa. En general, los compuestos dinucleares tienden a ser más reactivos que los compuestos mononucleares y ciertos estudios indican que los compuestos en los que DTBC se puede unir como puente, son más activos [39, 40]. Wei y colaboradores proponen que distancias cercanas a las observadas en la enzima son óptimas para la actividad [32]. Sin embargo, los compuestos con los que se trabaja en nuestro grupo presentan actividad a pesar de que la distancia entre los átomos de Cu es mucho mayor a 2.9 Å y por lo mismo, la coordinación como puente del DTBC es imposible [8, 9, 17, 18, 20-24, 26, 27, 41].

No hay consenso en cuanto a los factores geométricos que favorecen la actividad catecolasa. Por ejemplo, Krebs y colaboradores encontraron que compuestos con una esfera de coordinación tensionada y con una mayor distorsión en la geometría de pirámide de base cuadrada tienen mayor actividad catecolasa [29]. En contraste, para los compuestos estudiados por Meyer y colaboradores, un aumento en el tamaño del anillo quelato que incrementa la flexibilidad de éste, se ve asociado a una mayor actividad catalítica [30].

El estudio de Gichinga y Striegler [33] determinó que la especie activa en MeOH y en una mezcla MeOH:H₂O no es la misma y, debido a esto, su compuesto es mucho mejor catalizador en la mezcla. Los autores resaltan la importancia de caracterizar bien al sistema en disolución.

En cuanto a la influencia del pH, se ha observado la necesidad de la presencia de un grupo hidroxilo en la esfera de coordinación de al menos uno de los cobres [34-38], ya sea como puente o en una posición apical. También se ha observado que la presencia de más de uno de estos grupos puede inhibir la actividad catecolasa [34, 35, 38].

5.2. Evaluación de la actividad catecolasa en nuestro grupo

Como ya se mencionó, los compuestos dinucleares sintetizados en nuestro grupo poseen una importante actividad catecolasa a pesar de la distancia existente entre los dos átomos de cobre [8, 9, 17, 18, 20-24, 26, 27, 41]. Puesto que el sustrato es insoluble en agua, la evaluación catalítica se ha llevado a cabo en mezclas metanol:agua (1:1) y acetonitrilo:agua.

Se ha determinado que la actividad de los compuestos es mayor en la mezcla MeOH:H₂O [18, 24, 27, 41]. Este efecto se ha atribuido a que el acetonitrilo, es suficientemente blando como para estabilizar al Cu(I) [42]. Esto entorpece la regeneración del catalizador y disminuye su actividad catalítica.

Otro punto que conviene resaltar es que la actividad de estos compuestos es muy dependiente del pH. Su actividad catalítica depende de la presencia de una especie que se forma en valores de pH más altos [9, 18, 24, 27, 41]. Por ejemplo, para los sistemas con ligantes abiertos, la actividad depende de la formación de la especie con el puente imidazolato e hidroxilada, a partir de pH 8.0, siendo el pH óptimo del sistema 8.5 [18].

Para nuestros sistemas en la reacción de oxidación modelo, se ha encontrado un comportamiento lineal de la velocidad de la reacción al variar la concentración del catalizador y un comportamiento de cinética de saturación al variar la concentración de sustrato [8, 9, 17, 18, 20-24, 26, 27, 41]. Este último se ha

ajustado con el modelo de Michaelis-Menten con el objetivo de obtener parámetros cinéticos que permiten hacer comparaciones con los resultados obtenidos dentro de nuestro grupo de trabajo y por otros grupos. En estudios recientes se ha encontrado que el comportamiento de saturación se observa para ciertas relaciones sustrato:catalizador y que a mayores concentraciones de sustrato, el comportamiento cinético cambia [8, 9, 18].

Un estudio reciente [9] evaluó el efecto de variar el tamaño de uno de los anillos quelato de cinco a seis miembros, al aumentar la cadena lateral. Se encontró que los compuestos con el anillo mayor son mucho mejores catalizadores (de acuerdo al parámetro cinético k_{cat}/K_M). Este resultado se ha atribuido a una mayor flexibilidad del ligante, que facilita los rearrreglos geométricos que se llevan a cabo al reducirse el Cu(II) a Cu(I).

Capítulo 2. Objetivos e hipótesis

1. Objetivo general

Emprender el estudio del complejo dinuclear de Cu(II) con un ligante análogo a un sistema previamente estudiado el Cu₂dihe, incrementando el tamaño del anillo quelato de 5 a 6 miembros y estudiar el efecto de sustituir un átomo donador (N por O) por comparación con los compuestos Cu₂dmpa y Cu₂diep.

2. Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar el ligante dihp por medio de la reacción de Mannich.
- Sintetizar los complejos dinucleares del ligante dihp con diferentes sales de cobre (II) y caracterizarlos.
- Determinar las constantes de protonación del ligante y las constantes de formación e hidrólisis del complejo.
- Evaluar la actividad catecolasa del complejo dinuclear por medio de la reacción de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol.
- Comparar el comportamiento catalítico del sistema con los compuestos Cu₂dihe, Cu₂diep y Cu₂dmpa.

3. Hipótesis

Puesto que el Cu(II) es más afín a los ligantes nitrogenados que a los ligantes oxigenados, la constante de formación del complejo dinuclear con dihp será menor a la observada con ligantes análogos (dmpa, diep), debido a la presencia del grupo funcional OH.

Adicionalmente, se espera que el complejo dinuclear sintetizado sea capaz de actuar como catalizador en la reacción de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol. El incremento en el tamaño del anillo quelato de 5 a 6 miembros incrementará la actividad catecolasa en comparación con el ligante análogo dihe.

Capítulo 3. Material y métodos

1. Reactivos y disolventes utilizados

Todos los reactivos que a continuación se enlistan están disponibles de forma comercial y se utilizaron sin purificación adicional.

3-Aminopropanol, 99% (Aldrich)

2-Metilimidazol, 99% (Aldrich)

Formaldehido, 37.5% A.R. (Mallinckrodt)

Hidróxido de potasio, 85+% (Aldrich)

Hidróxido de sodio, 98.4% (J.T. Baker)

Perclorato de sodio, 98+% (Sigma-Aldrich)

Nitrato de potasio, 99+% (Aldrich)

Nitrato de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}]$, 99.9% (J.T. Baker)

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

Tetrafluoroborato de cobre(II) hidratado, $[\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}]$, 19-22% Cu (Aldrich)

Cloruro de cobre(II), $[\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, 99% (Sigma-Aldrich)

Ácido nítrico, 65.2% (J.T. Baker)

Ácido perclórico, 70% (Mallinckrodt)

Biftalato de potasio, 99.95-100.5% (Aldrich)

Ácido succínico, AR (Mallinckrodt)

Buffer pH=4.00: biftalato de potasio, (Sigma-Aldrich)

Buffer pH=7.00: fosfato de sodio dibásico y fosfato monobásico, (Sigma-Aldrich)

Buffer pH=10.00: carbonato de sodio y bicarbonato de sodio, (Sigma-Aldrich)

Cloruro de potasio, 99.5% (Merck)

DTBC, di-*ter*-butilcatecol, 99% (Aldrich)

EDTA, sal disódica dihidratada, 99.3% (JT Baker)

TRIS, tris(hidroximetil)-aminometano, 99.9+% ultrapuro (Aldrich)

HEPES, ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico], 99.5% titration (Sigma)

Metanol grado espectrofotométrico, 99.9% (Aldrich)

Metanol grado reactivo, 99.5%

Acetona grado histológico, 99.5+% (Sigma-Aldrich)

Agua deuterada [D₂O], 99.9% D (Aldrich)

Ácido Clorhídrico deuterado [DCI], 35% en agua deuterada, 99.9% D

2. Síntesis

2.1. Síntesis del ligante 2,8-dimetil-5,11-di-(hidroxipropil)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo[4,5h]-imidazo[4,5c][1,6] diazecina, dihp

El ligante se sintetizó por medio de la reacción de Mannich en un paso (fig. 3.1), utilizando el método reportado en la literatura [43]. Se disolvieron 3.28 g (40 mmol) de 2-metilimidazol en 50 mL de agua. A esta disolución se agregó lentamente, de forma simultánea pero por separado, 3.00 g (3.04 mL, 40 mmol) de 3-aminopropanol y 6.49 g (6.5 mL, 80 mmol) de formaldehído (37% en agua). La mezcla de reacción se llevó a un pH de ≈ 12 con KOH y se calentó a 60°C por tres días, tiempo durante el cual se formó un sólido. El producto formado (1.92g, rendimiento de 26%) se filtró y se lavó con agua y con acetona.

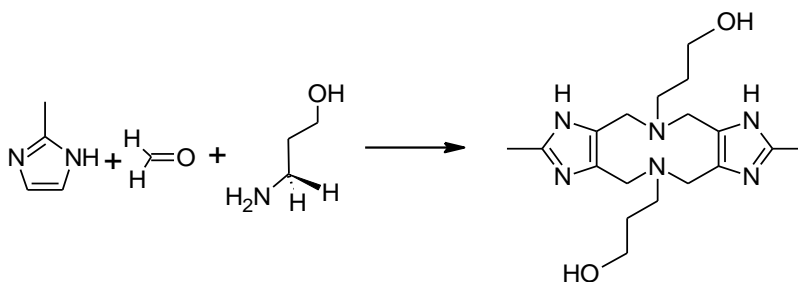


Figura 3.1. Diagrama de la reacción de Mannich llevada a cabo.

El producto obtenido se caracterizó por medio de RMN de ^1H , espectroscopía de IR y análisis elemental. Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrofotómetro Unity INOVA Varian (300MHz), los de FT-IR en un Spectrum RX1 Perkin Elmer por reflectancia de ATR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) y para el análisis elemental se utilizó un equipo Fisons AE 1108. Todos estos estudios se llevaron a cabo en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química. Los resultados se describen a continuación:

^1H RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$): δ 1.952 (q) $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, 2.456 (s) im- CH_3 , 3.446 (t) NCH_2 , 3.522 (t) $\text{CH}_2\text{-OH}$, 4.376 (s) im- CH_2N .

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot 0.5\text{ H}_2\text{O}$: C, 58.09; H, 8.43; N, 22.35. Encontrado: C, 58.20; H, 8.41; N, 22.62.

2.2. Síntesis de complejos dinucleares con Cu(II)

Los compuestos de coordinación se prepararon al agregar lentamente 0.25 mmol (0.190 g) de ligante dihp a disoluciones en metanol de diferentes sales de Cu(II) (0.50 mmoles en 50 mL de MeOH). Es importante mencionar que el cambio de polaridad del disolvente por pequeño que sea (incluso al introducir aunque sea una pequeña cantidad de agua) es suficiente para que precipite un sólido con apariencia de hidróxido. Por esto, se partió de las sales directamente y no se utilizaron disoluciones acuosas estandarizadas de cobre.

Las disoluciones azules o verdes obtenidas se dejaron reposar por varios días a temperatura ambiente para lograr la evaporación lenta del disolvente. La obtención de cristales aptos para obtener la estructura por rayos X de monocristal sólo se dio en el caso del $[\text{Cu}_2\text{dihp}](\text{BF}_4)_4$. Los demás compuestos obtenidos se

caracterizaron por espectroscopía de IR y por análisis elemental. A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada caso.

a. $[\text{Cu}_2\text{dihp}](\text{ClO}_4)_4$

Se partió de 0.1859 g de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Después de la evaporación completa del disolvente, se obtuvo un sólido turquesa que se caracterizó por IR y por análisis elemental.

Análisis elemental. Calculado para $[\text{Cu}_2(\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$: C, 21.33; H, 4.38; N, 8.29. Encontrado: C, 21.62; H, 4.31; N, 8.33.

b. $[\text{Cu}_2\text{dihp}]\text{Cl}_4$

Se partió de 0.0879 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Después de varios días, se evaporó el disolvente completamente. Se obtuvo un compuesto sólido que presentaba varias fases: del fondo del vaso de precipitados se pudo separar un precipitado verde pistache, de color y apariencia uniformes. En las paredes, se observaba una mezcla de compuestos de diferentes colores. Se separó de forma manual el compuesto verde pistache y fue el que se caracterizó.

Análisis elemental. Calculado para $[\text{Cu}_2(\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{Cl})_4 \cdot \text{MeOH}$: C, 32.63; H, 5.48; N, 12.02. Encontrado: C, 32.06; H, 5.38; N, 11.86.

c. $[\text{Cu}_2\text{dihp}](\text{BF}_4)_4$

Se siguió el procedimiento descrito partiendo de 1.1053 g de $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($M=273.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) disueltos en metanol. La disolución verde obtenida se mantuvo en el refrigerador para una muy lenta evaporación del disolvente. Al cabo de un par de semanas, se obtuvieron cristales de color azul rey que fueron analizados empleando la técnica de difracción de rayos X. Se observó la presencia de otro tipo de cristales, éstos incoloros, en la misma disolución. La separación de los cristales azul rey se realizó manualmente empleando un microscopio para efectuar los diferentes análisis.

3. Caracterización de los compuestos obtenidos

3.1. Difracción de rayos X

Como se mencionó en la sección anterior, de la disolución de dihp con tetrafluoroborato de cobre en metanol se obtuvieron dos tipos de cristales. Ambos resultaron apropiados para ser analizados por difracción de rayos X. Los cristales azul rey permitieron determinar la estructura del complejo dinuclear de Cu(II) con aniones BF_4^- ; los cristales incoloros resultaron ser una forma protonada del ligante, $\text{H}_2\text{dihp}^{2+}$, con aniones BF_4^- .

En ambos casos, los cristales obtenidos se analizaron en la USAI, utilizando un difractómetro de rayos X, Gemini Atlas (Oxford diffraction). La estructura se refinó mediante el método de “matriz entera” por mínimos cuadrados en F^2 . Todos los átomos se resolvieron anisotrópicamente, a excepción de los átomos de hidrógeno.

A continuación se muestran los datos cristalográficos y los parámetros de refinamiento para el ligante $\text{H}_2\text{dihp}(\text{BF}_4)_2$ y para el complejo $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$.

Tabla 3.1. Parámetros de refinamiento del ligante $\text{H}_2\text{dihp}(\text{BF}_4)_2$

Fórmula empírica	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{B}_4\text{F}_{16}\text{N}_6\text{O}_2$
Peso formular	713.75
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	$\text{P2}_1/\text{n}$
Dimensiones de la celda	$a = 9.6871(6) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 11.6409(8) \text{ \AA}$ $\beta = 98.740(6)^\circ$ $c = 12.7376(8) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen (\AA^3), Z	$1419.70(16) \text{ \AA}^3$, 2
Temperatura (K)	298(2)
Longitud de onda (\AA)	1.54180
Densidad calculada (Mg/m^3)	1.670
Coefficiente de absorción (mm^{-1})	1.609
Bondad de ajuste en F^2	1.069
Índices finales R [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0496$, $wR2 = 0.1223$
índices R (todos los datos)	$R1 = 0.0647$, $wR2 = 0.1330$

Tabla 3.2. Parámetros de refinamiento del complejo dinuclear $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$

Fórmula empírica	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{B}_4\text{Cu}_2\text{F}_{16}\text{N}_6\text{O}_6$
Peso formular	908.86
Sistema cristalino	triclinico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda	a = 8.5486(4) Å $\alpha = 91.288(4)^\circ$ b = 9.4305(5) Å $\beta = 97.065(4)^\circ$ c = 10.4986(5) Å $\gamma = 104.142(5)^\circ$
Volumen (Å ³), Z	813.27(7) Å ³ , 1
Temperatura (K)	130(2)
Longitud de onda (Å)	1.54180
Densidad calculada (Mg/m ³)	1.856
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	2.899
Bondad de ajuste en F ²	1.049
Índices finales R [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0452, wR2 = 0.1148
índices R (todos los datos)	R1 = 0.0515, wR2 = 0.1184

3.2. Susceptibilidad magnética y momento magnético

La susceptibilidad magnética se determinó únicamente para la muestra en polvo del complejo con cloruros con el método de de Gouy a 292 K utilizando una balanza de susceptibilidad magnética, modelo MARK I (MSB) de Johnson-Matthey. Se utilizaron las constantes de Pascal para corregir las contribuciones diamagnéticas y el momento magnético efectivo se calculó a partir de la expresión $\mu_{ef} = 2.84(\chi_M T)^{1/2}$ [44, 45].

3.3. Determinación de los espectros de UV-vis y de Resonancia Paramagnética Electrónica

Con ambas técnicas, se obtuvieron los espectros en disolución, a partir de complejos preparados *in situ*, y en sólido, a partir del compuesto con percloratos sintetizado antes mencionado.

Se determinó el espectro UV-vis de una disolución de concentración 1 mM del complejo preparada *in situ* en la mezcla MeOH:H₂O a partir de un equivalente del ligante y dos equivalentes de una disolución valorada de Cu(ClO₄)₂, utilizando un

espectrofotómetro HP Agilent 8453 de arreglo de diodos, controlado con el software UV-Visible Chemstation Software. El espectro en estado del compuesto sólido se determinó por medio de la técnica de reflectancia difusa en un espectrofotómetro Varian Cary 500 UV-Vis-NIR.

Los espectros de RPE de una disolución 5 mM del complejo en MeOH y de éste en estado sólido se obtuvieron en la USAI con un equipo Burker FA-300.

4. Determinación potenciométrica de las constantes de acidez del ligante y de formación y de hidrólisis del complejo

Las titulaciones potenciométricas se llevaron a cabo en un titulador automático con dosificador 702 SM Titrino de Metrohm, acoplado a una computadora con el software Tiamo 3.1 (de Metrohm). Se utilizó un electrodo combinado de Ag/AgCl (electrodo Ecotrodo Plus de Metrohm) para las mediciones de pH, calibrado con disoluciones amortiguadoras de pH 7.0, 4.0 y 10.0. Las diferentes disoluciones se titularon en una celda de vidrio de doble pared, mantenida a temperatura constante a $(25.00 \pm 0.05)^\circ\text{C}$ por un baño recirculador de agua, con agitación constante, realizada con un 728 Stirrer (Metrohm). La fuerza iónica se impuso a 0.1 M con KNO_3 o NaClO_4 , en función del ácido utilizado. Las disoluciones en la celda se purgaron con una corriente de nitrógeno, para evitar la disolución del CO_2 atmosférico. Cada titulación se realizó por triplicado.

4.1 Titulaciones en agua

La primera parte del procedimiento consistió en preparar una disolución de NaOH libre de carbonatos, de concentración cercana a 0.1 M y estandarizarla utilizando una disolución 0.10 M de biftalato de potasio. Posteriormente, esta disolución sirvió para valorar una disolución de HNO_3 , de concentración cercana a 0.1 M.

Al conocer la concentración de estas disoluciones fue posible preparar la disolución problema del ligante, tanto en ausencia como en presencia de Cu(II). En ambos casos, se preparó una disolución en agua del ligante *dihp* de concentración $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ con 5 equivalentes de HNO_3 (de forma que la concentración total de protones agregados fue de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), para asegurar la protonación total del ligante. A la segunda disolución, se agregaron además dos equivalentes de Cu(II), para una concentración final de cobre(II) de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, a partir de una disolución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ valorada. Para esta segunda disolución el orden de preparación resultó ser de suma importancia: el ácido y una parte del disolvente se deben de agregar al ligante antes que el Cu(II) para asegurar que no precipite.

Se titularon 25.0 mL de cada una de las disoluciones problema, por triplicado, con la disolución valorada de NaOH.

Las constantes de protonación del ligante y de estabilidad y de hidrólisis del complejo se obtuvieron a partir de los datos de las titulaciones potenciométricas con el programa Hyperquad 2003 [46, 47]. El diagrama de distribución de especies se graficó a partir de las constantes obtenidas, utilizando MEDUSA [48].

4.2 Titulaciones en la mezcla metanol:agua (1:1)

El estudio potenciométrico también se realizó en la mezcla MeOH:H₂O (1:1) puesto que éste es el medio en el cuál se lleva a cabo la evaluación catalítica en nuestro grupo de trabajo. El procedimiento a seguir fue un poco diferente del anterior, pero la primera parte fue la misma: las disoluciones de NaOH y de ácido, HClO₄ en este caso, también se prepararon en agua, en las mismas concentraciones, y se valoraron, la primera diferencia fue la calibración del electrodo en el medio no acuoso, llevada a cabo con un buffer de succinatos [49]. Posteriormente, fue necesario titular de forma manual una disolución de HClO₄,

diluida de tal forma que la titulación se lleva a cabo utilizando un volumen de NaOH menor a 2.5 mL, para no cambiar la composición del medio en más de un 10%. Esta valoración permitió obtener un factor de corrección para las lecturas del electrodo en los puntos más alejados del pH de calibración [9, 18].

Una vez obtenido este factor, las titulaciones del ligante en ausencia y en presencia de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ se llevaron a cabo de la misma forma que en el medio acuoso. Como se requería menos de 2.5 mL de NaOH para cada titulación, no fue necesario modificar la concentración del ligante ni la de la sosa. Las concentraciones de las diferentes especies en las disoluciones problema fueron 1.0 mM para el ligante dihp, 5.0 mM para el ácido y 2.0 mM para el Cu(II).

Los valores pH en función del volumen de sosa agregados se corrigieron con el factor de corrección obtenido anteriormente y estos datos corregidos fueron los que se utilizaron con el programa Hyperquad 2003 para la determinación de las constantes [46, 47]. El diagrama de distribución de especies se graficó a partir de las constantes obtenidas, utilizando MEDUSA [48].

5. Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos se efectuaron utilizando un espectrofotómetro HP Agilent 8453 de arreglo de diodos, controlado con el software UV-Visible Chemstation Software. Se utilizó una celda de cuarzo de paso óptico de 1 cm, la temperatura se mantuvo en 25° C utilizando un accesorio Peltier de control de temperatura de Agilent.

La evaluación catalítica se llevó a cabo usando la reacción modelo antes mencionada, la oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol (DTBC) a la quinona correspondiente, la 3,5-di-*ter*-butilquinona (DTBQ) (fig. 3.2). Es posible seguir la

aparición de ésta en función del tiempo espectrofotométricamente gracias a una absorción característica a 400 nm ($\epsilon = 1630 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ en MeOH:H₂O) [18].

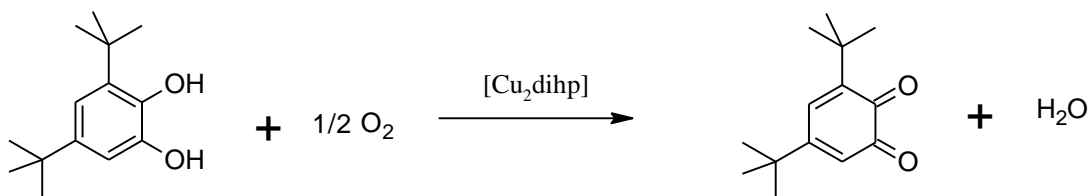


Figura 3.2. Esquema de la reacción de oxidación llevada a cabo.

Todos los experimentos para la evolución catalítica se llevaron a cabo de la misma manera. De forma global, el procedimiento consistió en preparar las disoluciones requeridas (la disolución del complejo a evaluar como catalizador, la disolución amortiguadora para fijar el pH del experimento y la disolución del sustrato, el DTBC) y agregar un mililitro de cada una de éstas, en ese orden, a la celda de cuarzo. Se mezclaron rápidamente en la celda y se adquirieron los espectros de la mezcla por un tiempo variable (dependiendo del experimento efectuado) con un tiempo de ciclo de 0.5 ó 1 segundo, es decir que el equipo tomó un espectro cada medio segundo o cada segundo. La mezcla de tres disoluciones implica que la concentración en celda de cada una de las especies es un tercio de la concentración en la disolución preparada.

En cada caso, se evaluó la velocidad inicial, es decir, la velocidad durante los primeros segundos. Se determinó a partir de la pendiente, en unidades de $\Delta A/s$, en la parte lineal de la gráfica de absorción a 400 nm en función del tiempo. Las pendientes obtenidas se convirtieron a unidades de concentración de DTBQ sobre tiempo a partir del coeficiente de absorción molar. Con las velocidades en unidades de concentración por segundo se construyeron las gráficas de velocidad inicial en función del parámetro que se varió. Se graficaron en cada caso los promedios de todas las repeticiones que se hicieron para cada medición (cuatro o cinco repeticiones dependiendo del experimento) junto con la desviación estándar asociada.

Todas las disoluciones se hicieron en la mezcla MeOH:H₂O, preparada con metanol grado espectrofotométrico. Una vez listas, se mantuvieron a la temperatura de reacción en un baño de agua a 25°C. El blanco para cada estudio se tomó con dos mililitros de mezcla MeOH:H₂O y un mililitro de la disolución amortiguadora utilizada para el experimento. Entre cada medición cinética, la celda de cuarzo se lavó con metanol:agua.

Para preparar las disoluciones amortiguadoras, se pesó la cantidad de sal necesaria y se disolvió en agua (un poco menos de la mitad volumen total de la disolución). Posteriormente, se ajustó el pH al valor deseado utilizando NaOH o HClO₄ según fuera necesario (el ácido empleado es el ácido del contraion del catalizador). Finalmente, se agregó un volumen equivalente de MeOH y la disolución se aforó al volumen deseado utilizando la mezcla MeOH:H₂O.

Las disoluciones de sustrato se prepararon de forma contraria, es decir, el DTBC se disolvió primero en metanol y luego se agregó un volumen equivalente de agua, para terminar se aforaron con la mezcla MeOH:H₂O.

Mientras que la disolución del [Cu₂dihp] y las disoluciones amortiguadoras pueden dejarse listas un día antes de hacer el experimento, la disolución de DTBC es fotosensible y, en presencia de O₂, empieza a oxidarse. Por esta razón, es necesario prepararla justo antes de iniciar las mediciones. Otras medidas tomadas para evitar la formación de la DTBQ antes de la medición cinética, es decir, por causas ajenas a la acción del complejo, incluyen mantener el material utilizado para la preparación de la disolución en un baño de EDTA 0.025 M, utilizar sólo metanol grado espectrofotométrico, aún para enjuagar el material después del EDTA, y mantener la disolución en frascos ámbar y cubierta con papel aluminio.

5.1. Influencia del pH

Para determinar el efecto del pH en la velocidad de reacción, ésta se llevó a cabo a diferentes valores de pH (de 7.0 a 9.5). La variación de pH se realizó mediante el uso de diferentes amortiguadores de concentración 0.45 M, manteniendo constante la concentración de catalizador y de sustrato. Cada vez que se cambió de pH, se tomó de nuevo el blanco.

La basicidad del medio tiene un efecto de catálisis en la reacción de oxidación del DTBC por lo que la reacción también se hizo, en cada pH, reemplazando el catalizador por un mililitro de la mezcla MeOH:H₂O, para no variar las concentraciones en celda de las otras especies al no agregar el catalizador.

Se utilizaron dos amortiguadores: el ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES) y el tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). En la tabla 3.3 se indica qué amortiguador se usó para cada valor de pH.

Se preparó una disolución stock de [Cu₂dihp](ClO₄)₄ de concentración 2.38×10^{-3} mol.L⁻¹ (a partir del ligante y de una disolución valorada de Cu(ClO₄)₂ de concentración 0.196 M) en la mezcla MeOH:H₂O. Las disoluciones utilizadas en las diferentes repeticiones del experimento se prepararon a partir de esta disolución. Para los experimentos donde se cambia el pH, se utilizó una disolución de Cu₂dihp, de concentración 6.0×10^{-5} M. La disolución de sustrato se preparó en una concentración de 6.0 mM.

Como ya se indicó, se mezcló un mililitro de cada una de estas disoluciones para hacer la lectura, es decir, las concentraciones en celda fueron 0.15 M para los amortiguadores, 2.0×10^{-2} mM para el complejo, 2.0 mM para el DTBC. Las mediciones en cada pH se repitieron cinco veces y se determinó la velocidad inicial en cada caso.

Tabla 3.3. Amortiguador empleado a cada valor de pH para preparar las disoluciones amortiguadoras

pH	Amortiguador
7.0	HEPES
7.5	
8.0	
8.5	TRIS
9.0	
9.5	

5.2. Variación de la concentración de $[\text{Cu}_2\text{dihp}]^{4+}$

Los experimentos de variación del pH permitieron elegir al pH=8.5 como pH de trabajo para el resto de los experimentos.

Para determinar el efecto de la variación de la concentración del catalizador en la velocidad de reacción se mantuvieron constantes el pH del medio y la concentración de DTBC. A partir de la disolución stock de complejo mencionada anteriormente, se preparó una disolución de concentración 0.24 mM de $[\text{Cu}_2\text{dihp}]$. A partir de ésta, se prepararon seis disoluciones de diferente concentración en un intervalo de 3.0×10^{-2} mM a 0.18 mM.

Tabla 3.4. Alícuotas para la preparación de las disoluciones del catalizador.

Concentración (mM)	Concentración en celda (mM)	Alícuota de la disolución 0.24 mM para 5.0 mL (mL)
0.03	1.0×10^{-2}	0.625
0.06	2.0×10^{-2}	1.250
0.09	3.0×10^{-2}	1.875
0.12	4.0×10^{-2}	2.500
0.15	5.0×10^{-2}	2.125
0.18	6.0×10^{-2}	3.750

También se preparó una disolución amortiguadora de pH 8.5 de concentración 0.45 M, en la mezcla MeOH:H₂O e inmediatamente antes del experimento, una disolución 6 mM de DTBC.

La relación catalizador:sustrato varió de 1:200 a 5:200. Las concentraciones en celda fueron de 0.15 M para los amortiguadores, 2.0 mM para el DTBC y las del complejo variaron de 1.0×10^{-2} mM a 5.0×10^{-2} mM. Se efectuaron cuatro repeticiones para cada concentración del catalizador, siguiendo el método mencionado anteriormente.

5.3. Variación de la concentración de DTBC

Se preparó una disolución amortiguadora de TRIS 0.45 M de pH 8.5 y una disolución de $[\text{Cu}_2\text{dihp}]^{4+}$ de concentración de 1.5×10^{-2} mM (es decir, en celda, 5.0×10^{-3} mM).

Las concentraciones de DTBC variaron de 0.6 mM a 75 mM (es decir, en celda, de 0.2 mM a 25 mM). Las disoluciones se prepararon a partir de una disolución stock de DTBC 75mM en la mezcla MeOH:H₂O. A esta concentración, la temperatura es muy importante pues de otra forma, al agregar el agua el DTBC precipita (la mezcla se ve opaca). Una forma para evitar esta precipitación es llevar los disolventes a una temperatura alrededor de la temperatura de trabajo (25° C). En la tabla 3.5 se resumen las concentraciones utilizadas.

Se hicieron por lo menos cuatro repeticiones para cada concentración del sustrato, siguiendo el método mencionado anteriormente.

Tabla 3.5. Concentraciones de las disoluciones de DTBC.

[DTBC] en disolución (mM)	[DTBC] en celda (mM)	Relación Cu ₂ L:DTBC
0.6	0.2	1:40
0.9	0.3	1:60
1.2	0.4	1:80
1.5	0.5	1:100
1.8	0.6	1:120
2.7	0.9	1:180
3.6	1.2	1:240
9.0	3.0	1:600
15.0	5.0	1:1000
30.0	10.0	1:2000
45.0	15.0	1:3000
75.0	25.0	1:5000

Capítulo 4. Resultados y discusión

1. Síntesis y caracterización del ligante dihp

Como se describió en el capítulo anterior, se llevó a cabo la síntesis del ligante dihp por medio de la reacción de Mannich en medio básico, de acuerdo a una metodología previamente descrita [43].

El producto se lavó con metanol y con acetona y se dejó secar en la estufa para eliminar el exceso de disolvente. El rendimiento obtenido (26%) fue bajo, pero es comparable a rendimientos obtenidos por nuestro grupo de trabajo [8, 9].

El ligante obtenido se caracterizó por medio de diferentes técnicas, a continuación se presentan los resultados obtenidos.

Análisis elemental

Esta técnica se empleó para determinar los porcentajes de C, H y N. Los resultados experimentales concuerdan con los resultados calculados para $C_{18}H_{30}N_6O_2 \cdot \frac{1}{2} H_2O$. Los resultados se presentan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resultados de análisis elemental del ligante dihp

Elemento	Porcentaje experimental	Porcentaje calculado	l % errorl
C	58.09	58.20	0.18
H	8.43	8.41	0.23
N	22.35	22.62	1.19

Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

El espectro obtenido se muestra en la figura 4.1. Una parte de las asignaciones de las señales se hizo por comparación con el espectro del ligante dihe (que es el análogo obtenido con etanolamina en vez de propanolamina) [8].

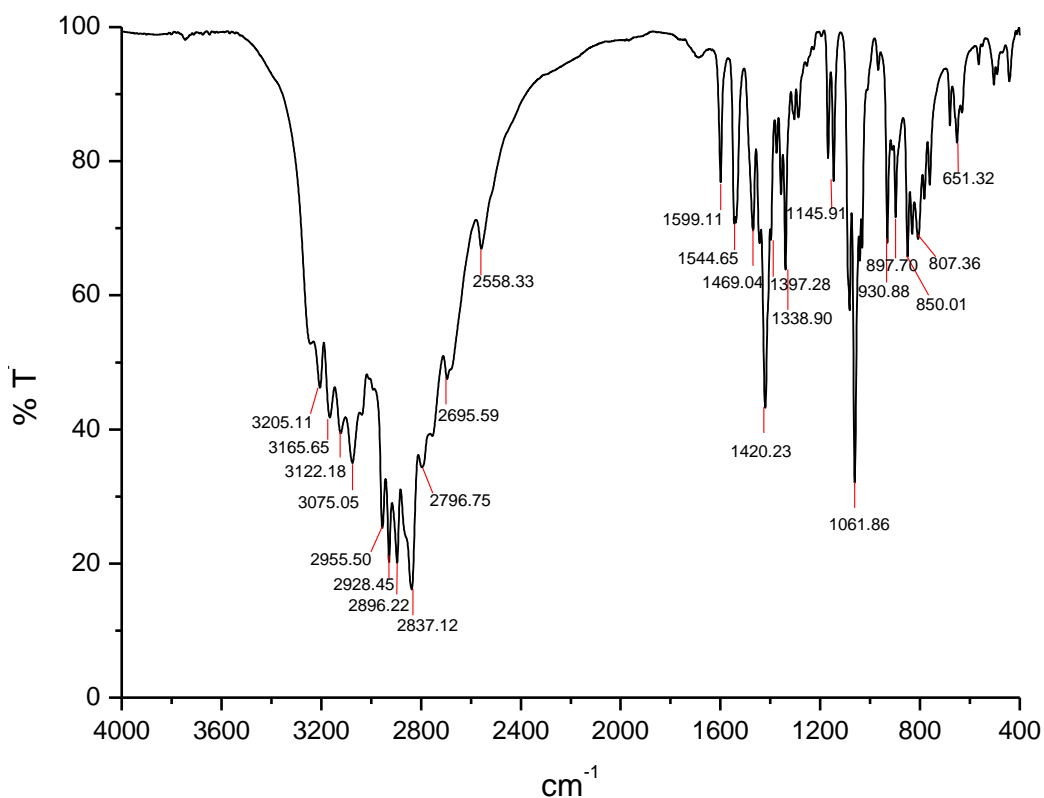


Figura 4.1. Espectro de infrarrojo del ligante dihp obtenido por reflectancia ATR

A continuación se resumen las asignaciones hechas [50].

Tabla 4.2. Frecuencia de vibración de diferentes grupos funcionales presentes en el ligante dihp.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3205	OH alcohol	1545	N-H imidazol (δ)
3122	NH imidazol	1469	-CH ₂ - (tijera)
2955	-CH ₃	1443	-CH ₃ (δ_{as})
2928	-CH ₂ - (ν_{as})	1397	-CH ₃ imidazol (δ_s)
2896	-CH ₂ - (ν_s)	1062	C-OH alcohol prim
1599	C=N imidazol	931, 761	anillo aromático del imidazol

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El espectro de RMN de ^1H obtenido permitió la identificación del ligante y, en particular, corroborar que el ligante sintetizado tenía la estructura deseada. En la figura 4.2 se muestra el espectro obtenido.

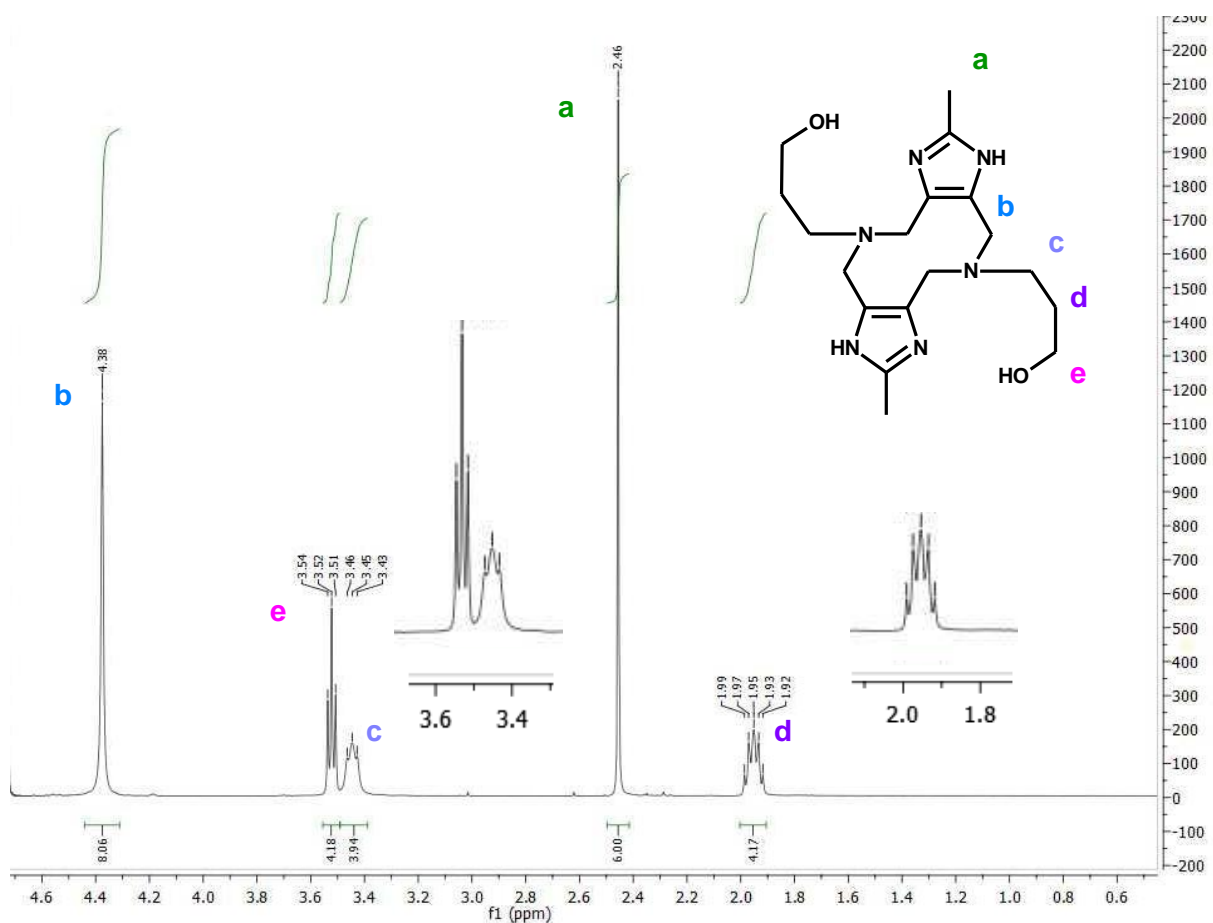


Figura 4.2. Espectro de RMN de ^1H del ligante dihp

El experimento se llevó a cabo en D_2O , acidificado con DCl para permitir la disolución del dihp. El uso de este disolvente implica que los protones unidos a heteroátomos (oxígeno y nitrógeno) es decir, los protones ácidos, son intercambiados por átomos de deuterio, por lo que no aparecen en el espectro [51]. Las asignaciones se hicieron con base en el desplazamiento químico, la multiplicidad y la integración de las señales (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Señales observadas en el espectro de RMN de ^1H del ligante

Señal	δ (ppm)	Multiplicidad	Integración	Asignación
a	2.456	singulete	6 H	im-CH ₃
b	4.376	singulete	8 H	im-CH ₂ -N
c	3.446	triplete	4 H	N-CH ₂
d	1.952	quintuplete	4 H	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
e	3.522	triplete	4 H	CH ₂ -OH

2. Síntesis y caracterización de los complejos dinucleares

Como se mencionó en la sección experimental, se trató de obtener el complejo dinuclear utilizando disoluciones de diferentes sales de cobre(II) con el ligante y permitiendo la evaporación lenta del disolvente. Sin embargo, como se señaló en el caso del compuesto formado a partir de CuCl_2 , fue común obtener una mezcla de productos de colores diferentes. Por lo tanto, en esta sección sólo se presentan los resultados obtenidos para aquellos compuestos que se pudieron separar, en particular, los cristales obtenidos a partir de $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$.

Esta particularidad de los sistemas Cu_2L de formar diversas especies se ha observado anteriormente en nuestro grupo de trabajo [9]. El ligante dihp forma parte de los ligantes “largos” en los cuáles uno de los anillos quelato tiene seis miembros (a diferencia de los ligantes “cortos” en los cuales el anillo análogo tiene cinco miembros). El miembro suplementario del anillo proviene directamente de la mayor longitud de la cadena de la amina primaria utilizada en la reacción de Mannich. Se piensa que la mayor longitud del brazo del alcohol (o del brazo de la amina lateral en el ligante dmpa [9]) implica que hay una mayor flexibilidad en el sistema que en los sistemas “cortos”: el alcohol se puede coordinar ya sea en el plano del cuadrado o en una posición apical. Estos dos isómeros podrían ser las especies responsables de los diferentes colores obtenidos.

Análisis elemental

En la tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos. Los porcentajes se calcularon para $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_4] \cdot \text{MeOH}$ y $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$. Se considera que los percloratos y los tetrafluoroboratos se encuentran fuera de la esfera de coordinación pues es posible ver la banda de estos grupos libres en el espectro de IR.

Tabla 4.4. Resultados de análisis elemental de los compuestos dinucleares obtenidos a partir de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, CuCl_2 y $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$.

Elemento	$[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$			$[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_4] \cdot \text{MeOH}$			$[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$		
	C	H	N	C	H	N	C	H	N
Porcentaje experimental	21.62	4.31	8.33	32.06	5.38	11.86	23.04	4.29	9.13
Porcentaje experimental	21.33	4.38	8.29	32.63	5.48	12.02	23.33	4.35	9.63
l % errorl	1.3	1.7	1.8	1.8	1.8	1.3	1.3	1.3	0.61

Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Se muestran los espectros de los compuestos obtenidos a partir de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, CuCl_2 y $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$ (fig. 4.3 a 4.5). Si se comparan los espectros de los complejos con el espectro del ligante, se observa que las bandas correspondientes a la vibración de ciertos grupos funcionales se encuentran desplazadas. Este cambio en la frecuencia de vibración es ocasionado por la coordinación del los iones $\text{Cu}(\text{II})$ a los grupos funcionales responsables de la señal. En la tabla 4.5 se resumen algunas asignaciones efectuadas, en particular aquéllas en dónde se nota mayor influencia del ion coordinado.

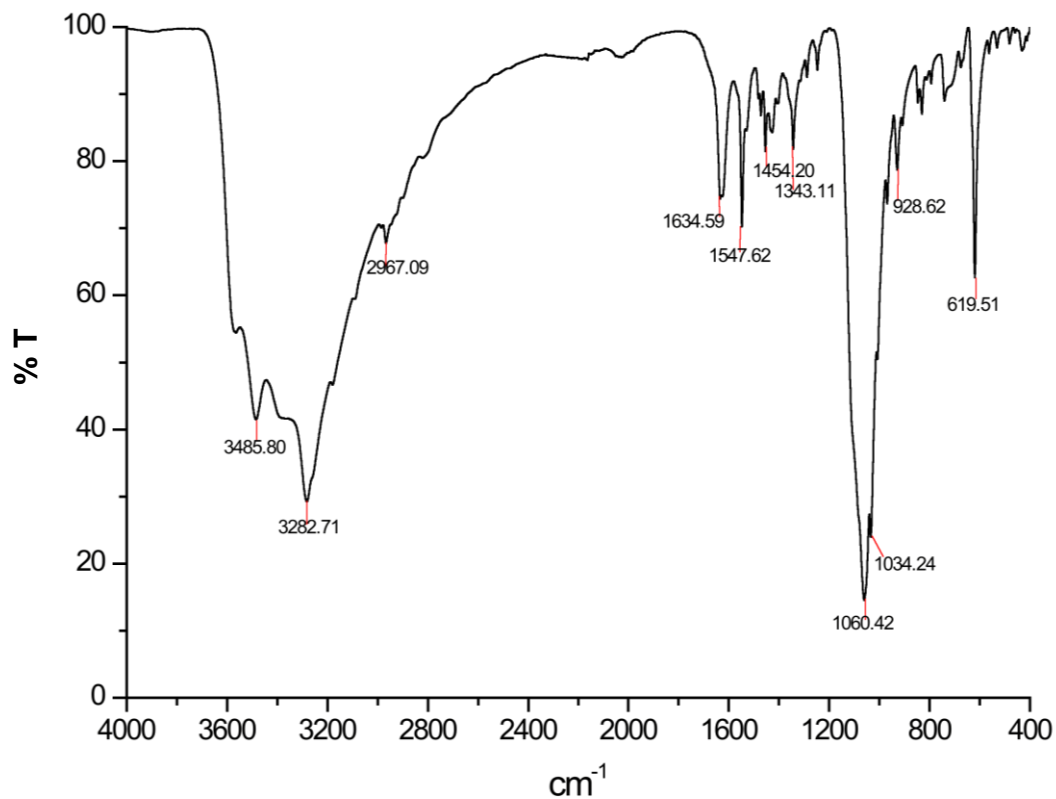


Figura 4.3. Espectro de infrarrojo de $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$ obtenido por reflectancia ATR

Tabla 4.5. Frecuencia de vibración de diferentes grupos funcionales en el compuesto $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$

Asignación	Número de onda (cm^{-1}) dihp	Número de onda (cm^{-1}) $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$
OH alcohol	3205	3486
NH imidazol	3122	3283
CH_3 imidazol	2955	no se ve
$\text{C}=\text{N}$ imidazol	1599	1634
ClO_4^- iónico	—	1060, 1034, 620

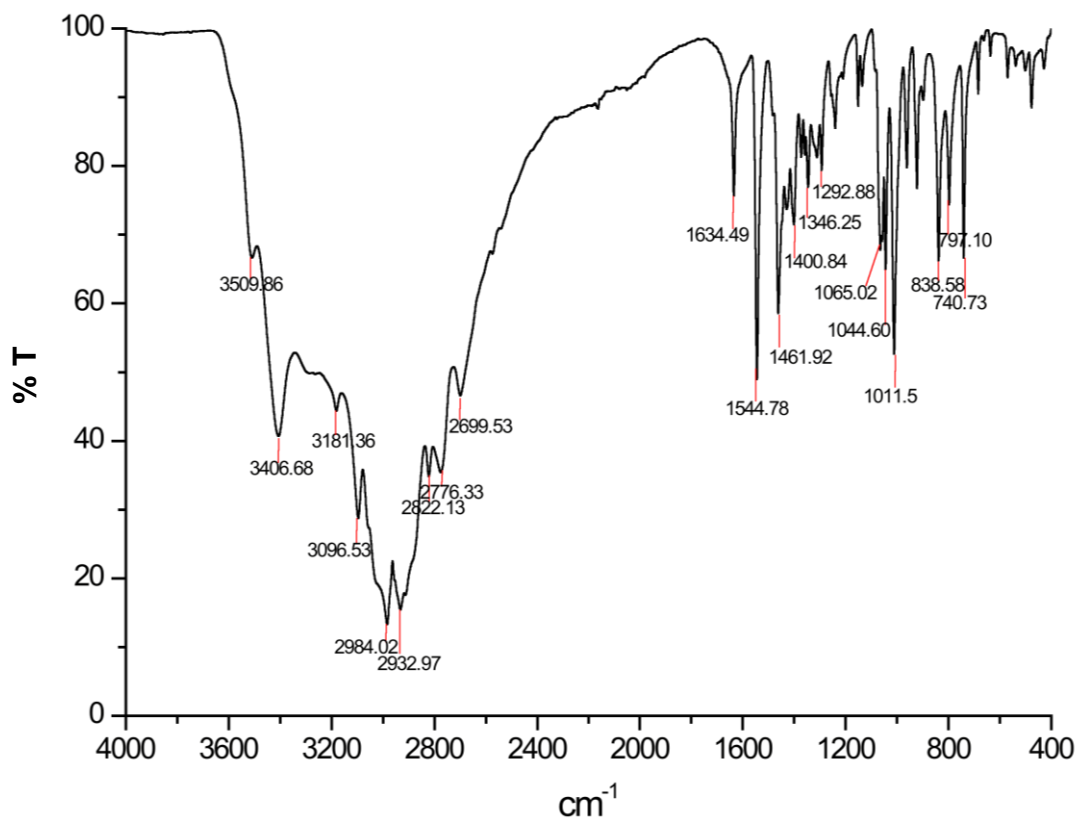


Figura 4.4. Espectro de infrarrojo de $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_4]$ obtenido por reflectancia ATR

Tabla 4.6. Frecuencia de vibración de diferentes grupos funcionales en el compuesto $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_4]$

Asignación	Número de onda (cm^{-1}) dihp	Número de onda (cm^{-1}) $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_4]$
OH alcohol	3205	3406
NH imidazol	3122	3181
CH_3 imidazol	2955	3097
C=N imidazol	1599	1634

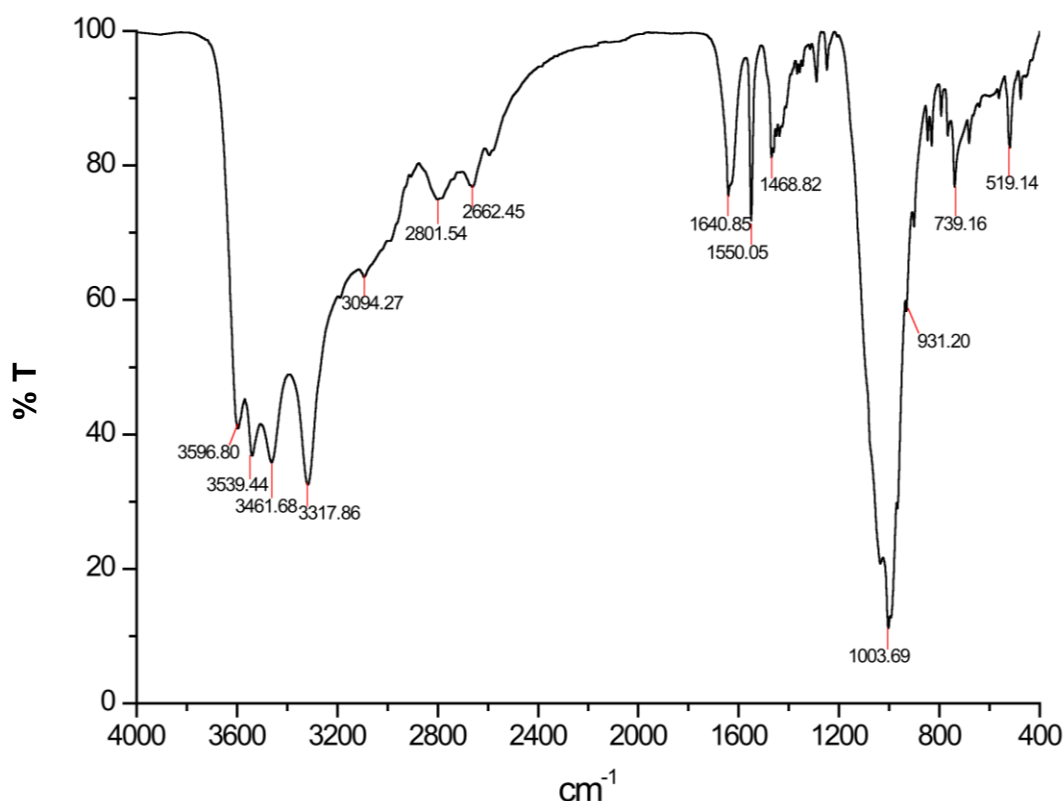


Figura 4.5. Espectro de infrarrojo de $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$ obtenido por reflectancia ATR

Tabla 4.7. Frecuencia de vibración de diferentes grupos funcionales en el compuesto $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$

Asignación	Número de onda (cm^{-1}) dihp	Número de onda (cm^{-1}) $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$
OH alcohol	3205	3540
NH imidazol	3122	3318
CH_3 imidazol	2955	no se ve
C=N imidazol	1599	1641
BF_4^- iónico	—	1004, 931, 740

Susceptibilidad magnética

Se determinó el momento magnético del compuesto dinuclear sintetizado a partir de CuCl_2 . El momento magnético de $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_4]$ es de 1.95 MB por átomo de cobre. Este valor corresponde al intervalo esperado (1.70-2.20 MB) para compuestos de Cu(II) [44].

Espectroscopía de UV-visible

El complejo dinuclear de cobre(II) sintetizado con percloratos se caracterizó con espectroscopía UV-vis. Se obtuvo el espectro del compuesto en disolución y en sólido por la técnica de reflectancia difusa. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 4.6.

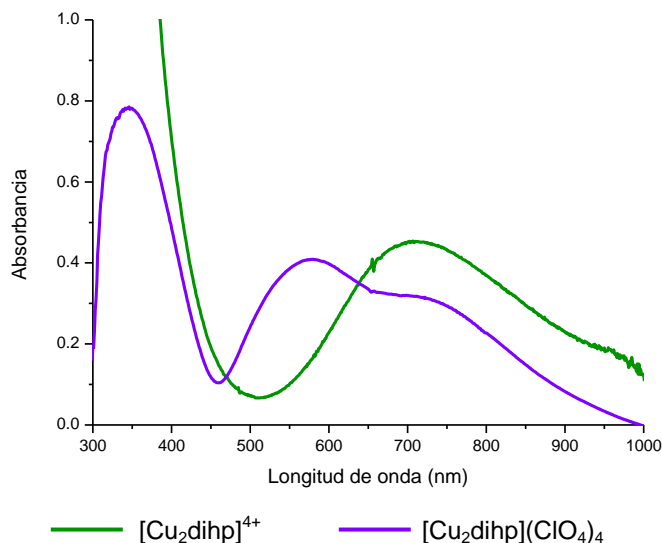


Figura 4.6. Espectro de UV-vis en disolución (en verde) y en estado sólido (en morado) del complejo con percloratos.

La interpretación de espectros electrónicos de compuestos de cobre(II) se ve dificultada porque éstos rara vez presentan una geometría regular por el efecto de Jahn-Teller. Las distorsiones en la geometría ocasionan una ruptura de la degeneración de los orbitales y, por lo tanto, el número de transiciones posibles aumenta. En general, se observa una sola señal de absorción ancha y sesgada, debida a la suma de señales no resueltas, provenientes de las tres transiciones posibles [52, 53].

Esto es justo lo que se observa para el complejo [Cu₂dihp] en disolución. El espectro muestra una banda de absorción cuyo máximo se encuentra aproximadamente en 710 nm. Esta absorción corresponde a las transiciones d-d

del cobre(II) [44]. En disolución, la distorsión tetragonal en la geometría del complejo no es tan marcada.

En estado sólido es posible observar tres máximos de absorción. El primero, en 340 nm, se puede atribuir a transferencias de carga del metal al ligante. Los otros dos, en 580 y 740 nm, son debidos a transiciones d-d. En este caso, la distorsión tetragonal es más notable. La presencia de más de una señal indica que la distorsión debida al efecto de Jahn-Teller es suficientemente importante para lograr separar las dos señales.

Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación con compuestos dinucleares de Cu(II) con ligantes análogos [8, 9, 18], los espectros de RPE presentan evidencia de que, a pesar de la gran distancia entre los iones de Cu(II), éstos están acoplados magnéticamente. Con estos antecedentes, se quiso determinar el comportamiento magnético del compuesto estudiado. Se obtuvo el espectro en disolución 5 mM del compuesto con percloratos, $[\text{Cu}_2\text{dihp}](\text{ClO}_4)_4$ en metanol a 77 K. También se obtuvo el espectro de la muestra sólida. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 4.7.

De forma general, los compuestos de cobre(II) presentan una estructura hiperfina debida a la interacción entre el momento magnético del electrón desapareado y el momento magnético de este núcleo, cuyo espín es diferente de cero ($I = 3/2$). La interacción de un electrón desapareado con un núcleo de Cu(II) resulta en un desdoblamiento de la señal en cuatro componentes de misma intensidad. Si el electrón interactúa con dos núcleos equivalentes, la señal se divide en siete componentes con una relación de intensidades de 1:2:3:4:3:2:1 [54].

El espectro de RPE de este compuesto en disolución no corresponde a ninguno de estos casos: parece ser una superposición de un desdoblamiento hiperfino en

siete señales y un desdoblamiento en cuatro señales. Esto indica la presencia de dos tipos de electrones desapareados: uno que interactúa con un solo núcleo de Cu(II) y otro que interactúa con dos núcleos. Es decir, en esta disolución, existen dos especies diferentes [54, 55].

Como se verá más adelante, la constante de formación del complejo dinuclear en disolución es muy baja comparada con las constantes de formación con ligantes análogos. Esto hace pensar que puede ser posible que la otra especie presente en disolución sea Cu(II) solvatado. También podría ser que el tercer átomo donador del ligante, de la función alcohol, no esté coordinado en todos los casos. Esto también generaría una especie con un entorno magnético diferente.

El espectro de la muestra en sólido es un espectro axial (es decir, $g_{//} > g_{\infty} > g_{\perp}$). El número de señales sugiere que todos los núcleos de Cu(II) tienen el mismo entorno y son equivalentes. Cada Cu(II) tiene un ambiente tetragonal [55].

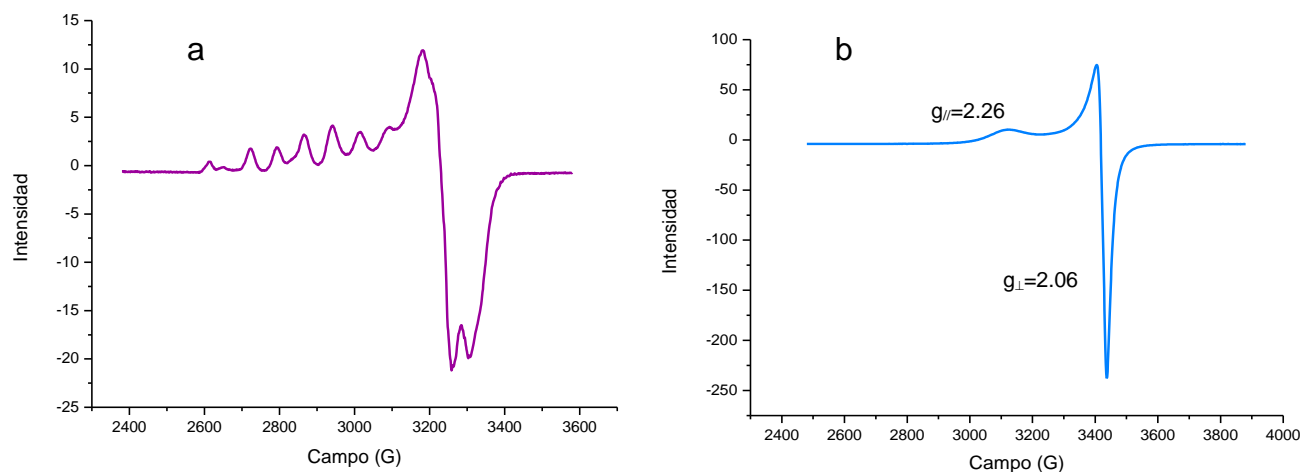


Figura 4.7. Espectros de RPE. En (a) se muestra el espectro a 77 K de una disolución del complejo formado *in situ* a partir del ligante dihp y de una disolución valorada de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, de concentración 5 mM. En (b), el espectro de la muestra sólida a temperatura ambiente.

3. Difracción de Rayos X

3.1. Estructura cristalina del ligante dihp

En la figura 4.8 se muestra la estructura obtenida por medio de la difracción de rayos X de un monocristal del ligante dihp. Se presenta una molécula y la celda unitaria del sistema cristalino. Ésta pertenece al grupo espacial $P2_1/n$ (sistema monoclinico) y comprende dos unidades de ligante por celda ($Z=2$). Adicionalmente, contiene dos aniones BF_4^- por molécula de ligante, lo que indica que éste se encuentra en su estado protonado. La molécula del ligante es centrosimétrica por lo que únicamente la mitad de los átomos se ha etiquetado.

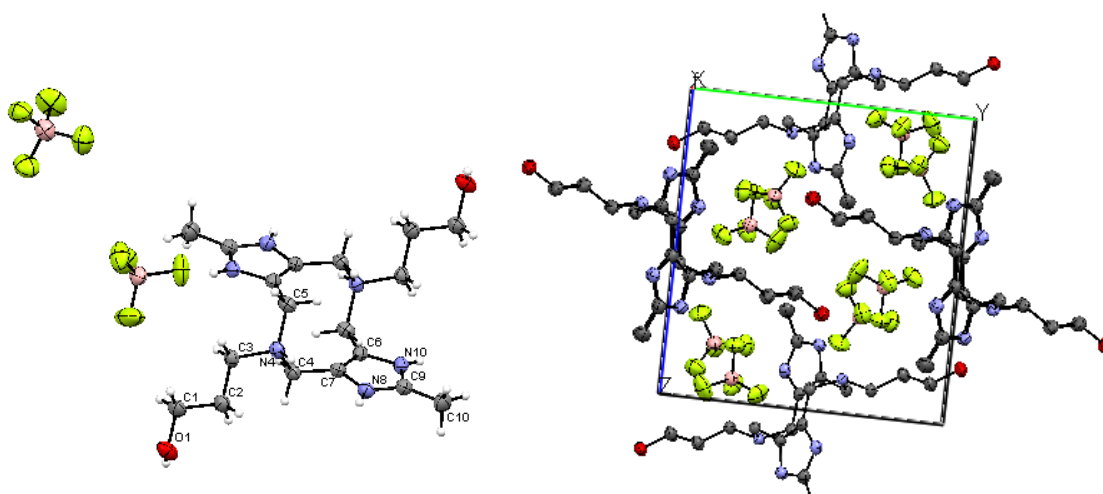


Figura 4.8. Estructura del ligante protonado, $H_2dihp(BF_4)_2$. Se muestra la unidad asimétrica y una celda unitaria.

Es interesante señalar que la diazecina (el ciclo de 10 miembros) se encuentra en una conformación de silla por lo que los dos anillos de imidazol se encuentran en planos diferentes. En la celda, hay dos orientaciones de las moléculas del ligante que parecen estar definidas gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los nitrógenos de la diazecina (N4) y los protones de los alcoholes (hidrógenos unidos a O1) (fig. 4.9). La tabla 4.8 muestra algunos ángulos y distancias seleccionados.

Tabla 4.8. Distancias atómicas y ángulos seleccionados en la estructura cristalina de dihp.

Distancias atómicas (Å)					
O1 – C1	1.430(3)	N4 – C5	1.520(3)	C6 – C7	1.360(3)
C1 – C2	1.505(4)	C4 – C7	1.478(3)	C6 – C5	1.489(3)
C2 – C3	1.519(3)	C9 – N8	1.329(3)	C7 – N8	1.385(3)
C3 – N4	1.514(3)	C9 – N10	1.329(3)	C6 – N10	1.382(3)
N4 – C4	1.507(3)	C9 – C10	1.473(4)		
Ángulos (°)					
C4 – N4 – C5	113.96(18)	C7 – N8 – C9	110.5(2)		
N4 – C4 – C7	114.51(19)	C6 – N10 – C9	110.4(2)		
C4 – C7 – C6	130.2(2)	N8 – C9 – N10	126.1(2)		
C7 – C6 – C5	129.7(2)				

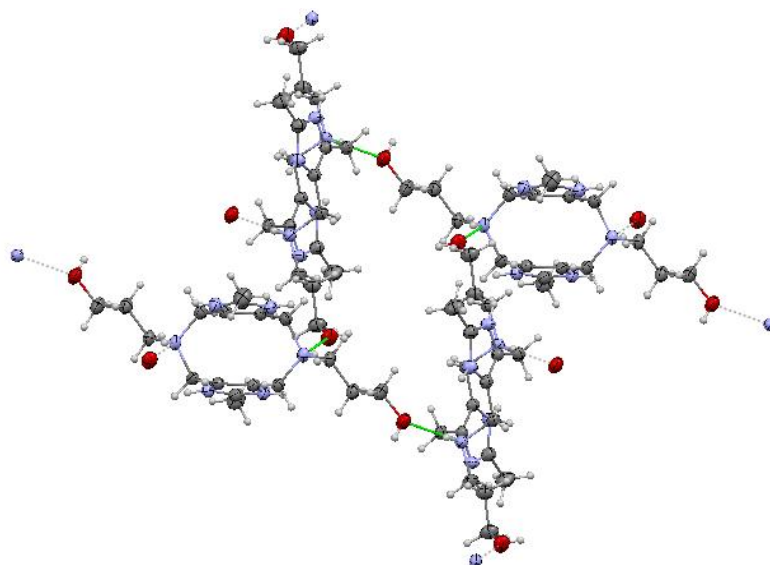


Figura 4.9. Enlaces de hidrógeno que se forman en la estructura cristalina de dihp.

3.2. Estructura del complejo dinuclear $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$

El compuesto cristalizó con una celda unitaria del grupo espacial P-1 (sistema triclínico). La celda unitaria consiste en el catión $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$, cuatro aniones BF_4^- y dos moléculas de agua sin coordinar. La presencia de dos aniones por cada $\text{Cu}(\text{II})$ indica que el alcohol a pesar de estar coordinado no se ha desprotonado. La estructura obtenida se muestra en la figura 4.10. No se muestran los aniones por claridad. En la tabla 4.9 se proporcionan algunas longitudes y ángulos seleccionados.

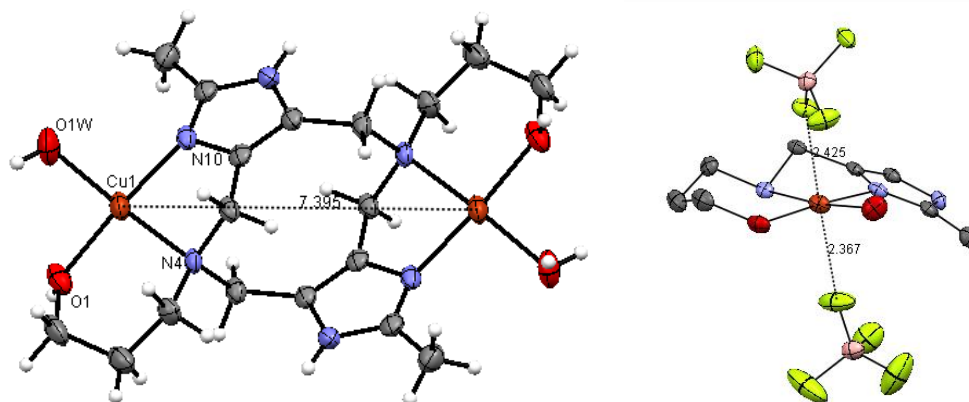


Figura 4.10. Estructura obtenida mediante difracción de rayos X del catión $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2]$. Derecha: entorno de coordinación de un ion de cobre(II) en el cristal.

Se trata de un compuesto centrosimétrico en el cual los dos sitios de coordinación son equivalentes. La esfera de coordinación presenta una geometría cuadrada alrededor del Cu(II) y está compuesta por los tres átomos donadores del ligante (N4 de la diazecina, N10 del imidazol, O1 del alcohol) y una molécula de agua (O1W) completa la esfera de coordinación. Existe una interacción axial débil con los fluoruros de los tetrafluoroboratos. Las distancias Cu-F son de 2.42 y 2.37 Å (fig. 4.10, a la derecha). La distancia entre los dos átomos de cobre es de 7.395 Å.

Tabla 4.9. Distancias atómicas y ángulos seleccionados en la estructura cristalina del $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$.

Distancias atómicas (Å)					
Cu1 – N4	2.088(3)	Cu1 – Ow		2.027(3)	
Cu1 – N10	1.966(3)	Cu1 – F1		2.367(2)	
Cu1 – O1	1.946(2)	Cu1 – F5		2.425	
		Cu1 – Cu2		7.395	
Ángulos (°)					
N4 – Cu1 – O1	93.11(10)	N4 – Cu1 – O1W	173.56(11)	O1 – C1 – F1	84.22(10)
N4 – Cu1 – N10	83.90(10)	O1 – Cu1 – N10	174.18(11)	N10 – Cu1 – F1	91.70(10)
N10 – Cu1 – O1W	93.72(11)			O1W – Cu1 – F1	81.21(12)
O1 – Cu1 – O1W	89.76(11)			N4 – Cu1 – F1	104.80(11)

Las distancias de enlace no son iguales para los cuatro átomos donadores y los ángulos son más pequeños que los 90° que uno esperaría. Se trata por lo tanto de un cuadrado distorsionado. Otro punto que cabe señalar es que los dos iones de cobre(II) no se encuentran en el mismo plano.

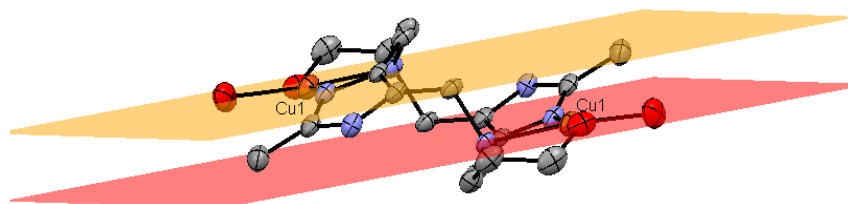


Figura 4.11. Planos en los que se inscriben los planos formados por los átomos donadores alrededor de los iones Cu(II).

4. Estudios en disolución: especiación del sistema

Cuando se trabaja en disolución, el disolvente se encuentra en un gran exceso. Puesto que el agua es una base de Lewis, también puede funcionar como ligante. Por lo tanto, se pueden presentar diferencias en la esfera de coordinación del Cu(II) entre el estado sólido o la disolución del mismo compuesto [44]. Por esto, los estudios de caracterización que se presentaron anteriormente aportan información limitada acerca de las especies presentes en disolución.

Además de la presencia del exceso de disolvente, existe otro factor que también puede generar cambios en la estructura del compuesto: el pH [34-38]. En el caso particular del $[\text{Cu}_2\text{dihp}]$, los cambios en la esfera de coordinación asociados a la variación de pH son muy notables pues se ven reflejados inclusive en los cambios en el color de la disolución.

La determinación de la especiación de un compuesto cobra importancia al considerar su evaluación catalítica ya que su capacidad para catalizar una reacción depende de los ligantes en su esfera de coordinación. Es decir, la actividad catecolasa, en este caso, es sumamente dependiente del pH pues no todas las especies son catalíticamente activas [12].

Como ya se mencionó, el estudio en disolución se realizó por medio de titulaciones potenciométricas y los datos experimentales obtenidos se analizaron y refinaron con el programa Hyperquad 2003 [46, 47]. Una vez evaluadas las constantes de formación de las diferentes especies presentes en disolución se calcularon los diagramas de distribución de especies en función del pH utilizando el programa MEDUSA [48].

En los seres vivos, el disolvente más importante es el agua. Por lo tanto, dentro del marco de la química bioinorgánica y en analogía con estos sistemas, el estudio de la especiación se realizó en agua. Adicionalmente, también se llevó a cabo en la mezcla MeOH:H₂O (1:1 v/v) en virtud de que es el disolvente empleado para la evaluación catalítica en nuestro grupo de investigación.

4.1. Determinación de las constantes de acidez del ligante

Para poder establecer el modelo de la especiación de un complejo, el primer paso del estudio es determinar los valores de pK_a del ligante, en este caso, dihp. Éste tiene cuatro sitios que se pueden protonar: los dos nitrógenos de la diazecina y los dos de los imidazoles (ver figura 4.12). Por lo tanto, se agregaron cinco equivalentes de ácido fuerte (uno por cada sitio básico y uno en exceso) para titular al ligante en su forma completamente protonada.

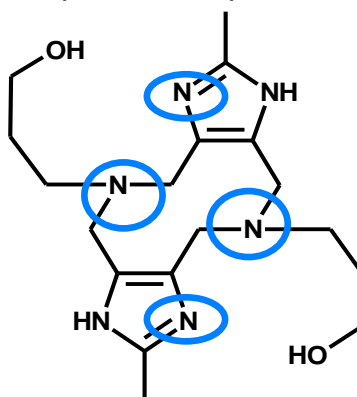


Figura 4.12. Sitios básicos del ligante dihp.

Además de titular al ligante totalmente protonado, en cada medio, se tituló una disolución 5 mM de ácido fuerte. Esta titulación sirvió como referencia, ya que esta concentración de ácido corresponde a los cinco equivalentes que se agregaron al ligante. En la figura 4.13 se muestran las curvas de titulación obtenidas. En verde se muestran las del ligante y en morado las del ácido fuerte utilizado.

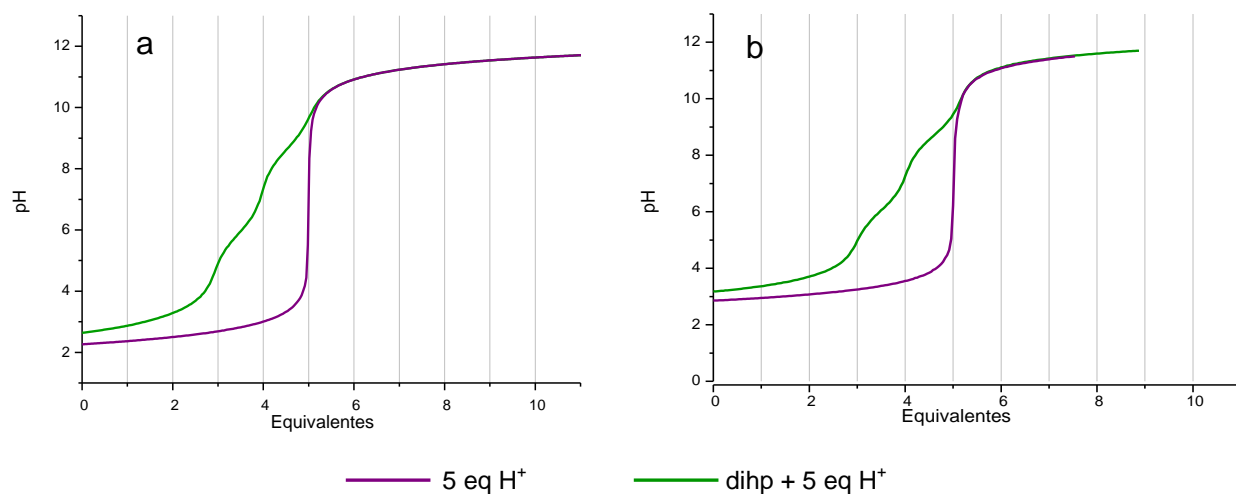


Figura 4.13. Curvas de titulación del ligante y de una disolución de 5 equivalentes de ácido fuerte en agua (a) y en la mezcla MeOH:H₂O (b).

En ambos medios, la forma de las curvas de titulación del ligante es muy similar, lo que indica que su comportamiento cambia poco al cambiar el medio. Al comparar la curva del ligante más el ácido con la curva del ácido, en cualquiera de los dos medios, es posible observar que ambas curvas son diferentes al principio de la titulación. Esto se debe a que los protones se encuentran unidos al ligante y no están libres, como ocurre en el caso en la disolución de ácido fuerte. Esto no resulta sorprendente en vista de que el ligante dihp no es soluble en agua ni en MeOH:H₂O y la adición del ácido es necesaria para disolverlo.

A partir del punto de equivalencia de la titulación del ácido, ambas curvas se superponen. Esto quiere decir que no se titularon más protones ácidos de los que se agregaron: ni los imidazoles ni los alcoholes presentes en el ligante se desprotonaron en el transcurso de la titulación. En realidad, puesto que los valores

de pK_a de estos grupos normalmente son mayores que 14 en medio acuoso o en la mezcla [41], no se esperaba poder determinarlos.

Para la disolución acuosa, el refinamiento en Hyperquad 2003 proporcionó únicamente tres constantes de acidez en lugar de las cuatro que se esperaban (ver tabla 4.9). Eso quiere decir que la cuarta protonación no se lleva a cabo: el primer pK_a obtenido no es suficientemente grande como para considerar que se trata de una doble desprotonación y el refinamiento del modelo que considera la desprotonación de H_4dihp a H_2dihp en Hyperquad no converge, de acuerdo a los parámetros estadísticos asociados. La ausencia del cuarto pK_a podría deberse a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que impide que el ligante acepte al cuarto protón.

En $MeOH:H_2O$, la situación es diferente. El mejor modelo se obtiene considerando que el primer pK_a involucra una doble desprotonación de H_4dihp a H_2dihp . Esta suposición parece razonable al comparar los valores numéricos de la primera constante en ambos medios (tabla 4.10): es posible observar que el primer pK_a en la mezcla es casi el doble que el primer pK_a en agua. Por lo tanto, la constante en $MeOH:H_2O$ sí engloba la salida de dos protones.

Tabla 4.10. Valores de pK_a obtenidos para el ligante dihp.

Par involucrado	pK_a en H_2O	pK_a en $MeOH:H_2O$	Asignación
$H_4dihp^{4+} / H_2dihp^{2+}$	–	5.87 ± 0.09	Imidazol
$H_3dihp^{3+} / H_2dihp^{2+}$	3.07 ± 0.02	–	Imidazol
$H_2dihp^{2+} / Hdihp^+$	5.91 ± 0.02	6.40 ± 0.03	Diazecina
$Hdihp^+ / dihp$	8.59 ± 0.02	8.79 ± 0.02	Diazecina

A partir de estas constantes, se graficaron los diagrama de distribución de especies del ligante en cada uno de los medios, utilizando el programa MEDUSA. Estos se muestran en la figura 4.14 a.

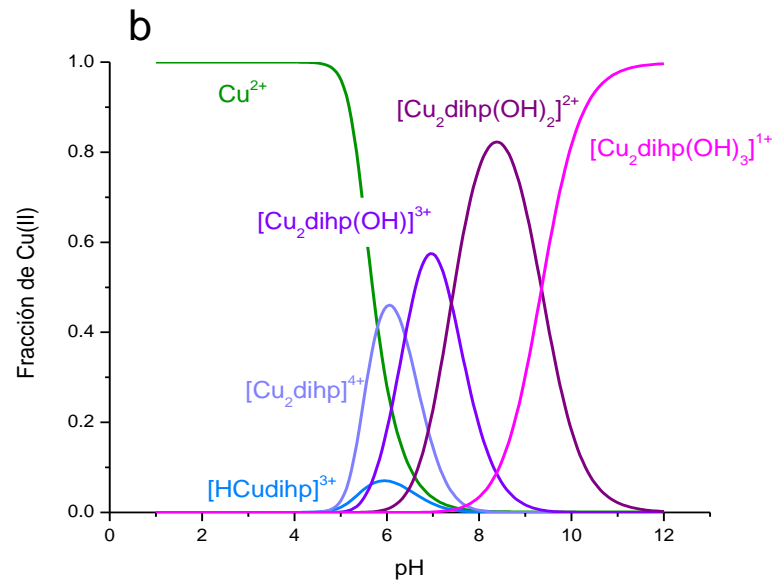
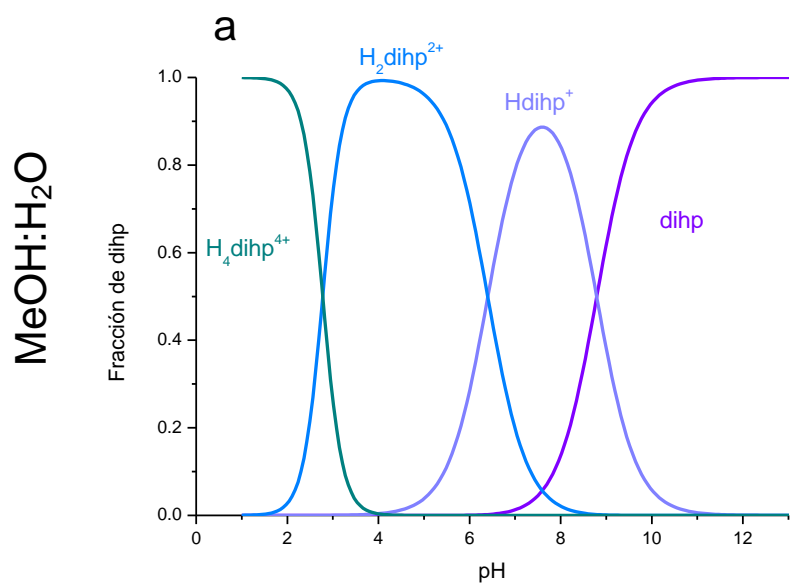
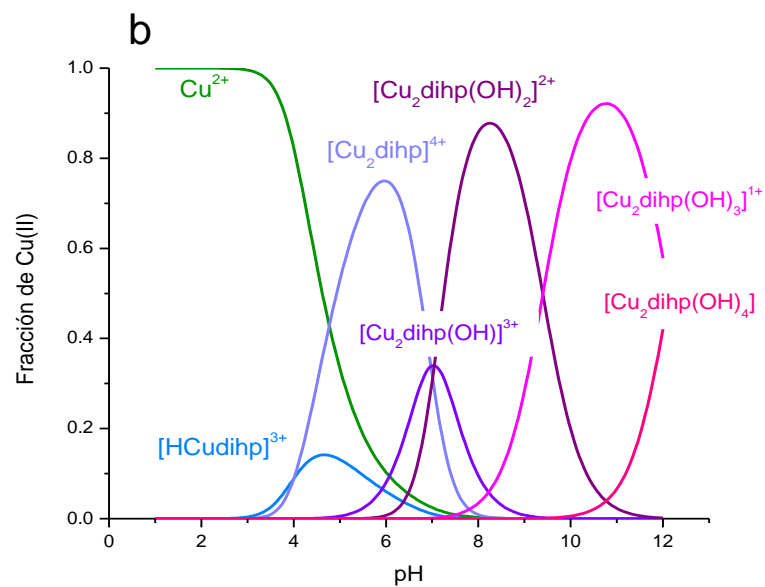
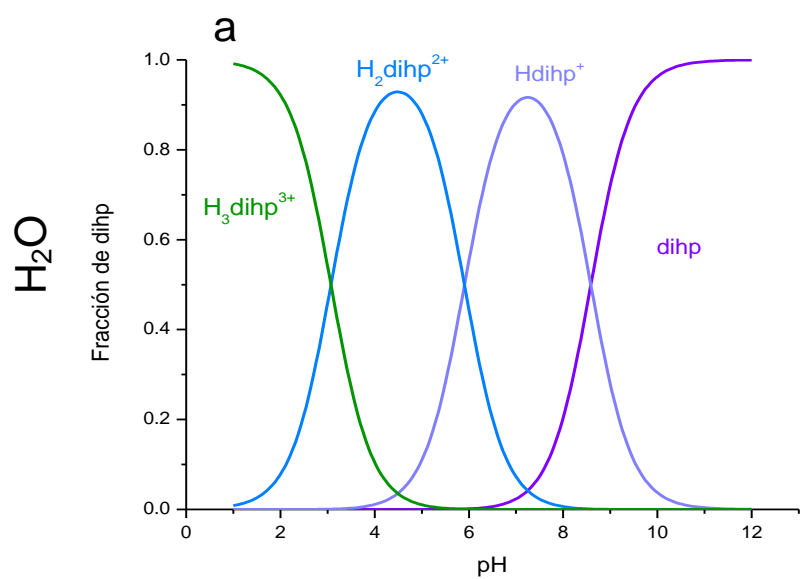


Figura 4.14. Diagramas de distribución obtenidos con el programa MEDUSA para el ligante dihp (a) y el sistema Cu(II) + dihp (b), en los dos medios estudiados.

4.2. Determinación de las constantes de equilibrio del complejo de Cu(II)

Para efectuar la determinación de constantes de formación y de hidrólisis se llevó a cabo la titulación del ligante con cinco equivalentes de ácido (justo como en el caso anterior), en presencia de dos equivalentes de Cu(II).

El comportamiento del complejo en ambos medios es similar pero no igual. En particular, en la mezcla MeOH:H₂O, el complejo empieza a precipitar alrededor de pH \approx 11.0 y es de color verde. En cambio, en agua la precipitación empieza alrededor de pH \approx 11.3 y el color de la disolución al final de la titulación es azul.

En la figura 4.15 se muestran las curvas de titulación obtenidas en ambos medios, junto con las curvas mostradas en la sección anterior para facilitar la comparación.

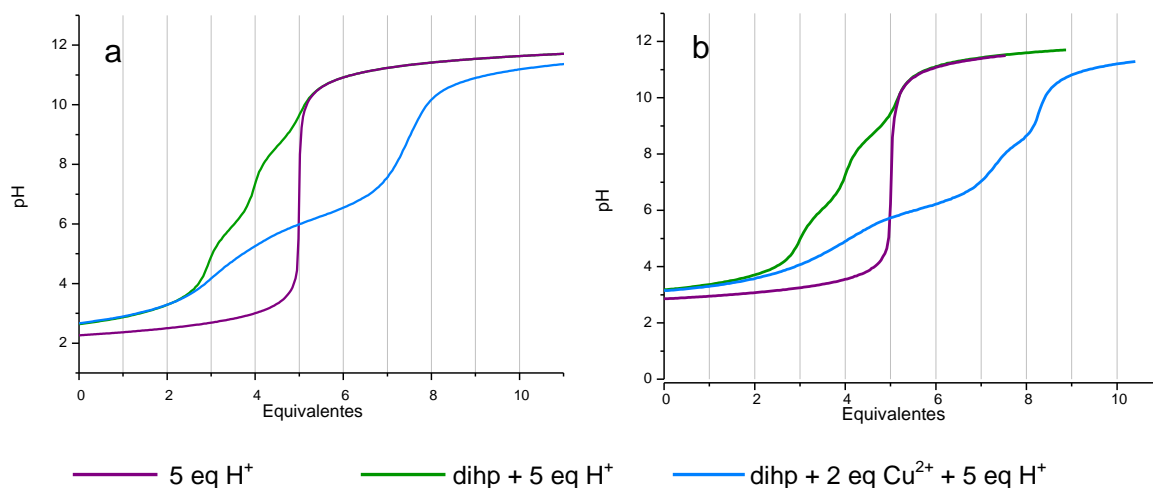


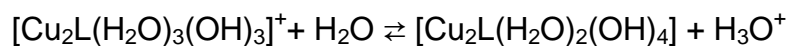
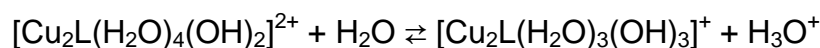
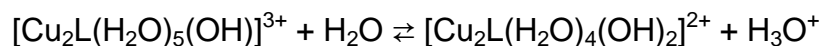
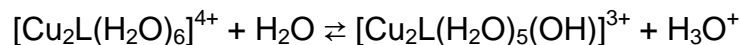
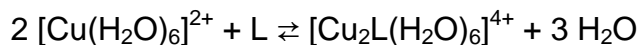
Figura 4.15. Curvas de titulación del ligante y del ligante en presencia de 2 equivalentes de Cu(II) obtenidas en disolución acuosa (a) y en la mezcla (b).

En ambos medios, podemos notar que la forma de las curvas de titulación del ligante en ausencia y en presencia del cobre es muy distinta. Cabe señalar que en medio ácido, el complejo no se forma apreciablemente. Esta afirmación se hace considerando que al agregar los dos equivalentes de cobre, la disolución no se torna verde sino es azul muy claro (esencialmente del mismo color que una disolución de Cu(II) acuoso), y el cambio al color verde se observa hasta que la disolución adquiere un valor de pH de alrededor de 4.5.

Las curvas de titulación corroboran esta observación: la primera parte de la curva de la titulación del ligante es igual independientemente de la presencia o ausencia del Cu(II). Esto quiere decir que los iones metálicos no han desplazado a los protones de los sitios básicos del ligante.

Otro hecho importante es que, en el caso de la titulación en presencia de Cu(II), no se alcanzó el pH final de ≈ 11.8 después de agregar cinco equivalentes de OH^- sino que se requirieron aproximadamente cuatro equivalentes adicionales del titulante para alcanzar este valor de pH. La presencia del Cu(II) coordinado permitió la salida de los protones adicionales. Pudiera tratarse de protones provenientes del ligante o de moléculas de agua coordinadas al Cu(II). Ni el experimento ni el modelo obtenido con el programa Hyperquad 2003 permiten hacer esta asignación. Sin embargo, los valores de pK_a reportados para alcoholes (en ausencia de algún metal) son generalmente más altos que el pK_a del agua. Lo mismo sucede para el protón del imidazol [41]. Por lo tanto, es plausible suponer que los equilibrios que se observan corresponden a equilibrios de hidrólisis de las moléculas de agua coordinadas al metal.

Con base en lo expuesto, se considera que los equilibrios que se llevan a cabo en disolución al variar el pH son los siguientes:



En la tabla 4.11 se muestran las constantes de formación y de hidrólisis del complejo que se obtuvieron del análisis con el programa Hyperquad 2003. Las constantes de formación globales, β , se definen en función del equilibrio general:

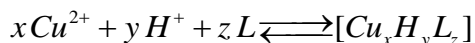


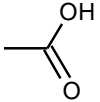
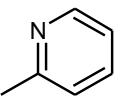
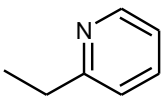
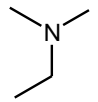
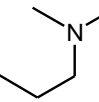
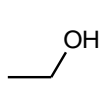
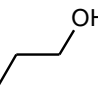
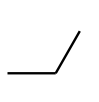
Tabla 4.11. Constantes de formación y de hidrólisis del complejo en agua y en MeOH:H₂O obtenidas a partir del refinamiento con el programa Hyperquad 2003, L denota la forma neutra del ligante.

$\log \beta_{xyz} = \frac{[Cu_x H_y L_z]}{[Cu^{2+}]^x [H^+]^y [L]^z}$		$K_a^{(i)} = \frac{[Cu_2 L(H_2O)_{6-i}(OH)_i][H_3O^+]}{[Cu_2 L(H_2O)_{6-i+1}(OH)_{i-1}]}$	
H ₂ O		MeOH:H ₂ O	
log $\beta_{111} = 12.24 \pm 0.05$		log $\beta_{111} = 12.98 \pm 0.04$	
log $\beta_{201} = 9.91 \pm 0.03$		log $\beta_{201} = 9.93 \pm 0.09$	
log $\beta_{2-11} = -3.75 \pm 0.05$	pK _a ⁽¹⁾ = 6.16	log $\beta_{2-11} = 4.34 \pm 0.03$	pK _a ⁽¹⁾ = 5.59
log $\beta_{2-21} = -2.72 \pm 0.02$	pK _a ⁽²⁾ = 6.47	log $\beta_{2-21} = -2.47 \pm 0.03$	pK _a ⁽²⁾ = 6.81
log $\beta_{2-31} = -11.77 \pm 0.04$	pK _a ⁽³⁾ = 9.05	log $\beta_{2-31} = -11.47 \pm 0.04$	pK _a ⁽³⁾ = 9.00
log $\beta_{2-41} = -23.79 \pm 0.04$	pK _a ⁽⁴⁾ = 12.02		

Con estos valores, se obtuvieron los diagramas de distribución de especies mostrados en la figura 4.14 b. En ambos disolventes, el comportamiento del complejo es semejante, con la diferencia de que en disolución acuosa hay una hidrólisis suplementaria que explica el cambio de color adicional.

Una particularidad de este sistema es la constante de formación del complejo dinuclear: en ambos medios la constante log β_{201} es baja. De hecho, si se hace la comparación con ligantes análogos en los que varía la cadena lateral R (ver tabla 4.12), el valor de esta constante está muy por debajo del valor de β_{201} de un ligante tridentado y se parece mucho más al valor obtenido para el ligante promeim en el cual sólo hay dos átomos donadores. Esto hace pensar que en disolución el grupo hidroxilo del ligante no podría no estar coordinado en todas las moléculas del complejo, a pesar de que la estructura de rayos X muestre que sí.

Tabla 4.12. Valores de $\log \beta_{201}$ para compuestos análogos en nuestro grupo de trabajo

ligante	glimeim [21]	dimp [27]	diep [2]	dimeim [24]	dmpa [9]	dihe [8]	dihp	promeim [22]
grupo donador								
$\log \beta$	18.97	18.63	19.07	20.75	14.24	10.82	9.91	9.68

5. Evaluación catalítica

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, complejos dinucleares de Cu(II) con ligantes análogos a dihp han mostrado tener actividad catecolasa [8, 9, 18, 21, 23, 24, 26, 27, 41]. Por lo tanto, se hizo la evaluación catalítica del complejo formado con éste último con el fin de estimar su actividad como catalizador y relacionarla con el efecto de cambiar el entorno de coordinación de los iones Cu(II). Existen dos factores que distinguen a dihp de sus análogos: la presencia de un átomo donador por oxígeno y la formación de un anillo quelato de seis miembros en vez de uno de cinco.

Como se mencionó en la sección experimental, se utilizó la reacción modelo de oxidación del DTBC a la DTBQ para evaluar la actividad catecolasa del complejo [Cu₂dihp]. El experimento se realizó en la mezcla MeOH:H₂O pues ni el sustrato ni el producto son solubles en agua.

Hay tres factores que influyen en la velocidad de la reacción de oxidación: la concentración del catalizador, la concentración del sustrato y la concentración del O₂ disuelto en el medio. Adicionalmente, al trabajar en medio acuoso, también habría que incluir al pH en esta lista pues induce cambios en la esfera de coordinación del complejo.

Se hicieron una serie de experimentos para evaluar el efecto de cada una de estas variables en la actividad catalítica del complejo $[\text{Cu}_2\text{dihp}]$, con una única excepción: la concentración del O_2 . Simplemente se trabajó en un sistema abierto para que la presión fuera constante y por lo tanto, la cantidad de O_2 disuelta también permaneciera constante.

5.1. Modelo de Michaelis-Menten

Es posible obtener información acerca del mecanismo de una reacción a partir de su comportamiento cinético. En particular, se estudian los cambios en la velocidad de reacción asociados a cambios en los parámetros experimentales. Existen varios modelos que intentan describir el comportamiento cinético de las reacciones enzimáticas y, en general, parten de la formación del complejo enzima-sustrato como paso fundamental.

Uno de los modelos matemáticos más utilizados, que puede describir el comportamiento cinético de un gran número de enzimas, es el de Michaelis-Menten. Como se espera que los compuestos modelo tengan un comportamiento similar a la enzima que imitan, es muy común que este modelo se utilice también para evaluar la actividad catalítica de los primeros.

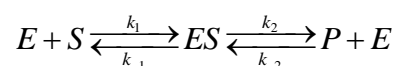
En trabajos previos en nuestro grupo de investigación [8, 9, 18, 21, 23, 24, 26, 27, 41] se ha observado que la reacción de oxidación del DTBC catalizada por nuestros compuestos sigue una cinética saturación que se ha ajustado con el modelo de Michaelis-Menten, para efectos de comparación. Se espera que éste también sea el caso de la reacción catalizada por el compuesto $[\text{Cu}_2\text{dihp}]$. Por lo tanto, a continuación se proporciona un resumen del desarrollo de este modelo y de las consideraciones que hace [3, 56].

Como se ha mencionado, este modelo es comúnmente utilizado para catalizadores que no son enzimas por lo cual, aunque se desarrolló originalmente para ellas, más bien se hablará en forma general de catalizador.

Muchas veces, y en particular cuando se utilizan enzimas como catalizadores, es común evaluar la velocidad de reacción cerca del tiempo inicial. Medir la velocidad inicial (V_0) permite minimizar las reacciones reversibles que pudiera haber y evita que se pudiera presentar algún tipo de inhibición debida a la presencia los productos (P) formados. Otra razón para evaluar la velocidad inicial es que, al principio de la reacción, los cambios en la magnitud de la concentración del sustrato (S) se pueden ignorar puesto que se encuentra en concentraciones que son 5 ó 6 órdenes de magnitud mayores que las de la enzima (E) [3, 56].

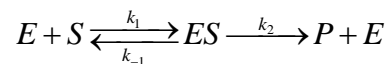
Las reacciones catalizadas por enzimas no siguen una ley de velocidad simple. En muchos casos, la velocidad inicial V_0 muestra una dependencia hiperbólica con la concentración de S. Si se obtiene una gráfica de la rapidez inicial en función de [S], se puede observar que en la parte inicial, a bajas concentraciones de sustrato, la rapidez aumenta rápidamente y de forma lineal con [S]. A altas concentraciones, el aumento en la rapidez es mucho menor y la rapidez se nivela a un valor límite [56].

La clave para entender este comportamiento es la formación de un complejo enzima-sustrato (ES) (o catalizador-sustrato). Michaelis y Menten, en particular, expandieron la idea de que la formación del complejo ES es un paso necesario para la catálisis enzimática, en la teoría general de acción enzimática. Postularon un mecanismo en el cual la formación del complejo ES es un primer paso rápido y reversible. En un segundo paso, determinante de la velocidad de reacción, el complejo se rompe para liberar el producto y regenerar el catalizador [3]. Este mecanismo se puede presentar con el esquema siguiente:



El modelo propuesto por Michaelis y Menten fue modificado posteriormente por Briggs y Haldane quienes indicaron que no se necesita suponer que el catalizador E y el sustrato S están en equilibrio con el complejo catalizador-sustrato ES. En cambio, la reacción pronto alcanza un estado estacionario en el cual la concentración de cualquier intermediario, en este caso el complejo ES, se mantiene aproximadamente constante en el transcurso de la reacción [3, 56].

A continuación se muestra un desarrollo algebraico del modelo. Al principio de la reacción, la concentración de productos es suficientemente pequeña como para poder despreciarla e ignorar la reacción $P \rightarrow S$ cuya constante es k_2 . Esta suposición no es crítica pero facilita el desarrollo. El esquema de la reacción es por lo tanto:



La velocidad de reacción es:

$$V_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_2[ES]$$

La hipótesis del estado estacionario implica que la velocidad de formación del complejo ES es la misma que la velocidad a la cual se rompe para liberar al producto, es decir:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

Determinar la concentración del catalizador en el transcurso de la reacción no es muy fácil, por lo tanto, es posible expresarla en función de su concentración inicial (que es la concentración total):

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

Además, puesto que [S] es mucho más grande que [E]₀, la cantidad de sustrato unida al catalizador es despreciable comparado con la cantidad total de [S] en un tiempo dado. Por lo tanto:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_0 - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

Al despejar [ES] se obtiene:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

Es decir:

$$\begin{aligned} V_0 &= \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} \\ &= \frac{k_2 [E]_0 [S]}{(k_{-1} + k_2) / k_1 + [S]} \end{aligned}$$

Si se define la constante de Michaelis como $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, la velocidad inicial es

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]}$$

Esta ecuación explica el comportamiento de la gráfica de la variación de la rapidez inicial en función de [S]. A bajas concentraciones de S, el término [S] es mucho menor que K_M por lo que la ecuación se simplifica a:

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_0}{K_M} [S]$$

que se podría expresar como una reacción de primer orden respecto a S ($V_0 = k_{obs}[S]$). A altas concentraciones, cuando la velocidad se nivela a un valor límite, el término [S] es mayor que K_M por lo que la ley de rapidez es:

$$V_0 = k_2 [E]_0 \frac{[S]}{[S]} = k_2 [E]_0.$$

En este momento de la reacción, el catalizador se encuentra totalmente saturado: todas las moléculas están ocupadas formando un complejo ES, por lo que la velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato. Como

todas las moléculas de catalizador están ocupadas, en forma de ES, la velocidad inicial alcanza su valor máximo, $V_{\text{máx}}$, por lo que: $V_{\text{máx}} = k_2[E]_0$

De forma general, v_0 se puede expresar como:

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_M + [S]}$$

Ésta última es la ecuación de Michaelis-Menten y describe el comportamiento cinético de muchas enzimas (o compuestos biomiméticos) que catalizan reacciones con un solo sustrato. Se dice que las enzimas que muestran una dependencia hiperbólica de V_0 respecto a $[S]$ siguen una cinética de Michaelis-Menten [3].

En este punto, es importante hacer una distinción. El hecho de que un catalizador muestre un comportamiento análogo no implica que siga el mecanismo cinético de dos pasos a partir del cual se hizo la deducción de la ecuación. En realidad, ésta no depende del mecanismo en dos pasos propuesto por Michaelis y Menten. Hay muchos catalizadores cuyo comportamiento se puede describir con la ecuación y que tienen mecanismos muy diferentes, incluso es posible que la reacción se lleve a cabo en 6 u 8 pasos [3].

Significado de los parámetros cinéticos

K_M es la concentración de sustrato a la cual V_0 alcanza la mitad del valor de $V_{\text{máx}}$ por lo que representa la concentración en la que la mitad de los sitios activos están llenos. Recordando su definición, K_M involucra las constantes de los diferentes pasos y no sólo la formación del complejo. En el caso especial en el que k_2 sea limitante de la velocidad, es decir, si $k_{-1} \gg k_2$, K_M es igual a la constante de disociación del complejo enzima-sustrato. En ese caso, representa una medida de afinidad de la enzima por su sustrato. Este no es el caso para la mayoría de los

catalizadores. Aún así, K_M es un valor característico de un sistema catalizador-sustrato bajo condiciones dadas de temperatura, pH y fuerza iónica [3, 56].

$V_{m\acute{a}x}$ representa la rapidez máxima que el sistema puede alcanzar y se determina experimentalmente. Como se conoce $[E]_0$, es posible determinar la constante del paso determinante de la reacción, en el caso del esquema propuesto, k_2 . Como en realidad no es necesariamente el segundo paso de la reacción, se denomina como k_{cat} , constante catalítica, o número de recambio, y es equivalente al número de moléculas de sustrato que son convertidas a producto en una unidad de tiempo dada, por una sola molécula de catalizador cuando éste se encuentra saturado [3, 56].

Comparación de mecanismos y de eficiencias

Los parámetros K_M y k_{cat} son útiles para estudiar y comparar diferentes catalizadores (o diferentes sustratos con la misma enzima) sin importar si sus mecanismos son simples o complejos. La mejor manera de hacerlo es comparar la relación k_{cat}/K_M para las dos reacciones. Este parámetro, que a veces se conoce como la constante de especificidad, es la constante de velocidad para la conversión de E+S a E+P [3].

5.2. Efecto de la variación del pH en la actividad catecolasa

La primera variable cuyo efecto en la actividad catecolasa del complejo se evaluó, fue el pH. Como se mencionó en la sección experimental, la concentración de catalizador en celda fue 2.0×10^{-5} M y la del sustrato fue de 2.0×10^{-3} M, es decir, la relación catalizador:sustrato fue de 1:100. La concentración de la disolución amortiguadora fue de 0.15 M.

Uno de los pasos en el mecanismo de la oxidación del DTBC a la DTBQ es la desprotonación de los grupos hidroxilo [57], por lo que la presencia de un medio básico puede influir en la velocidad de la reacción, independientemente de los cambios que genere en la esfera de coordinación del catalizador. Por lo tanto, se hicieron dos evaluaciones en cada uno de los medios: una en presencia de catalizador y otra en la que la disolución de catalizador fue reemplazada por disolvente (es decir MeOH:H₂O con buffer), para poder evaluar el efecto del pH básico del medio. En la figura 4.16 se muestran los resultados obtenidos.

Es posible observar que la basicidad del medio sí cataliza la reacción, aún en ausencia de catalizador. Aún así, el efecto del complejo [Cu₂dihp] es sustancialmente mayor, sobre todo en los valores de pH mayores: la diferencia es máxima para pH=8.5 y pH=9.0.

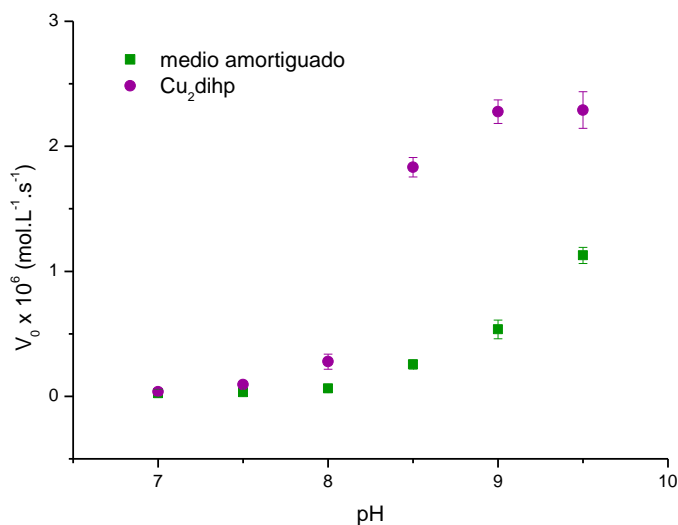


Figura 4.16. Efecto del pH en la velocidad inicial de la reacción de oxidación del 3,5-DTBC

Es posible relacionar estos resultados con el diagrama de distribución de especies obtenido anteriormente (fig. 4.14). A valores de pH menores a 8.0, el complejo no es activo (la velocidad es prácticamente la del medio). A partir de este valor de pH, la actividad del catalizador empieza a diferenciarse de la del medio. En la figura

4.14 podemos observar que es justamente a este pH que la especie triplemente hidroxilada, $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{OH})_3]$, empieza a formarse. A pH 8.5, cuando la actividad del complejo aumenta drásticamente, esta especie representa una fracción de $\approx 10\%$ del Cu(II). Por lo tanto, puede sugerirse que esta especie asimétrica es la responsable del efecto catalítico. Otros trabajos han señalado la necesidad de un ion hidróxido en la esfera de coordinación de los iones Cu(II) [9, 18, 33-36, 38], tal como el que existe en el sitio activo de la enzima [7], pues ello facilitaría la desprotonación del catecol.

Las mayores diferencias entre la actividad catalítica del complejo y la del medio se observa a pH=8.5 y a pH=9.0. Puesto que la evaluación catalítica en trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo a pH=8.5, se decidió trabajar en ese valor, para facilitar comparaciones posteriores.

5.3. Variación de la concentración de catalizador

La evaluación del efecto de la concentración del catalizador en la velocidad inicial es el primer paso para poder determinar si la cinética puede describirse con el modelo de Michaelis-Menten. En efecto, una de las suposiciones de este modelo es que la reacción sea de pseudo-primer orden respecto a la concentración de catalizador.

Para llevar a cabo el experimento, la concentración del catalizador se hizo variar en un intervalo de 1.0×10^{-5} a 5.0×10^{-5} M, manteniendo constante el pH en un valor de 8.5 (con una disolución amortiguadora 0.15 M) y la concentración del sustrato (en una concentración 2 mM en celda). La proporción catalizador:sustrato se varió de 1:40 a 1:200. Este exceso de sustrato permitió considerar que los cambios en la concentración fueron suficientemente pequeños como para ser despreciables, sobre todo porque se midieron las velocidades iniciales. En la figura 4.17 se muestran los promedios de los datos obtenidos.

Es posible observar que la relación entre la velocidad inicial y la concentración del catalizador es lineal ($R^2 = 0.982$) por lo que la reacción sí es una reacción de pseudo-primer orden respecto al catalizador. La pendiente representa la constante de velocidad de la reacción de pseudo-primer orden ($k_{\text{obs}} = 0.054 \text{ s}^{-1}$). En la gráfica, el último punto se sale de la tendencia pero esto se puede atribuir a errores experimentales, ya que a esa concentración de catalizador, la determinación fue difícil con el método empleado (como es posible ver por la barra de error mucho mayor).

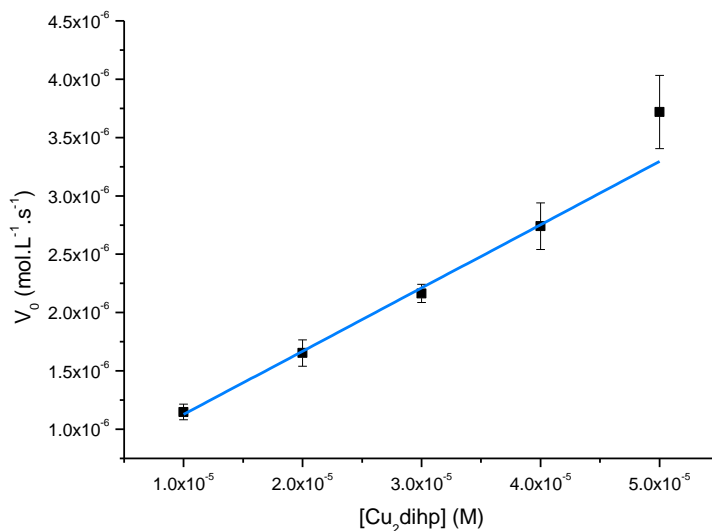


Figura 4.17. Variación de la velocidad inicial de la reacción modelo en función de la concentración del catalizador, Cu₂dihp.

5.4 Variación de la concentración de sustrato

Para evaluar el efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de la reacción, se mantuvieron constantes la concentración del catalizador ($5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, en celda) y el pH (disolución 0.15 M, pH=8.5) y se hizo variar la concentración del sustrato en un intervalo de 0.2 a 25 mM (concentraciones en celda). El análisis de los datos permitió determinar los parámetros cinéticos que permiten comparar con

otros sistemas. En la figura 4.18 se muestran los datos de velocidad obtenidos. Vale la pena notar que la concentración del catalizador con la que se trabajó fue la mitad de la que se había planeado originalmente puesto que, de otra forma, para las concentraciones más grandes de sustrato, no era posible observar la primera parte de la reacción (parte lineal).

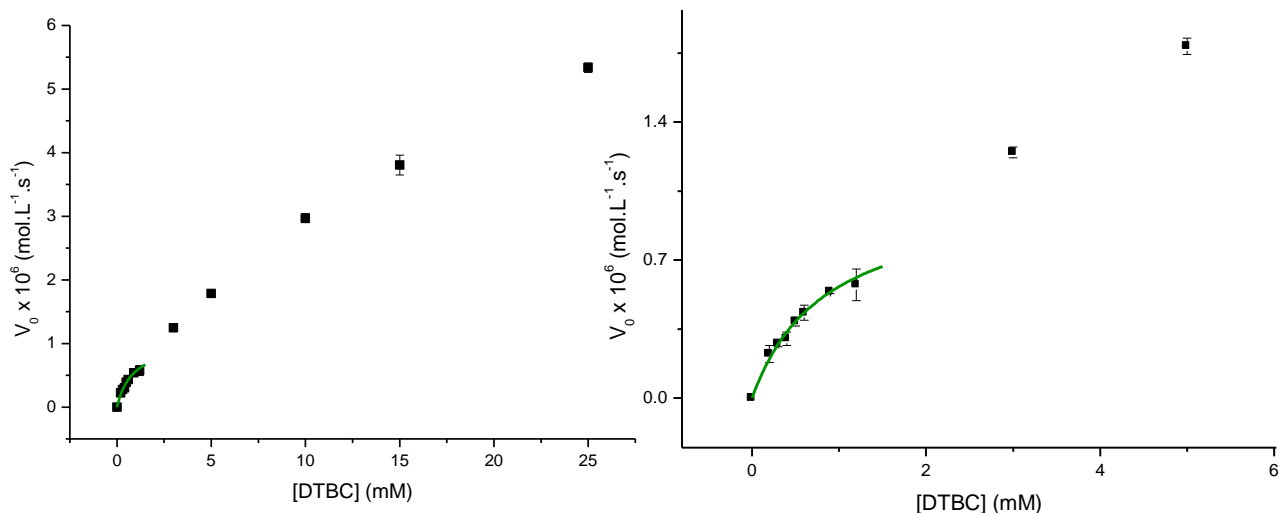


Figura 4.18. Variación de la velocidad inicial respecto a la concentración de sustrato para la reacción de oxidación del 3,5-DTBC catalizada con Cu_2dihp . En verde se muestra el ajuste de tipo Michaelis-Menten. A la derecha se muestra un acercamiento.

Es posible observar que el sistema presenta dos tipos de comportamiento. La primera parte de la gráfica, de la proporción 1:40 hasta la proporción 1:240, se puede ajustar con una hipérbola que corresponde al comportamiento de saturación. A concentraciones mayores, el comportamiento del sistema cambia e incluso podría ajustarse con otra hipérbola diferente. Con los experimentos llevados a cabo en este trabajo no se puede explicar cuáles son las causas de este cambio de comportamiento, pero sí se ha observado con otros sistemas modelo [31, 38] y en nuestro grupo de trabajo [9, 18].

Los datos experimentales se ajustaron con el modelo de Michaelis-Menten utilizando el programa Origin 8.0 [58]. Los parámetros obtenidos se presentan en la tabla 4.13.

En este punto es necesario señalar que es posible que existan otros modelos más adecuados para el tratamiento de los datos. En particular, sería necesario un modelo capaz de explicar los dos tipos de comportamiento observados. Otro factor que se debe considerar es que, a diferencia de lo que ocurre cuando se trabaja con enzimas, el sustrato no está en un exceso de 5 ó 6 órdenes de magnitud respecto a la concentración de catalizador por lo que el modelo de Michaelis-Menten podría no ser el más adecuado. Sin embargo, el uso de este modelo para describir el comportamiento de compuestos biomiméticos, aun en estas condiciones, es común en la literatura. En particular, los parámetros cinéticos que se obtienen resultan muy útiles para comparar sistemas diferentes, tanto dentro de nuestro grupo como fuera de él.

Tabla 4.13. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten obtenidos para [Cu₂dihp]. Se indica la proporción Cu₂L:DTBC para la cuál se realizó el ajuste.

K_M (M)	V_{max} (M.s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ .M ⁻¹)	Cu ₂ L:DTBC
8.46×10^{-4}	1.04×10^{-6}	0.2089	246.8	1:40 a 1:240

En realidad, estos parámetros en sí mismos aportan poca información. Lo que aporta más información es compararlos con otros sistemas. Por lo tanto, en la tabla 4.14 se indican los parámetros cinéticos que se han obtenido en nuestro grupo de trabajo para compuestos dinucleares con ligantes análogos.

Si bien no se sabe a ciencia cierta si $k_{-1} \gg k_2$, es posible hacer una primera aproximación y considerar que K_M sí es una medida de la afinidad del catalizador por el sustrato. Al comparar los sistemas con el mismo grupo donador, es posible observar que K_M es menor, es decir, el catalizador es más afín al sustrato, en el caso de los ligantes con cadena lateral más larga. Esto podría deberse a una mayor flexibilidad del sistema que permite un reacomodo más sencillo al coordinarse con el sustrato.

Resulta interesante analizar el número de recambio k_{cat} : la constante catalítica del sistema de estudio es la más alta que se ha obtenido (a excepción del complejo $[Cu_2dihe]$). Esto quiere decir que transforma un gran número de moléculas por unidad de tiempo. Se puede ver que los ligantes que tienen el mismo grupo donador tienen una k_{cat} del mismo orden de magnitud (excepto en el caso de los sistemas con dihp y dihe).

El parámetro que resulta de mayor interés y que permite comparar los diferentes sistemas, es la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M). Al hacer la comparación entre los dos sistemas con el mismo tipo de grupo donador (dihe y dihp, dimp y diep, dimeim y dmpa), la eficiencia es mucho mayor para el sistema con el ligante largo, en todos los casos. Esta mayor actividad catalítica se ha atribuido a que el anillo quelato de seis miembros proporciona mayor flexibilidad al sistema y facilita el rearrreglo geométrico que se da necesariamente al reducirse el Cu(II) a Cu(I) [9].

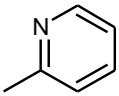
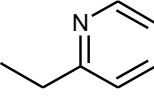

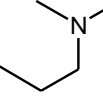

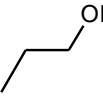
También es interesante notar que en los casos en los que el tercer átomo donador es un nitrógeno (dimp/diep, dimeim/dmpa), la eficiencia catalítica se triplica al aumentar el tamaño del anillo quelato. Sin embargo, si se comparan entre sí a los sistemas de dihe y de dihp, la mejora es casi insignificante.

Cuando se discutieron las constantes de formación, se mencionó que la constante de formación del complejo dinuclear con dihp es apenas mayor que la constante del ligante análogo que sólo tiene dos átomos donadores. Es posible que el tercer átomo donador no esté siempre coordinado en el caso del compuesto de dihp (e incluso de dihe) por lo que el aumento de la flexibilidad del sistema, que justo se da en ese anillo, no tiene gran influencia sobre la catálisis.

Adicionalmente, el complejo dinuclear con el ligante dihe tiene una constante de formación casi del mismo orden de magnitud que la del Cu_2dihp por lo que es posible pensar que el tercer átomo donador tampoco esté coordinado en todas las

especies presentes en disolución. Por lo tanto, este sistema ya tiene una mayor flexibilidad.

Tabla 4.14. Parámetros cinéticos obtenidos en nuestro grupo de trabajo con ligantes análogos. Se indica la cadena lateral (con el tercer átomo donador). Los nombres de los ligantes de la serie de los largos se indican en negritas. Adicionalmente, se indica $\log \beta_{201}$ de formación del complejo dinuclear

Ligante (R)	K_M (M)	V_{max} (M.s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ .M ⁻¹)	$\log \beta$
dimp [27] 	5.16×10^{-4}	2.36×10^{-6}	0.0788	153	18.63
diep [9] 	1.10×10^{-4}	6.17×10^{-7}	0.0617	560	19.07
dimeim [24] 	1.60×10^{-3}	3.25×10^{-6}	0.1080	68	20.75
dmpa [9] 	5.04×10^{-4}	1.05×10^{-6}	0.1054	209	14.24
dihe [8] 	2.64×10^{-3}	3.80×10^{-6}	0.5702	216	9.91
dihp 	8.46×10^{-4}	1.04×10^{-6}	0.2089	247	10.82

Por último, se ha notado en un trabajo anterior [8] que es posible hacer una correlación entre la eficiencia catalítica y la magnitud de la constante de formación. A menor $\log \beta$, mayor es la eficiencia catalítica. Aunque el complejo más activo es

[Cu₂diep] y su constante de formación es mucho mayor que la de [Cu₂dihp] (que es el segundo compuesto más activo), esta correlación funciona para cinco de los seis ligantes presentados. La correlación indica que el complejo formado entre el catalizador y el sustrato tiene que ser suficientemente lábil para permitir que proceda la reacción y pueda entrar el catecol. En este sentido, el hecho de que el alcohol no esté siempre coordinado favorece la entrada del sustrato a la esfera de coordinación del ion metálico.

Capítulo 5. Conclusiones

El ligante dihp es capaz de formar complejos dinucleares con Cu(II) aunque su afinidad por este catión es relativamente baja comparada con la afinidad de ligantes análogos con otros grupos donadores. Esto se ve reflejado en la magnitud de la constante de formación del complejo dinuclear. La diferencia es de entre 5 y 10 órdenes de magnitud. Esta baja afinidad es notable aun en estado sólido pues se obtuvieron cristales del ligante protonado en presencia de Cu(II).

La caracterización por rayos X de los cristales de $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{BF}_4)_4$ indica una geometría cuadrada alrededor del Cu(II), con una interacción axial más débil con los aniones. Es probable que en estado sólido convivan varios isómeros del compuesto en los cuales cambia el modo de coordinación del tercer átomo donador.

El sistema Cu_2dihp es catalíticamente activo en la reacción de oxidación de DTBC y sigue un comportamiento de saturación que se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten únicamente en un intervalo de relación catalizador:sustrato. Posteriormente, se encontró un cambio en su comportamiento cinético.

Se puede sugerir de los datos de equilibrio y del comportamiento cinético observado que la especie responsable de la actividad catecolasa es la especie triplemente hidrolizada $[\text{Cu}_2\text{dihp}(\text{OH})_3]^+$.

La eficiencia catalítica de este complejo es mayor que la del complejo con su análogo corto. Aun así, ambos sistemas tienen una gran flexibilidad debido a la labilidad del tercer enlace de coordinación por lo que la diferencia entre ellos no es tan importante como entre otros sistemas que se han trabajado en nuestro grupo de trabajo.

Referencias

- [1] Bertini, I., Gray, H.B, Stiefel, E.I, Valentine, J.S (editores). **Biological Inorganic Chemistry: Structure & Reactivity**. University Science Books 2007.
- [2] Fraústo da Silva, J.J.R. Williams, R.J.P. **The Biological Chemistry of Elements. The Inorganic Chemistry of Life**. Oxford University Press, 2^a edición 2001.
- [3] Nelson, D.L, Cox, M.M. **Lehninger. Principles of Biochemistry**. WH Freeman and Company. 5^a edición 2008.
- [4] Reedijk, J., Bouwman, E. (editores) **Bioinorganic Catalysis**. Marcel Dekker, Inc. 2^a edición 1999.
- [5] Lippard, S.J, Berg, J.M **Principles of Bioinorganic Chemistry**. University Science Books, 1^a edición 1994.
- [6] Karlin, K.D, Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science*, **1993**, 261, 5122, 701–708.
- [7] Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C, Krebs, B., Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, **1998**, 5, 12, 1084–1090.
- [8] Zerón Espinoza, Paulino Guillermo. *Estudio del complejo dinuclear de cobre(II) con un ligante derivado del 2-metilimidazol y etanolamina*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F. 2010.

- [9] Mendoza Quijano, María Rosa. *Complejos de cobre(II) con ligantes derivados de imidazol con actividad catecolasa*, Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México D.F. 2010.
- [10] Kim, B-E, Nevitt, T, Thiele, D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation, *Nature Chemical Biology*, **2008**, 4, 3, 176–185.
- [11] Roat-Malone, R.M **Bioinorganic Chemistry. A Short Course**. Wiley-Interscience 2002.
- [12] Koval, I.A, Gamez, P., Belle, C., Selmecezi, K., Reedijk, J.. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies, *Chemical Society Reviews*, **2006**, 814–840.
- [13] Solomon, E.I, Sundaram, U.M, Machonkin, T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, **1996**, 96, 2563–2605.
- [14] Kraatz, H-B., Metzler-Nolte, N. (editores). **Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2006.
- [15] Lippard, S.J.The interface of inorganic chemistry and biology. *Journal of the American Chemical Society*, **2010**, 132, 14689–14693.
- [16] Lippard, S.J. The inorganic side of chemical biology. *Nature Chemical Biology*, **2006**, 2, 10, 504–507.
- [17] Sosa Reyes, Ana María. *Estudio de las propiedades electroquímicas de complejos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol en relación con su actividad catalítica*, Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México D.F., 2006.

[18] Monte Pérez, Inés. *Formación y efecto catalítico del puente imidazolato en compuestos de coordinación de Cu(II)*, Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México D.F., 2011.

[19] Smith, M.B, March, J. **March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and Structure.** Wiley Inter-Science, 5^a edición 2001.

[20] Mijangos Aranda, Edgar Enrique. *Interacción de Cu²⁺ con el ligante 2-metil-bis-4,5-(metil-N-alanil)-imidazol*, Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F. 2001.

[21] Luna Ramírez, Karen Sofía. *Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol y aminoácidos.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F. 2003.

[22] Olguín Talavera, Juan Leopoldo. *Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol y aminas.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. 2003.

[23] Solís Membrillo, Ingrid Amaranta. *Estudio de las propiedades electroquímicas y catalíticas de complejos dinucleares de cobre(II).* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F. 2006.

[24] Gasque, L, Ugalde-Saldívar, V.M, Membrillo, I, Olguín, J., Mijangos, E., Bernès, S., González, I. A dicopper complex with distant metal centers. Structure, magnetic properties, electrochemistry and catecholase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2008**, 102, 5-6, 1227–1235.

[25] Mendoza-Díaz, G., Driessen, W.L, Reedijk, J., Gorter, S., Gasque, L., Thompson, K.R. Synthesis, characterization and X-ray structures of the new dinucleating ligand 2,8-dimethyl-1,4,5,6,7,10,11,12-octahydroimidazo[4,5-h]

imidazo[4,5-c][1,6]diazecine-5,11-diethanoic acid and its Cu(II) complex; an alternating chain of Cu(II) ions, coupled both intramolecularly and intermolecularly. *Inorganica Chimica Acta*, **2002**, 339, 51–59.

[26] González Sebastián, Lucero. *Estructura y reactividad del complejo dinuclear de Cu(II) con un ligante derivado de imidazol y piridina*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F. (2005).

[27] González-Sebastián, L., Ugalde-Saldívar, V.M, Mendoza-Quijano, M.R, Mijangos, E, Ortiz-Frade L.A., Gasque, L. Solvent and pH effects on the redox behavior and catecholase activity of a dicopper complex with distant metal centers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2010**, 104, 10, 1112–1118.

[28] Bhardwaj, V.K, Aliaga-Alcalde, N., Corbella, M., Hundal, G. Synthesis, crystal structure, spectral and magnetic studies and catecholase activity of copper(II) complexes with di- and tri-podal ligands. *Inorganica Chimica Acta*, **2010**, 363, 97–106.

[29] Reim, J., Krebs, B. Synthesis, structure and catecholase activity study of dinuclear copper(II) complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **1997**, 21, 3793–3804.

[30] Ackermann, J, Meyer, F., Kaifer, E., Pritzkow, H. Tuning the activity of catechol oxidase model complexes by geometric changes of the dicopper core. *Chemistry – A European Journal*, **2002**, 8, 1, 247–258.

[31] Koval I.A., Selmeczi K., Belle, C., Philouze, C., Saint-Aman, E.,Gautier-Luneau, I., Schuitema, A.M, van Vilet, M, Gamez, P., Roubeau, O., Lüken, M., Krebs, B., Lutz, M., Spek, A.L, Pierre, J.L., Reedijk, J.. Catecholase activity of a copper(II) complex with a macrocyclic ligand: unraveling catalytic mechanisms. *Chemistry – A European Journal*, (**2006**), 12, 6138–6150.

- [32] Kao, C.H, Wei, H-H., Liu, Y-H., Lee, G-H., Wang, Y., Lee, C.J. Structural correlation of catecholase-like activities of oxy-bridged dinuclear copper(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2001**, *84*, 3-4,171–178.
- [33] Gichinga, M.G, Striegler, S. Effect of water on the catalytic oxidation of catechols. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, *130*, 5150–5156.
- [34] Torelli, S., Belle, C., Gautier-Luneau, I., Pierre, J.L. pH-controlled change of the metal coordination in a dicopper(II) complex of the ligand H-BPMP: crystal structures, magnetic properties, and catecholase activity. *Inorganic Chemistry*, **2000**, *39*, 3526–3536.
- [35] Belle, C., Selmecezi, K., Torelli, S., Pierre J.L. Chemical tools for mechanistic studies related to catechol oxidase activity. *Comptes Rendus Chimie*, **2007**, 271–283.
- [36] Fernandes, C., Neves, A., Bortoluzzi, A.J, Mangrich, A.S, Rentschler, E., Szpoganicz, B., Schwingel, E. A new dinuclear unsymmetric copper(II) complex as model for the active site of catechol oxidase. *Inorganica Chimica Acta*, **2001**, *320*, 12–21.
- [37] Neves, A., Rossi, L.M, Bortoluzzi, A.J, Szpoganicz, B., Wiezbicki, C., Schwingel, E., Haase, W., Ostrovsky, S. Catecholase activity of a series of dicopper(II) complexes with variable Cu-OH(phenol) moieties. *Inorganic Chemistry*, **2002**, *41*, 1788–1794.
- [38] Granata, A., Monzani, E., Castella, L. Mechanistic insight into the catechol oxidase activity by a biomimetic dinuclear copper complex. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2004**, *9*, 903–913.

[39] [Borzel 2002] Börzel, H., Comba, P., Pritzkow, H. Structural studies on dicopper(II) compounds with catechol oxidase activity. *Chemical Communications*, **2001**, 1, 97–98.

[40] Born, K., Comba, P., Daubinet, A., Fuchs, A. Wadepohl, H. Catecholase activity of dicopper(II)-bispidine complexes: stabilities and structures of intermediates, kinetics and reaction mechanism. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2007**, 12, 36–48.

[41] Mijangos Aranda, Edgar Enrique. *Estudio estructural, magnético y catalítico de sistemas polinucleares de Cu con ligantes derivados de imidazol y aminoácidos*. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México D.F. 2008.

[42] Reichardt, C. **Solvents and Solvent Effect in Organic Chemistry**. VCH, NY, 1990.

[43] Driessen, W.L, Rehorst, D., Reedijk, J., Mutikainen, I., Turpeinen, U. Copper(II) compounds of some rigid dinucleating bis-amine–bis-imidazole ligands. *Inorganica Chimica Acta*, **2005**, 358, 2167–2173.

[44] Huheey, J.E, Keiter, E.A., Keiter R.L. **Inorganic Chemistry. Principles of Structure and Reactivity**. Harper Collins College Publishers. 4^a edición 1993.

[45] Bain, A.G, Berry, J.F. Diamagnetic corrections and Pascal's constants. *Journal of Chemical Education*, **2008**, 85, 4, 532–536.

[46] Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A. Hyperquad 2003. <<http://www.hyperquad.co.uk/>>.

- [47] Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **1996**, 43, 1739–1753.
- [48] Puigdomenech, I. MEDUSA, Royal Institute of Technology, 1998, Stockholm, Sweden.
- [49] Mussini, T., Covington, A.K, Longhi, P, Rondinini, S.. Criteria for standardization of pH measurements in organic solvents and water + organic solvent mixtures of moderate to high permittivities. *Pure and Applied Chemistry*, **1985**, 6, 5.
- [50] Nakamoto, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part. B**. Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc. 5^a edición 1997.
- [51] Friebolin, H. **Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 1^a edición, 1^a reimpression 2008.
- [52] Greenwood, N.N, Earnshaw, A. **Chemistry of the Elements**. Butterworth-Heinemann, Elsevier. 2^a edición 2009.
- [53] Lever, A.B.P. **Inorganic Electronic Spectroscopy**. Elsevier. 2^a edición 1984.
- [54] Larin, G.M, Minin, M.M, Shul'gin, V.F. EPR: Exchange interactions in binuclear copper(II) complexes with hydrazones based on saturated dicarbohydrazides. *Russian Chemical Reviews*, **2008**, 77, 5, 451–465.
- [55] Garribba, E, Micera, G. The determination of the geometry of Cu(II) complexes. An EPR spectroscopy experiment. *Journal of Chemical Education*, **2006**, 83, 8, 1229–1232.

[56] Chang, R. **Fisicoquímica**. McGraw Hill, 3^a edición 2008.

[57] Monzani, E., Quinti, L., Perotti, A., Casella, L., Gullotti, M., Faleschini, P., Tabbì, G., Tyrosinase models. Synthesis, structure, catechol oxidase activity, and phenol monooxygenase activity of a dinuclear copper complex derived from a triamino pentabenzimidazole ligand. *Inorganic Chemistry*, **1998**, 37, 553–562.

[58] ORIGINPRO 8. OriginLab Corporation 2005.