



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

COMPLEJOS DE COBRE CON LIGANTES DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL,
INSPIRADOS EN EL SITIO ACTIVO DE LAS ENZIMAS LPMO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANDREA CAROLINA NEIRA DESALVADOR

TUTOR

Dr. IVAN CASTILLO PÉREZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

COMPLEJOS DE COBRE CON LIGANTES DERIVADOS DEL
BENCIMIDAZOL, INSPIRADOS EN EL SITIO ACTIVO DE LAS
ENZIMAS LPMO

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANDREA CAROLINA NEIRA DESALVADOR

TUTOR
Dr. IVAN CASTILLO PÉREZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, Noviembre de 2019

Agradecimientos

Muy cordialmente al **Dr. Ivan Castillo Pérez**, por su brillante y comprometida asesoría en cada paso del quehacer científico.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme realizar los estudios doctorales.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para llevar a cabo los estudios de doctorado (293842), así como al proyecto CONACyT-ANUIES (ECOS 291247) por el apoyo económico.

A **DGAPA-PAPIIT** (IN210214 y IN203317) por financiamiento adicional al proyecto de investigación.

Al **Instituto de Química-UNAM**, por brindarme los espacios, personal y equipos suficientes para llevar a cabo el proceso investigativo.

Al **Dr. Juventino García Alejandro** y al **Dr. Víctor Ugalde Saldívar** por sus valiosos aportes en cada evaluación tutorial.

A la **Dra. Jalila Simaan** por darme la oportunidad de desarrollar los experimentos de degradación de polisacáridos y facilitarme el uso de equipos durante la estancia de investigación en la Universidad Aix de Marsella, Francia.

Al **Dr. Ebbe Nordlander** por su apoyo y dirección durante buena parte del proyecto, también por la apertura a recibirme en su laboratorio en la Universidad de Lund, Suecia.

Al **Dr. Miquel Costas** y la **Dra. Anna Company** por permitirme realizar los estudios de espectrometría de masas a baja temperatura mediante ionización por electrospray (ESI-MS) en el Instituto de Química Computacional y Catálisis, de la Universidad de Girona, España.

A los Doctores **Juan Chen**, **Johann B. Kasper** y **Wesley Browne** en la Universidad de Groningen en Países Bajos, por su colaboración para realizar los estudios de Raman resonante.

Al **Dr. Gabriel Aullón López** y la **Dra. Paulina Raquel Martínez Alanis** por los cálculos teóricos en la Universidad de Barcelona, España.

A la **Dra. Laura Gasque Silva** y el **Dr. David Morales Morales** miembros del comité tutorial ampliado.

A los miembros del jurado.

A la **M. en C. Virginia Gómez Vidales** por su colaboración y disposición para realizar los experimentos de resonancia paramagnética electrónica. Así mismo por su valiosa instrucción en el proceso de simulación de espectros.

Al **Dr. Marcos Flores Álamo** por la elucidación y refinamiento de estructuras de rayos-X.

A la **M. en C. Lucía del Carmen Márquez**, **M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz** y **Q. Eréndira García Ríos** por los análisis de espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI-MS).

Al **Dr. Francisco Javier Pérez Flores** y al **I.Q. Luis Velasco Ibarra** por la espectrometría de masas por IE y FAB.

A la **Q. María de la Paz Orta** por los análisis elementales por combustión.

A la **Q.F.B. María del Rocío Patiño** por las mediciones por espectroscopía de infrarrojo.

Una mención especial a mis compañeros del laboratorio 4C y 2-2 del Instituto de Química por sus valiosa y grata compañía, aportes y ayuda en múltiples oportunidades.

A Dios, mi familia y mi amado esposo Uday Shankar.

Comité tutor

Dr. Ivan Castillo Pérez

Dr. Juventino José García Alejandre

Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar

Comité tutor ampliado

Dra. Laura María Gasque Silva

Dr. David Morales Morales

Miembros del Jurado

Presidente

Dra. Laura María Gasque Silva

Vocal

Dr. Juventino José García Alejandre

Vocal

Dr. Alberto Rojas Hernández

Vocal

Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe

Secretario

Dra. Susana Porcel García

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 4C y posteriormente 2-2 de Química Inorgánica y Supramolecular del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Difusión

Estancias

- Aix Marseille Université, Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, Campus Scientifique de St Jérôme, Marseille, Francia.
- Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC), Departament de Química, Universitat de Girona, Girona (Cataluña), España.
- Chemical Physics, Center for Chemistry and Chemical Engineering, Lund University, Lund, Suecia.

Publicaciones

- Andrea C. Neira, Paulina R. Martínez-Alanis, Gabriel Aullón, Marcos Flores-Alamo, Paulino Zerón, Anna Company, Juan Chen, Johann B. Kasper, Wesley Browne, Ebbe Nordlander, and Ivan Castillo. Oxidative cleavage of cellobiose by lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)-inspired Copper complexes. *ACS Omega* **2019**, *4*, 10729-10740.
- Adolfo I. B. Romo, Vitória S. Dibo, Dieric S. Abreu, Marta S. P. Carepo, Andrea C. Neira, Ivan Castillo, Luis Lemus, Otaciro R. Nascimento, Paul V. Bernhardt, Eduardo H. S. Sousa, and Izaura C. N. Diógenes. Ascorbyl and hydroxyl radical generation mediated by a copper complex adsorbed on gold. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 14128-14137.

Presentación en eventos

- Presentación oral: Seminario Departamental de Química Inorgánica del Instituto de Química-UNAM, “Complejos de cobre inspirados en LPMOs”. México, Ciudad Universitaria. Marzo 2019.
- Póster: 2nd LPMO Symposium, “Catalytic properties of 'histidine brace'-inspired copper complexes”. Marseille, Francia. Noviembre 2018.
- Póster: The Copper Bioinorganic Chemistry Symposium CUBICS, “Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)-inspired copper complexes for oxidative cleavage of cellobiose”. Marseille, Francia. Mayo 2018.

- Póster: QUIMIUNAM 2018, Universidad Nacional Autónoma de México, “Complejos de cobre inspirados en monooxigenasas líticas de polisacárido (LPMO) para la ruptura oxidativa de celobiosa”. México, Ciudad Universitaria. Agosto 2018.
- Póster: Simposio Interno del Instituto de Química 2017. “Benzimidazole-copper complexes inspired on the active site of polysaccharide monooxygenase enzymes AA9, AA10 and AA11”. México, Ciudad Universitaria. Junio 2017.
- Póster y workshop: V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry LABIC 2016, Querétaro, México. Octubre 2016.

Abreviaturas y símbolos

Å	Angstrom
Ar	Aromático
br	Señal ancha (broad en inglés)
°C	Grado celcius
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CSI-MS	Espectrometría de masas de ionización por criospray
d	Banda de Infrarrojo con intensidad débil
DFT	Density Functional Theory
DART	Direct Analysis in Real Time
E _{1/2}	Potencial de media onda
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
ESI	Electrospray ionization
ENH	Electrodo Normal de Hidrógeno
ESH	Electrodo Estándar de Hidrógeno
f	Banda de Infrarrojo con intensidad fuerte
Fc ⁺ /Fc	Par redox ferricinio/ferroceno
FAB	Fast Atom Bombardment
FTIR	Espectroscopía infrarojo con transformada de fourier
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
h	Hora
His	Histidina
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
LMTC	Transferencia de carga ligante-metal
LPMO	Enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos
m	Banda de Infrarrojo con intensidad media
M	Molar
MHz	Megahertz
MS	Espectrometría de masas
MLTC	Transferencia de carga metal-ligante
mL	Mililitro
mmol	Milimoles
mM	Milimolar
m	Multiplete

mT	Militesla
m/z	Relación masa-carga
mV	Milivoltios
OTf	Triflato
PB	Buffer de fosfatos
PMO	Polisacárido Monooxigenasas
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
s	Singulete
SOMO	Orbital molecular ocupado por un solo electrón
t	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

Contenido

Agradecimientos	3
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo I. Monooxigenasas Líticas de Polisacárido (LPMO) y Biocombustibles de Segunda Generación	15
Capítulo II. Modelos bioinspirados	25
Capítulo III. Planteamiento del problema, Hipótesis y Objetivos	33
Capítulo IV. Resultados y Discusión.....	35
Caracterización del complejo [(2BB)Cu]OTf	35
Estructuras en estado sólido del sistema [(2BB)Cu ^{II/1}] ^{2+/+}	36
Estudios en disolución de [(2BB)Cu ^{II} (H ₂ O) ₂](OTf) ₂	37
Estudios electroquímicos.....	39
Reactividad de [(2BB)Cu ^I]OTf frente a O ₂	43
Reactividad de [(2BB)Cu ^I]OTf y [(2BB)Cu ^{II} (H ₂ O) ₂](OTf) ₂ con KO ₂	46
Reactividad de [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu ^{II} (H ₂ O) ₂](OTf) ₂ con H ₂ O ₂	49
Espectroscopía de Raman Resonante	58
Oxidaciones a escala preparativa de celobiosa con [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu(H ₂ O) ₂](OTf) ₂	60
Estudios computacionales	63
Capítulo V. Conclusiones	68
Capítulo VI. Perspectivas	69
Capítulo VII. Sección experimental	70
Capítulo VIII. Anexos	79
Espectros de caracterización adicional [(2BB)Cu]OTf.....	79
Datos DRX de caracterización del complejo [(2BB)Cu]OTf.....	80
Espectros RPE de caracterización de especies Cu(I) + O ₂	83
Espectros RPE experimentos de [(2BB)Cu] ⁺ generado <i>in situ</i> en PB pH 7.0/glicerol, o en CH ₃ CN + O ₂	84
Espectros RPE experimentos de [(2BB)Cu] ⁺ generado <i>in situ</i> en PB/glicerol + O ₂ + celobiosa	86
Espectros de reactividad con KO ₂ y celobiosa	86
Espectros de reactividad de [(2BB)Cu(H ₂ O) ₂](OTf) ₂ con H ₂ O ₂ y celobiosa.....	91

Oxidaciones a escala preparativa de celobiosa con [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu(H ₂ O) ₂](OTf) ₂ en CH ₃ CN	93
Oxidaciones a escala preparativa de celobiosa con [(2BB)Cu] ⁺ generado <i>in situ</i> y O ₂ en PB	95
Comparación de la degradación de celobiosa y de glucosa con [(2BB)Cu ^{II} (H ₂ O) ₂](OTf) ₂ y H ₂ O ₂ /Et ₃ N en PB.....	100
Degradación de celobiosa con [(2BB)Cu] ⁺ <i>in situ</i> y KO ₂ en PB	104
Reacciones de control para estudios de degradación de celobiosa a escala preparativa	108
Estudios computacionales	111
Capítulo IX. Publicaciones	112

Resumen

Se empleó el ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil] amina (**2BB**) para preparar los complejos de cobre $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ y $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ como modelos bioinspirados en las enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO). La caracterización en estado sólido de los mencionados complejos reveló en cada caso la existencia de un centro mononuclear de cobre con entorno de coordinación en forma de T, arreglo conferido por el ligante coordinado tridentado; los parámetros métricos de ángulos y longitudes de enlace de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ y $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ están en el rango de los reportados para LPMO en estado reducido y oxidado respectivamente. La caracterización en disolución de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ indica que $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ es la principal especie en el rango de pH de 4.0 a 7.5; por encima de pH 7.5, también está presente la especie $[\{(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_x\}_2(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$, lo cual fue posteriormente corroborado por voltametría cíclica y espectrometría de masas. Estas observaciones implican que se excluye la desprotonación de la amina central de (**2BB**) coordinada con Cu(II) y por extensión, la desprotonación de la amina en el abrazo de histidina de las LPMO parece improbable a un pH neutro.

Adicionalmente, se identificó que los complejos $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ y $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ actúan como precursores de degradación oxidativa de la celobiosa, sustrato modelo de celulosa. Los estudios espectroscópicos y de reactividad indican que un complejo dicobre(II) peroxo-lateral generado a partir de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}/\text{O}_2$ o $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ tiene la capacidad de oxidar la celobiosa tanto en disoluciones de acetonitrilo, como en amortiguador de fosfato acuoso, lo cual se evidenció en el análisis de productos obtenidos por HPLC-MS. La mezcla de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ produce mayor degradación de la celobiosa. Del mismo modo, el uso de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ y $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ con KO_2 generó los mismos productos de oxidación. En todos los casos $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ fue detectado por espectrometría de masas como el producto final de cobre.

Abstract

The ligand bis[(1-methyl-2-benzimidazolyl)ethyl]amine (**2BB**) ligand was employed to prepare the copper coomplexes $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ and $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ as bioinspired models of lytic polysaccharide copper-dependent monooxygenase (LPMO) enzymes. Solid-state characterization of the aforementioned complexes revealed in each case the existence of a copper mononuclear center with a T-shaped coordination environment, arrangement conferred by the tridentate coordinated ligand; and metric parameters in the range of those reported for LPMOs in reduced and oxidized states respectively. Solution characterization of $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ indicates that $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ is the main species from pH 4 to 7.5; above pH 7.5, the hydroxo-bridged species $[\{(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_x\}_2(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$ is also present, based on cyclic voltammetry and mass spectrometry. These observations imply that deprotonation of the central amine of Cu(II)-coordinated (**2BB**) is precluded, and by extension amine deprotonation in the histidine brace of LPMOs appears unlikely at neutral pH.

The complexes $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ and $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ act as precursors for the oxidative degradation of cellobiose as a cellulose model substrate. Spectroscopic and reactivity studies indicate that a dicopper(II) side-on peroxide complex generated from $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}/\text{O}_2$ or $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NEt}_3$ oxidizes cellobiose both in acetonitrile and aqueous phosphate buffer solutions, as evidenced from product analysis by HPLC-MS. The mixture of $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NEt}_3$ results in more extensive cellobiose degradation. Likewise, the use of both $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ and $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ with KO_2 afforded cellobiose oxidation products. In all cases, a common Cu(II) complex formulated as $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ was detected by mass spectrometry as the final copper product.

Capítulo I. Monooxigenasas Líticas de Polisacárido (LPMO) y Biocombustibles de Segunda Generación

Activación de oxígeno. La piedra angular en el sustento de la vida aeróbica radica en la diversidad de la química del dioxígeno y abarca todas las subcategorías de la química. Sin embargo, el alto poder oxidante almacenado en el doble enlace O=O requiere una "activación" redox para poder acceder y utilizarlo en transformaciones químicas, ya que el oxígeno molecular es abundante pero cinéticamente inerte debido a su estado fundamental y fuerte enlace oxígeno-oxígeno, **Figura 1.1**.

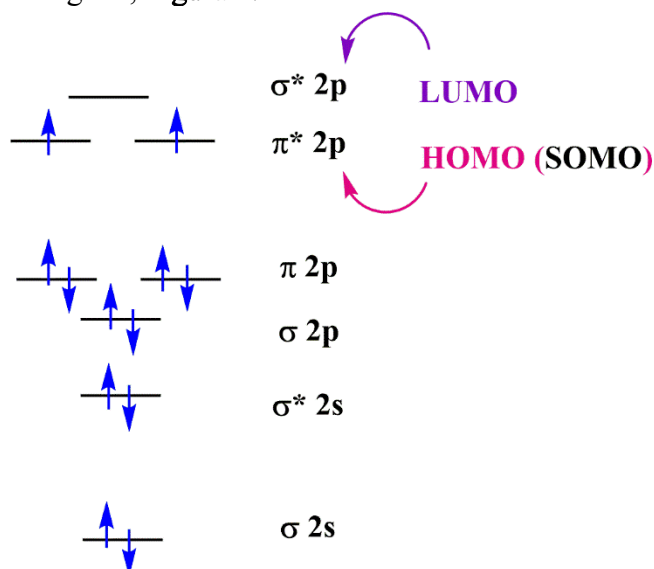


Figura 1.1. Diagrama de orbitales moleculares para el O₂ (HOMO = orbital molecular ocupado de más alta energía, LUMO = orbital molecular desocupado de menor energía. En otras especies moleculares tipo radicales libres medio llenos, el estado ocupado por el electrón desapareado se denomina SOMO = orbital molecular ocupado por un solo electrón).

La reducción completa de dioxígeno a agua requiere de 4 protones y 4 electrones, y está bien caracterizada la descripción electroquímica de estas transferencias de protones por etapas y/o transferencias de electrones en medio acuoso, como se observa en la (**Figura 1.2**).¹ El oxígeno requiere de un electrón para formar el intermediario superóxido, pasando del estado fundamental triplete a un estado doblete más reactivo, lo cual resulta en la reacción directa con sustratos orgánicos (singuletes en estado fundamental);² la especie generada superoxo toma otro electrón (forma el intermediario peroxo) y un protón para formar un intermediario hidroperoxo, el cual se somete a escisión O-O para permitir la formación de una especie hidroxilo y finalmente con el requerimiento de un protón y un electrón adicional, se llega a

¹ Karlin, K., et. al. *Chem. Rev.* **2018**, 118, 10840.

² Chang, M.-Y. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 677.

la obtención final de agua. Alternativamente, las especies superoxo pueden abstraer un átomo de hidrógeno adicional para formar la especie de hidroperoxo.

Reducción de O_2 en medio acuoso

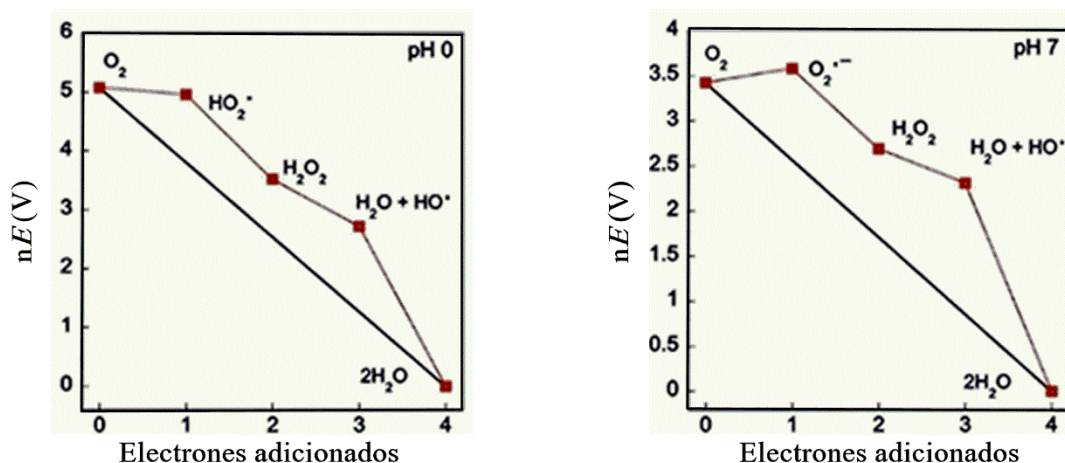
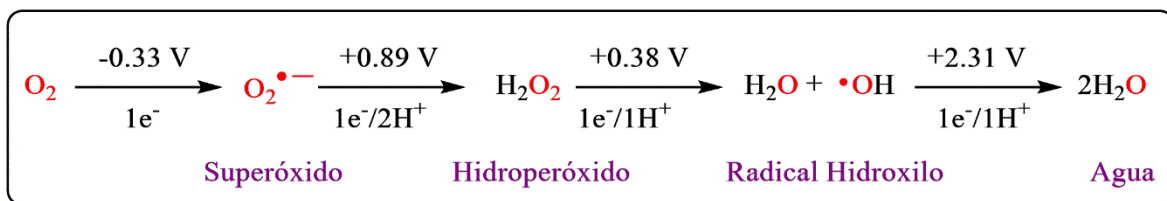


Figura 1.2. (Superior) Pasos de la reducción de dioxígeno; los potenciales de reducción están dados en volts vs. NHE a 25°C, 1 bar, pH = 7. (Inferior) Diagramas de Frost que representan la energía libre (nE) de los intermediarios ROS (especies reactivas de oxígeno) durante la reducción gradual de O_2 a agua a (a) pH = 0 y (b) pH = 7. *Imagen Adaptada de referencia 1.*

La activación biológica del oxígeno molecular, es decir la reducción parcial de O_2 para la generación de especies reactivas de oxígeno altamente oxidantes (ROS), es fundamentalmente importante para la vida y consiste en una estrategia común en las metaloenzimas. Estas ROS exhiben características espectroscópicas únicas, indicativas de nuevas estructuras geométricas y electrónicas involucradas en la activación de oxígeno. Los sitios activos de las metaloenzimas se hallan dominados por iones de metales de transición, incluidos cobre y hierro, debido a su abundancia en la geosfera, propiedades electrónicas inherentes y potenciales redox accesibles.³ Por ello, juegan un papel importante en la catálisis homogénea⁴ y heterogénea,⁵ donde adoptan diversos entornos de coordinación y tipos de ligantes, cooperando a veces con residuos de aminoácidos con actividad redox. Las enzimas de cobre están involucradas en la unión reversible de dioxígeno (hemocianina), la reducción de dos electrones a peróxido y la oxidación de sustratos orgánicos muy estables (aminas, galactosa y catecol oxidasas), activación para hidroxilación (monooxigenasas y tirosinasa) y la reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O acoplada a la oxidación de sustratos (lacasa,

³ Holm, R.H., et. al. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239.

⁴ Marko, I.E., et. al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2208.

⁵ Solomon, E.I. et. al. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2623.

ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, entre otras) o bombeo de protones (citocromo c oxidasa)⁶ y exhiben especificidad de sustrato, regioselectividad y/o estereoselectividad, además de operar en condiciones suaves inherentes a procesos "verdes".

Independientemente de la proteína en la que se encuentren, los sitios activos de las metaloenzimas dependientes de cobre se clasifican en tres grupos según el número de átomos de cobre presentes, su geometría, características espectroscópicas de UV-vis y RPE, potenciales de reducción, y preferencia de ligantes.⁷

Las cuproproteínas tipo 1, conocidas también como proteínas azules o cupredoxinas, son mononucleares y se coordinan a 2 nitrógenos imidazólicos de histidina, 1 azufre tiolato de cisteína en un arreglo trigonal plano y un ligante axial adicional.⁸ Las tipo 2, presentes en oxidoreductasas (encargadas de catálisis redox), poseen centros binucleares no acoplados (o son mononucleares) coordinados predominantemente por residuos de histidina en una geometría plana cuadrada distorsionada (los ligantes que contienen oxígeno también son comunes).⁹ Las tipo 3, se encuentran en algunas oxidasas (transporte de O₂), poseen centros binucleares, con cada cobre unido a tres histidinas; en ausencia de dioxígeno, cada átomo de cobre en el centro está en una geometría plana trigonal y al unirse el O₂, los átomos de cobre se acercan y adquieren una geometría bipiramidal trigonal.¹⁰ Ver **Tabla 1.1**.

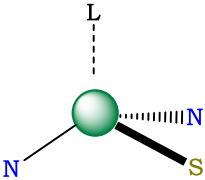
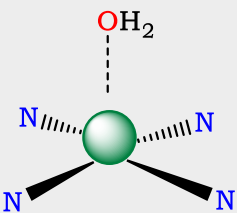
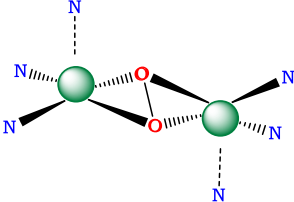
Tipo de Cu	Entorno del Cu	Cracterísticas
Tipo I (Ej: Plastocianina)		- <i>Potenciales redox</i> : positivos, mayores de 0.25 V vs SHE a pH 7. - <i>UV-vis</i> : Absorción intensa en la región visible ($\lambda_{\text{max}} \sim 600 \text{ nm}$; $\epsilon > 3,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). - <i>RPE</i> : Desdoblamiento hiperfino pequeño en la región gll.
Tipo II (Ej: Cu, Zn-Superoxido dismutasa SOD)		- <i>Potenciales redox</i> : cercanos a 0.4 V vs SHE a pH 7. - <i>UV-vis</i> : Prácticamente incoloros, débil espectro de absorción (sólo transiciones prohibidas ya que carecen de ligantes de azufre). - <i>RPE</i> : Activos, presentan parámetros normales para Cu ²⁺ .
Tipo III (Ej: Hemocianina)		- <i>Potenciales redox</i> : cercanos a 0.54 V vs SHE a pH 7. - <i>UV-vis</i> : Absorciones intensas en UV cercano ($\lambda_{\text{max}} \sim 300 \text{ nm}$) - <i>RPE</i> : silencioso por acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones Cu ²⁺ , con S = 1/2.

Tabla 1.1. Los diferentes tipos de centros de cobre en metaloproteínas.

⁶ Solomon, E.I. et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4570.

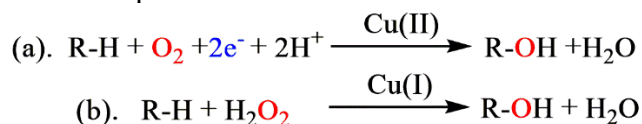
⁷ Rubino, J.T., et. al. *J. Bioinorg. Chem.* **2012**, 107, 129.

⁸ Holm, R.H., et. al. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239.

⁹ Richardson, J.S., et. al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72, 1349; Morie-Bebel, M.M., et. al. *Biochem.* **1996**, 235,415.

¹⁰ Hazes, B., et. al. *Protein. Sci.* 1993, 2, 597; Magnus, K.A., et. al. *Proteins.* 1994, 19, 302.

Monooxigenasas líticas de polisacárido (LPMO). Con el descubrimiento en hongos (*Thermascus aurantiacus* o *Neurospora crassa*) y bacterias (*Bacillus amyloliquefaciens* o *Enterococcus faecalis*)¹¹ de estas abundantes monooxigenasas dependientes de cobre, también clasificadas por la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy) como enzimas de actividad auxiliar (AA),¹² las estrategias para la activación de O₂ por las enzimas de cobre se han expandido. Estas enzimas muestran una química catalítica intrigante y sin precedentes, que consiste en la capacidad de catalizar la escisión oxidativa de los enlaces glucosídicos de polisacáridos recalcitrantes (R en el **Esquema 1.1**, incluida la celulosa,¹³ hemicelulosa,¹⁴ quitina,¹⁵ xilano¹⁶ y almidón),¹⁷ empleando como cosustrato el oxígeno o el peróxido de hidrógeno, **Esquema 1.1**.¹⁸ Esto da lugar a la hidroxilación del carbono C1 o C4 en el enlace glucosídico escindible (**Figura 1.3**), lo cual las hace muy valiosas en bioprocesamiento industrial de polisacáridos.



Esquema 1.1. Reacción de LPMO-cosustrato. Ambas ecuaciones muestran la actividad LPMO impulsada por O₂ y H₂O₂ propuesta en (a) 2010¹¹ y (b) 2017.¹⁴ El Cu(II)/Cu(I) indicado arriba de las flechas se refiere al ion de cobre en el sitio activo y su estado de oxidación antes de iniciar el ciclo catalítico.¹⁹

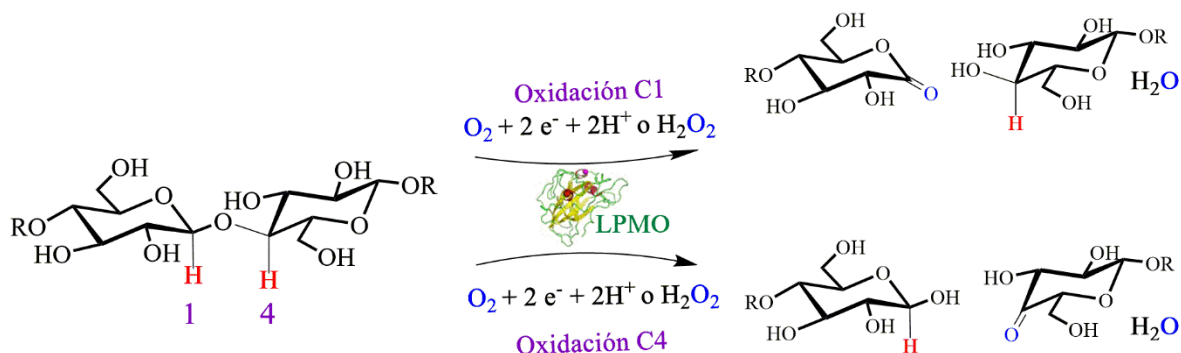


Figura 1.3. Escisión de enlace glucosídico e hidroxilación de sustrato. La oxidación en C1 resulta en la formación de una lactona -que al hidratarse genera el extremo reductor como ácido aldónico- y la oxidación en C4 conduce a la formación de una cetosa en el extremo no reductor.²⁰

Estructura de las LPMO. El sitio activo de las LPMO se caracteriza por poseer un centro de cobre de tipo 2 con un ambiente de coordinación con donadores N3 definido por dos imidazoles de histidina, así como una amina de uno de los residuos de histidina en el motivo estructural conocido como el “abrazo de histidina” (**Figura 1.4**), que es poco frecuente en la

¹¹ Quinlan, R.J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2011**, 108, 15079; Hemsworth, G.R., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 6069; Hemsworth, G.R., et al. *Chem. Biol.*, **2014**, 10, 122; Lo Leggio, L., et al. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 5961.

¹² <http://www.cazy.org>.

¹³ Quinlan, R.J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 15079; Beeson, W.T., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 890.

¹⁴ Agger, J.W., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111, 6287; Simmons, T.J., et al. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1064.

¹⁵ Vaaje-Kolstad, et al. *Science*. **2010**, 330, 219; Hemsworth, G.R., et al. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 122.

¹⁶ Frommhagen, M., et al. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, 8, 101; Couturier, M., et al. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, 14, 306.

¹⁷ Vu, V.V., et al. **2014**, 111, 13822; Lo Leggio, L., et al. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 5961.

¹⁸ Bissaro, B., et al. *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, 13, 1123.

¹⁹ Chylenski, P., et al. *ACS Catal.* **2019**, 9, 4970.

²⁰ Kjaergaard, C.H., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2014**, 111, 8797.

naturaleza y que probablemente le da a las LPMO su notable poder oxidativo, gobernando la reactividad del centro metálico.²¹ Resaltan además por un lado la τ -N-metilación del residuo de histidina que hace parte del abrazo (cuya función no es clara) y por otro, la proximidad de residuos de tirosina o de fenilalanina, que pudieran ser partícipes en la modulación de las propiedades del ion de cobre, **Figura 1.4 (b)**. Como se puede apreciar, el centro metálico mantiene una configuración en forma de T hacia los tres átomos de nitrógeno coordinados.

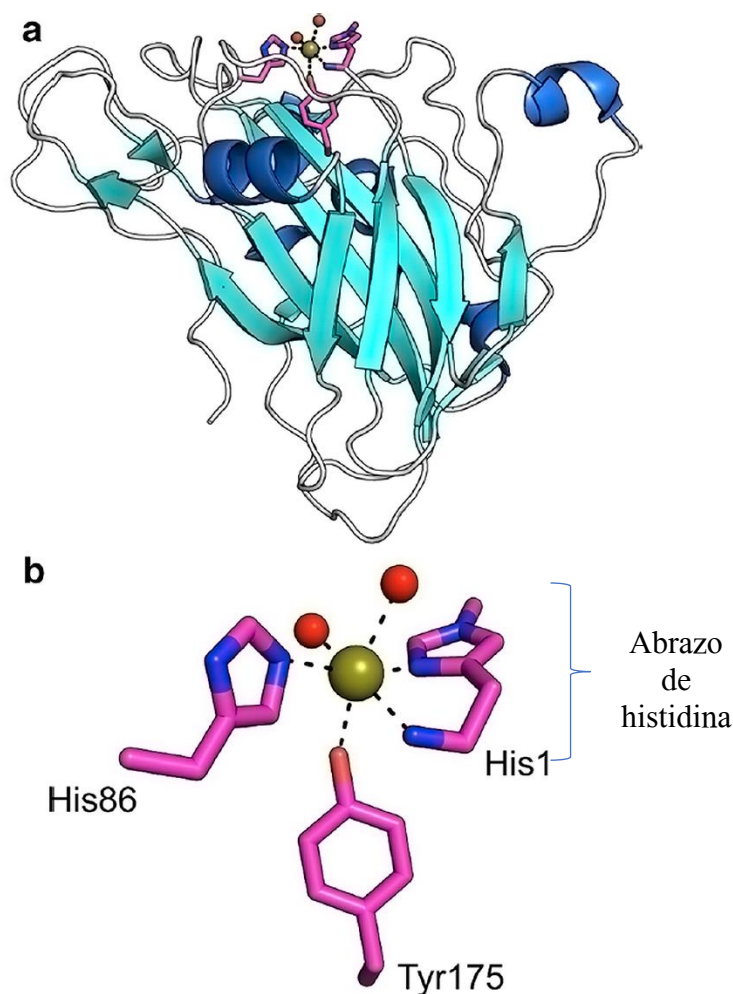


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la LPMO típica y su sitio activo: (a) Estructura cristalina y (b) detalles del centro catalítico de una familia de celulosa activa LPMO AA9 del hongo *Thermoascus aurantiacus*, TaLPMO9A.¹⁷

Propuestas mecanística de degradación de polisacáridos recalcitrantes. La caracterización funcional de las LPMO no es sencilla porque las mezclas de reacción típicas promueven reacciones secundarias, incluida la inactivación autocatalítica de la enzima. Cabe resaltar que, a pesar de algunos avances recientes, todavía hay una visión limitada de la cinética de reacción de LPMO. Sin embargo, se sabe que pueden actuar sobre las superficies de los sustratos insolubles, mejorando así la accesibilidad para las hidrolasas canónicas (por

²¹ Eijssink V.G.H., et. al. *Biotechnol. Biofuels*. 2019, 12,58.

ejemplo, quitinasas y celulasas) en las partes más recalcitrantes del sustrato que de otra forma se habrían degradado mucho más lentamente o no se degradaría en absoluto.²²

Dado lo anterior, solo se han propuesto algunos mecanismos de degradación oxidativa por acción de las polisacárido monooxigenasas, en los que se requiere la transferencia de electrones para romper los polisacáridos de una forma oxígeno-dependiente, donde se ha propuesto como primer paso la reducción en un electrón de la LPMO-Cu(II) oxidada, a la forma LPMO-Cu(I) (**Figura 1.5.i**). Considerando el oxígeno molecular como cosustrato, se debe considerar que para activarlo hacia la escisión oxidativa de los polisacáridos se requieren dos electrones (**Esquema 1.1, Figura 1.5.ii**), los cuales son suministrados externamente por moléculas pequeñas reductoras (ácido ascórbico, glutatión reducido, cisteína, un amplio rango de compuestos fenólicos fúngicos o biomasa vegetal, como lignina y sus fracciones),²³ o donadores de electrones enzimáticos de tipo flavoproteína, como la celobiosa deshidrogenasa (CDH).²⁴ Al considerar H₂O₂ como cosustrato (donde las LPMO evidencian magnitud más altas de velocidad de reacción en comparación con las reacciones impulsadas por O₂), se propone que dicho H₂O₂ puede generarse a través de la reacción de LPMO-Cu(I) no unido al sustrato con O₂ (actividad oxidasa, **Figura 1.5.ii**) o de la autooxidación del donador de electrones, posiblemente catalizada por metales traza en disolución (**Figura 1.5.iii**). La enzima reducida se une al sustrato²⁵ y escinde los enlaces glucosídicos utilizando H₂O₂ u O₂ (**Figura 1.5.iv**). Cuando se usa H₂O₂, LPMO puede realizar varios eventos catalíticos sin la necesidad de reducirse entre cada ciclo catalítico (**Figura 1.5.v**).^{14,26}

Para la reacción impulsada por O₂, se propone que una vez se da la unión a oxígeno, sigue una transferencia interna de electrones para formar el intermediario cobre-superoxo. Posteriormente tiene lugar la abstracción de hidrógeno por la especie cobre-superoxo en las posiciones 1 o 4 de un carbohidrato interno (generando un intermediario cobre-hidroperoxo y un sustrato radicalario, **Figura 1.6**). Un segundo electrón facilita entonces la ruptura del enlace O-O liberando H₂O y un radical cobre-oxo que se acopla con el sustrato radicalario, hidroxilando así el polisacárido en las posiciones 1 o 4. El átomo de oxígeno adicional desestabiliza el enlace glucosídico, permitiendo la liberación del glucano adyacente y la formación de una lactona o una cetoaldosa. Si una LPMO reducida reacciona con H₂O₂ en ausencia de sustrato, o si la unión al sustrato es débil o imprecisa, la reacción puede conducir a la oxidación del sitio activo y la inactivación de la enzima²⁷ (**Figura 1.5.vi**). Las LPMO producidas en hongos tienden a estar metiladas en la histidina N-terminal (**Figura 1.5.vii**), una modificación que probablemente reduce la inactivación a concentraciones más altas de H₂O₂.²⁸ El punto verde en la **Figura 1.5.vii** indica la posición aproximada de las especies

²² Eibinger, M., et. al. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 35929; Eibinger, M., et. al. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 894.

²³ Eriksson, K.E., et. al. *FEBS Lett.* **1974**, 49, 282; Phillips, C.M., et. al. *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 1399; Dimarogona, M., et. al. *Bioresour. Technol.* **2012**, 110, 480; Frommhagen, M., et. al. *Biotechnol. Biofuels.* **2016**, 9, 186; Kracher, D., et. al. *Science.* **2016**, 352, 1098; Brenelli, L., et. al. *Biotechnol. Biofuels.* **2018**, 11, 10.

²⁴ Langston, J.A., et. al. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 7007; Tan, T.C., et. al. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7542; Courtade, G., et. al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113, 5922; Ciano, L., et. al. *Nat Catal.* **2018**, 1, 571.

²⁵ Kracher, D., et. al. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 1676.

²⁶ Forsberg, Z., et. al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, 59, 54.

²⁷ Loose, J.S.M., et. al. *Biochemistry.* **2018**, 57, 4114.

²⁸ Petrovic, D.M., et. al. *Protein. Sci.* **2018**, 27, 1636.

reactivas de oxígeno derivadas.²⁹ En la **Figura 1.7** se muestra el mecanismo general de abstracción de átomo de hidrógeno propuesto para la combinación LPMO-H₂O₂.

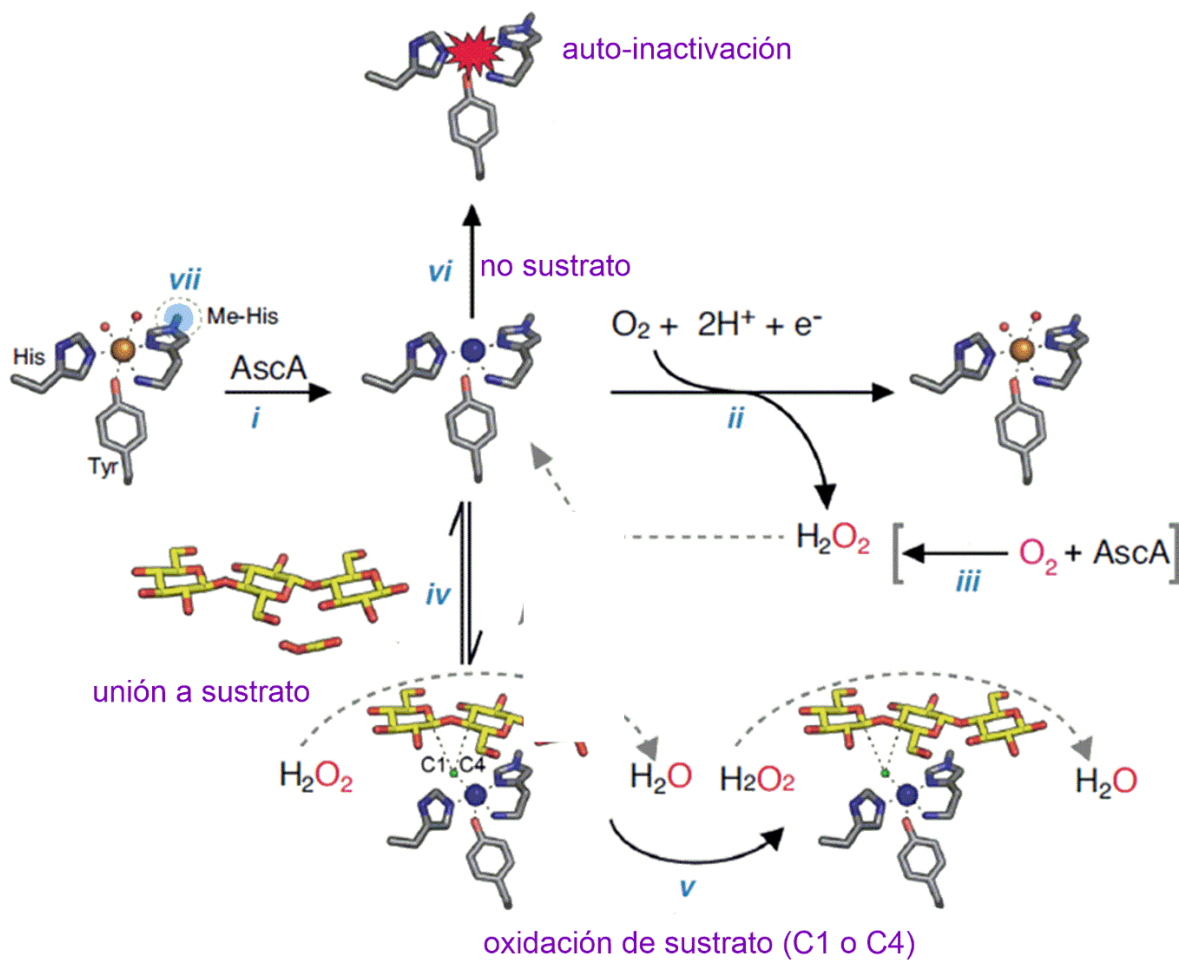


Figura 1.5. Reacciones involucradas en la catálisis por LPMO.²²

²⁹ Frandsen, K.E.H., et. al. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 298.

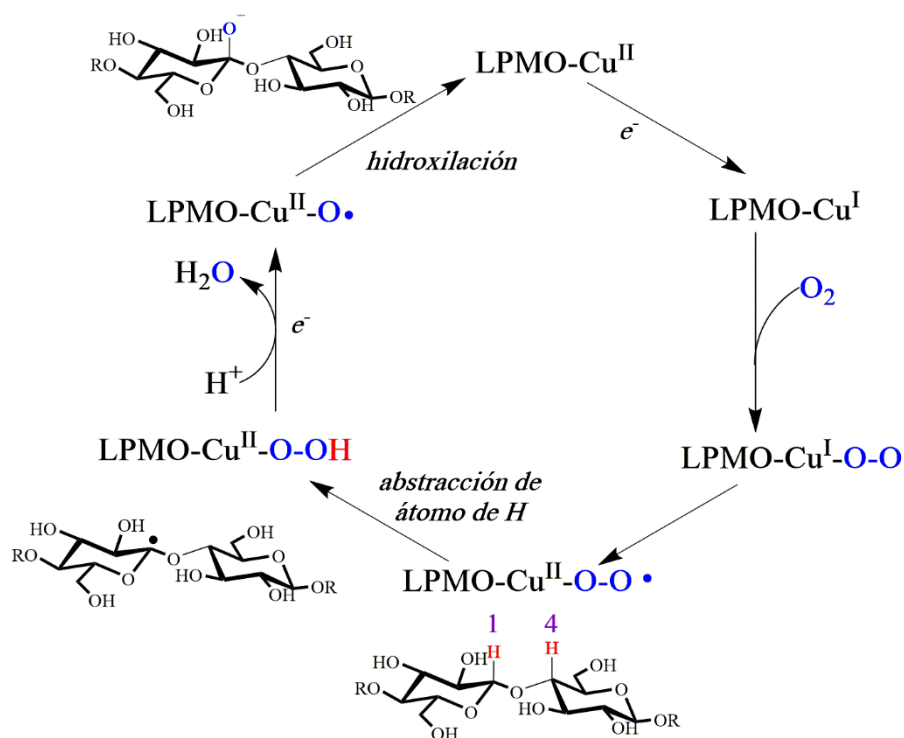


Figura 1.6. Propuesta de abstracción de átomo de hidrógeno para LPMO-O₂.¹⁵

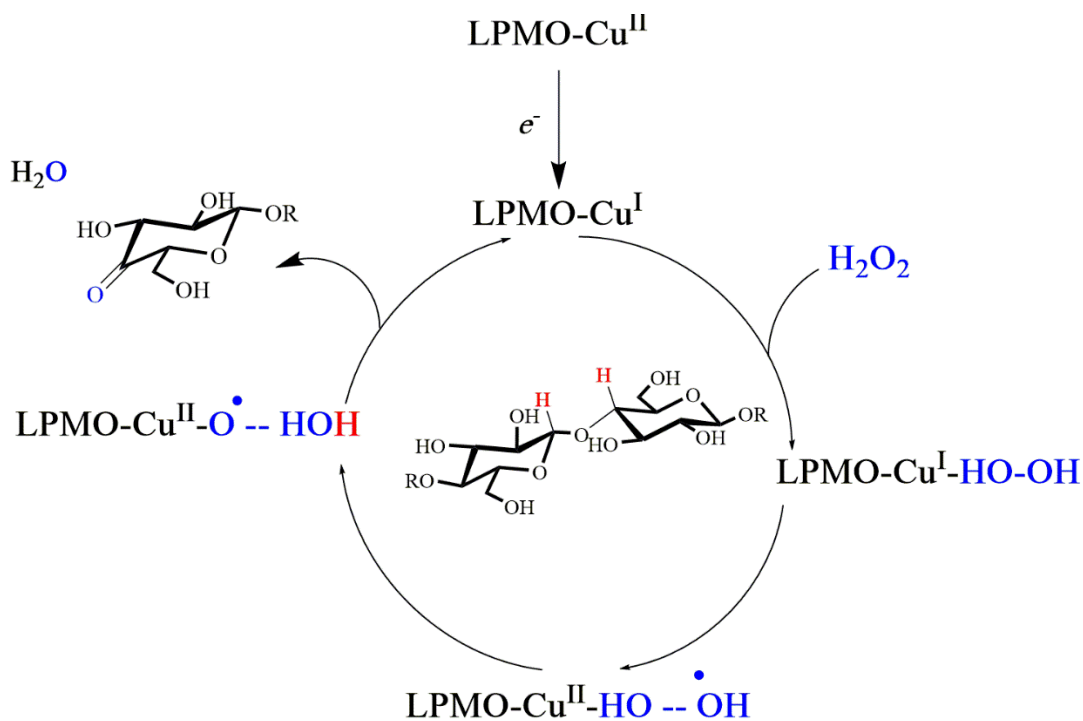


Figura 1.7. Propuesta de abstracción de átomo de hidrógeno para LPMO-H₂O₂.⁹

Biocombustibles de segunda generación y desafíos en la aplicación de las LPMO en el tratamiento de biomasa. El uso eficiente de biomasa no alimentaria como fuente de energía económicamente sostenible, ha estimulado los esfuerzos de investigación a nivel mundial. Esto se debe al potencial que tiene la sacarificación de materia recalcitrante abundante en la naturaleza, es decir la descomposición de material lignocelulósico en azúcares solubles para la posterior obtención de biocombustibles de segunda generación. En respuesta a la necesidad existente de biocombustibles, el uso de cocteles de hidrolasas glicosídicas (como los productos Cellic CTec de Novozymes y Accellerase de DuPont) identificadas a partir de organismos saprófitos³⁰ ha sido la ruta propuesta tecnológicamente y más recientemente, se ha incluido a dicha aplicación biocatalítica el uso de las LPMO,⁷ haciendo una contribución considerable a la eficiencia de estos cócteles.³¹ Sin embargo, se debe considerar que el costo de los mismos sigue siendo elevado y permanece como uno de los principales cuellos de botella para la comercialización exitosa de combustibles (como el etanol por fermentación) y productos químicos derivados de la lignocelulosa (como el ácido láctico para la elaboración de bioplásticos). Además, no se ha establecido una metodología que pueda aprovechar de manera óptima el potencial de las LPMO en el procesamiento de biomasa, dado que el conocimiento actual de su mecanismo catalítico no está claro y se deben realizar estudios más detallados que permitan determinar la estructura en disolución del sitio enzimático de Cu y cómo se relaciona esto con la reactividad, para potenciar el impacto de uso de estas potentes enzimas.

Las principales complicaciones de trabajar directamente con las enzimas LPMO, para la obtención de biocombustibles de segunda generación, se resumen en que: las reacciones secundarias son casi inevitables (especialmente cuando se usan sustratos complicados que pueden contener compuestos reductores o pequeñas cantidades de metales de transición); las LPMO reducidas que no están unidas al sustrato producirán H_2O_2 ³² en condiciones aeróbicas, mismo que puede participar en procesos que dañan cualquier enzima en la mezcla de reacción, (por ejemplo, a través de reacciones químicas de tipo Fenton),³³ aunque no hay duda de que el H_2O_2 también puede impulsar la reacción catalítica de varios LPMO; las LPMO reducidas son propensas a la auto-inactivación oxidativa, independientemente de si la reacción de LPMO es impulsada por O_2 ³⁴ o H_2O_2 ,³⁵ finalmente, la unión al sustrato protege contra la inactivación, pero las concentraciones de sustrato pueden cambiar significativamente durante ciertas configuraciones experimentales.

Así pues, el descubrimiento de las LPMO ha cambiado profundamente la forma en que vemos la conversión enzimática de los polisacáridos, en particular de los materiales de difícil degradación, como la quitina y la celulosa. El uso de O_2 como oxidante en un ambiente industrial, de forma análoga a como lo hacen estas metaloenzimas, es un reto a largo plazo de la comunidad científica,³⁶ pues la oxidación selectiva de sustratos orgánicos es

³⁰ Payne, C.M., et al. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 1308; Beeson, W.T., et al. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, 84, 923; Horn, S.J., et al. *Biofuels* **2015**, 5, 45.

³¹ Müller, G., et al. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, 11, 209.

³² Kittl R., et al. *Biotechnol Biofuels* **2012**, 5, 79.

³³ Scott, B.R., et al. *Biotechnol Lett* **2016**, 38, 425.

³⁴ Loose, J.S., et al. *Protein Sci.* **2016**, 25, 2175; Loose, J.S.M., et al. *Biochemistry* **2018**, 57, 4114.

³⁵ Kuusk S., et al. *J Biol Chem* **2018**, 293, 12284.

³⁶ Costas, M. et al. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 939; Chen, M.S., et al. *Science* **2007**, 318, 783; Que, L., et al. *Nature* **2008**, 455, 333; Garcia-Bosch, I., et al. *Chem. Eur. J* **2012**, 18, 2113.

inmensamente útil en la industria³⁷ y las LPMO sirven como prototipos para el desarrollo de catalizadores bioinspirados. Esto es cada vez más relevante para la obtención de materias primas y de biocombustibles de manera sostenible a partir de fuentes renovables. En este sentido, los principales esfuerzos de investigación en química bioinorgánica han sido dirigidos en últimos años hacia la obtención de biocombustibles, con énfasis en el desarrollo de complejos modelo que imitan varios aspectos de la estructura y función de las enzimas naturales.³⁸ Considerando su diseño específico, a menudo es posible atrapar intermediarios clave con tales sistemas para caracterizar la reactividad intrínseca con mucho mayor detalle que para las propias metaloenzimas, como se ahondará en el capítulo 2. El último desafío es entender el origen de la notable selectividad de los modelos bioquímicos y explotar los mismos conceptos para el desarrollo de catalizadores sintéticos eficientes.³⁹

Celobiosa y uso como modelo de polisacárido recalcitrante. La celobiosa o β -D-glucopiranosil(1-4) β -D-glucopiranososa, es un azúcar reductor de tipo disacárido, compuesto por dos unidades de D-glucosa unidas mediante enlace glicosídico β -(1,4), Figura 1.8. Esta se caracteriza por tener ocho grupos hidroxilo libres, un enlace acetal y un enlace hemiacetal, los cuales dan lugar a fuertes enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares. Se puede obtener mediante hidrólisis enzimática o ácida de celulosa y materiales ricos en celulosa.⁴⁰ Posee energía de enlace C-H de 95-100 kcal/mol, ventaja que postula a la celobiosa como un modelo celo-oligosacárido viable para el estudio de degradación oxidativa de polisacáridos recalcitrantes.

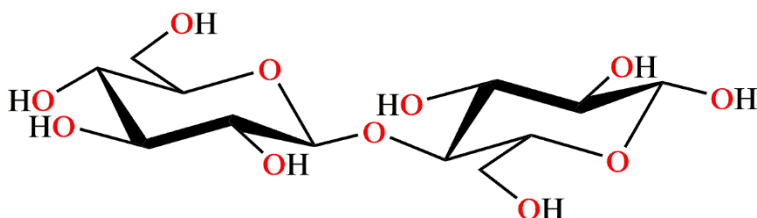


Figura 1.8. Estructura de la celobiosa

³⁷ Arakawa, H., et. al. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 953; Punniyamurthy, T., et. al. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2329.

³⁸ Schindler, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2311; Lewis, E.A., et. al. *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 1047; Itoh, S., et. al. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 592; Hatcher, L.Q., et. al., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 669; Citek, C., et. al. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2424; Mirica, L.M., et. al. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1013.

³⁹ Rolff, M., et. al. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4077; Lee, J.Y., et. al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 25, 184.

⁴⁰ Pan, X., et. al. *Biotech. and Bioeng.* **2005**, 90, 473; Vanderghem, C., et. al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 160, 2300.

Capítulo II. Modelos bioinspirados

La naturaleza ha inspirado a los químicos bioinorgánicos para diseñar y estudiar moléculas sintéticas que asemejen la estructura y/o funciones de sistemas metaloenzimáticos, dado que los centros metálicos en las proteínas a menudo adoptan estructuras novedosas y exhiben propiedades inusuales que vale la pena examinar y comprender.¹ Sin embargo, los sistemas enzimáticos gozan de complejidad estructural, lo que ha conducido al desarrollo de nuevas ideas fundamentales y a la generación de sistemas prácticos que han permitido evidenciar detalles mecanísticos de procesos tan relevantes como la reducción de dioxígeno, de la cual se han develado aspectos del mecanismo de protonación y/o enlaces de hidrógeno que acompañan a la transferencia de electrones.²

Un beneficio adicional de conocer la estructura y función de las metaloenzimas es su potencial aplicación en el diseño de catalizadores sintéticos. Tales catalizadores 'bioinspirados' o 'biomiméticos'³ pueden tener una ventaja sobre los sistemas metaloenzimáticos, en la medida en que podrían expandir el alcance de posibles sustratos, ligantes, disolventes, aumentar la escala de producción y ajustar la selectividad y/o especificidad, en rangos modestos de temperatura y para una gran variedad de procesos químicos. Además, los modelos inorgánicos sintéticos permiten acceso al estudio detallado de intermedios catalíticos/reactivos inferidos, pero no observados. Brindan también la oportunidad de controlar las propiedades del sustrato [$pK_a(H^+)$ y $E^0(e^-)$]. A menudo, los modelos pueden aprovechar las condiciones que algunos considerarían irrelevantes para la imitación funcional enzimática (como el uso de disolventes orgánicos, bajas temperaturas o pH no natural), para eliminar reacciones secundarias, solubilizar complejos de ligantes metálicos, estabilizar intermedios reactivos y/o controlar las interacciones de enlaces de H.⁴ Los modelos biomiméticos también son útiles para avanzar hacia una química catalítica respetuosa con el medio ambiente, evitando el uso de reactivos y oxidantes metálicos tóxicos, pasos de procesamiento que consumen energía y medios de reacción indeseables. Adicionalmente, los estudios mecanísticos de catalizadores biomiméticos pueden proporcionar información importante sobre las vías biológicas, completando así un ciclo de retroalimentación que relaciona los estudios de metaloenzimas con sus modelos sintéticos. De hecho, los recientes avances en el diseño de catalizadores de oxidación biológicamente inspirados que contienen centros de hierro y cobre de bajo costo y fácilmente disponibles, han llevado a una nueva comprensión de los aspectos fundamentales.⁵

Aspectos generales para diseño de modelos biomiméticos y bioinspirados. Las metaloproteínas son complejos metálicos con ligantes notablemente intrincados y complejos, en donde los grupos de iones metálicos distribuidos en las cadenas polipeptídicas de tipo amino, amido, amidato, imidazolil, imidazolato, guanidina, carboxilato, fenolato, oxo, tiolato y sulfuro, entre otros (a través de átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre). Todas las cadenas laterales de proteínas, puentes exógenos y ligantes terminales definen la primera esfera de

¹ Boulatov, R. *Pure Appl. Chem.* **2004**, 76, 303; Warren, J. J., et. al. *Biochemistry.* **2015**, 54, 1863.

² Karlin, K. et. Al. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 472.

³ Mahadevan, V., et. al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 228.

⁴ Pegis, M. L., et. al. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 11883.

⁵ Que, L., et. al. *Nature.* **2008**, 455, 333

coordinación del ion metálico y puede cumplir funciones estructurales, de almacenamiento, transferencia de electrones, unión a dioxígeno (para esta función, los metales de transición de la primera serie son los más apropiados)⁶ o catálisis. Para la mayoría de estos grupos de donadores, la coordinación al centro metálico requiere su desprotonación y la subsiguiente competencia entre los iones metálicos y el protón por la base libre. Por ello, la elección de los ligantes en el diseño de modelos biomiméticos, debe considerar los valores de pKa (que reflejan el carácter σ -donador y determina la interacción metal-ligante), de tal forma que se asemejen al sitio activo a emular. El enlace metal-ligante depende de la naturaleza detallada de los orbitales de valencia de los ligantes, así como de la carga nuclear efectiva y el número de coordinación y la geometría del ion metálico. Se han desarrollado muchas estrategias para la construcción de ligantes que contengan múltiples sitios de reacción y es importante enfatizar que, en particular para los quelatos con heterociclos nitrogenados, los complejos metálicos exhiben bandas de absorción de transferencia de carga extremadamente intensas, que reflejan enlaces ligante-metal altamente covalentes. Estos aportan contribuciones importantes a la estructura electrónica de un sitio activo y pueden verse afectados por la geometría del sitio metálico y la orientación del enlace.

Técnicas de caracterización de especies activas. Los estados de reposo e intermediarios reactivos generados por el sistema cobre-O₂ poseen absorciones electrónicas típicamente intensas y a menudo se encuentran en distintos rangos de energía. Así, su estudio podría considerarse privilegiado, si tenemos en cuenta las diferentes técnicas espectroscópicas que se pueden emplear para llevar a cabo la determinación estructural, geométrica y electrónica que da lugar a características espectrales únicas de los sitios activos en enzimas dependientes de cobre, y a su vez evaluar la contribución de la estructura electrónica en la alta reactividad y selectividad de estos sitios activos en la catálisis. La espectroscopia ha jugado un papel importante: desde la absorción de rayos X (XAS), absorción de rayos X de estructura fina extendida (EXAFS), espectroscopia Raman resonante (Rr), resonancia paramagnética electrónica (RPE), espectroscopía UV-vis, entre otras.⁷ Sin embargo, los complejos cobre-dioxígeno son una clase particularmente sensible de compuestos de coordinación, y las formas oxigenadas de Cu (II) y Cu (III) son casi sin excepción sensibles a la temperatura (la mayoría de las especies de cobre-dioxígeno solo son estables entre -78 y -125 °C).⁸ Por otro lado, el uso de bajas temperaturas para los estudios en disolución en lugar de representar un obstáculo, proporciona información mecanística que solo se alcanza tras el ajuste de la cinética reduciendo la energía térmica.⁹ Además, este tipo de estudios han permitido proponer candidatos como las especies reactivas clave en varias clases de enzimas de cobre, enriqueciendo el debate sobre los mecanismos por los cuales operan (como por ejemplo el problema común sobre si la ruptura del enlace O–O ocurre antes, durante, o después del ataque al sustrato orgánico).¹⁰

Aductos biomiméticos Cu-O₂. Se ha dedicado un esfuerzo considerable para la comprensión de los mecanismos de activación de oxígeno en enzimas monooxigenasa con sitios mono o

⁶ Tyeklar, Z., et. al. *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 241; Sorell, T.N. *Tetrahedron* **1989**, 45, 3; Mirica, L.M., et. al. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1013.

⁷ Holm, R.H., et. al. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239.

⁸ Mirica, L.M.; et. al. *Science* **2005**, 308, 1890.

⁹ Citek, K., et. al. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2424.

¹⁰ Adam, S.M., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 472.

dinucleares de cobre, ya sea que contengan o no grupos hemo como ligantes.¹¹ Como fruto de dichos estudios, se ha planteado una hipótesis mecanística general para la activación de oxígeno por dichos complejos, **Figura 2.1**. Se da inicio a la activación reductiva cuando reacciona una forma reducida de cobre(I) y O₂ para generar un intermediario cobre(II)-superóxido terminal o lateral (^ES, ^SS), el cual toma un electrón y un protón para formar un intermediario metal-hidropéroxido. Al ocurrir la escisión O-O el siguiente paso puede ser la formación de una especie oxilo; alternatively, las especies metal-superóxido pueden interactuar con otro centro metálico Cu(I) y generar un intermediario péroxido-cúprico (^SP, ^TP o ^CP) que por ruptura del enlace O-O puede dar lugar a la formación del intermediario bis(μ-oxo)Cu^{III}₂(O). Por otro lado, los complejos de cobre(II)-hidropéroxido mononucleares pueden ser estabilizados por una interacción de enlace de hidrógeno con el oxígeno proximal y desestabilizados por una interacción de enlace de hidrógeno con el oxígeno distal **Figura 2.2**.¹² Además, puede darse un reordenamiento de cobre(II)-hidropéroxido (H) a cobre(II)-péroxido (P).

¹¹ Costas, M., et. al. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 939; Nam, W. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 465.

¹² Yamaguchi, S., et. al. *Bull. Chem. Soc Jpn.* **2005**, 78, 116.

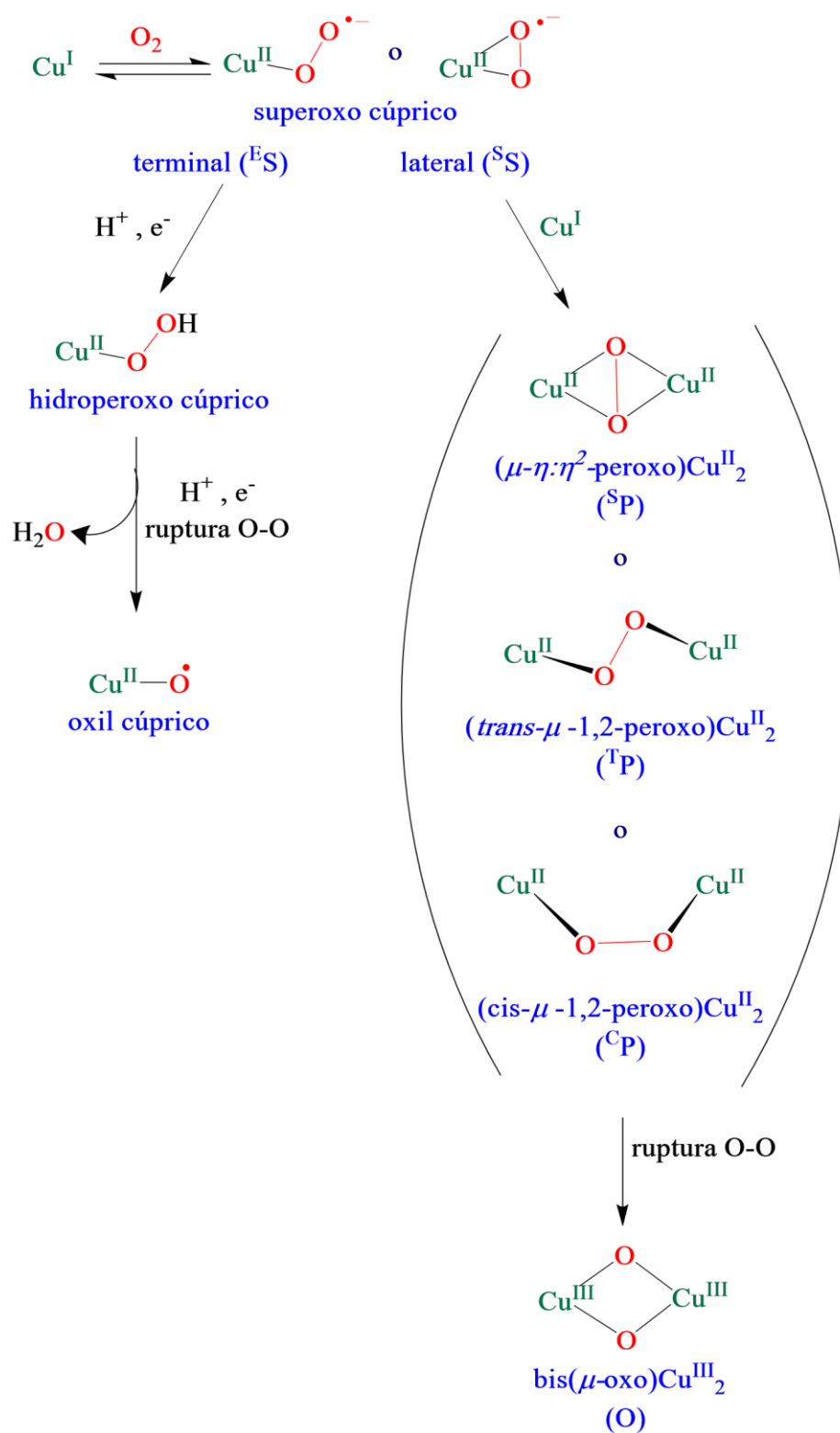


Figura 2.1. Posible mecanismo para la activación reductiva de O_2 en un sitio activo de cobre mononuclear o dinuclear.⁷

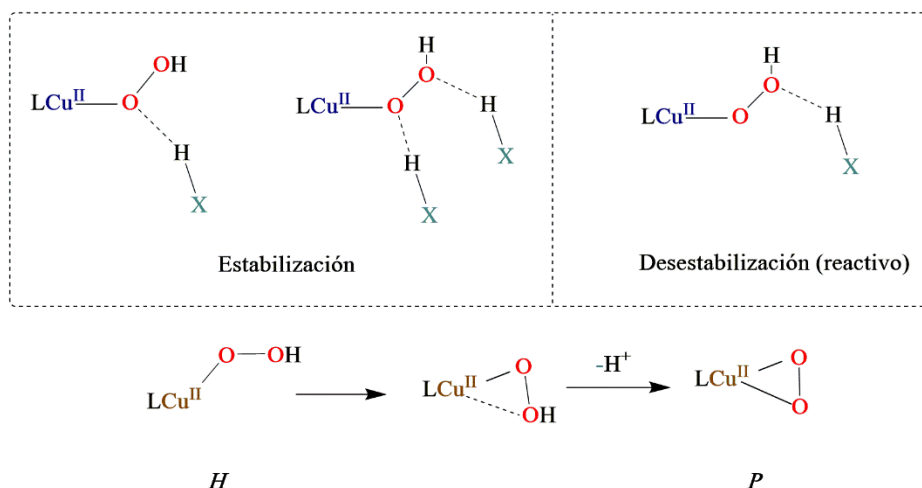


Figura 2.2. Generalidades respecto a la estabilidad o reactividad impuesta por el enlace de H a átomos de O proximales frente a distales para complejos de LCu^{II}-OOH y reordenamiento de hidropéroxido-peroxo.⁷

La variedad de modos de coordinación de dioxígeno y nuclearidades de cobre a las que se puede acceder dependen del diseño selectivo de ligantes (denticidad, capacidad donadora y estructura del ligante),¹³ y de las condiciones de oxigenación. Los rendimientos y tipos de complejos están estrictamente dictados por la elección de condiciones sintéticas; la temperatura, tipo de disolvente y contra-aniones pueden ser puntos críticos. Cabe anotar que por medio de estudios de modelado, solamente se incluye la incorporación de ciertos aspectos del sitio activo de una enzima para mantener la capacidad de hacer estudios sistemáticos que relacionan aspectos particulares de causa y efecto.

Los complejos binucleares son los más reportados y hasta la fecha, la mayoría de los ligantes utilizados para los estudios de reactividad Cu^I/O₂ son variantes de aminas bi-, tri- y tetradentadas, incluidos los donadores de amina alifáticas desde primarias hasta terciarias, así como gran variedad de piridinas. En la **Tabla 2.1** se ilustra la arquitectura de algunos de los ligantes que se han empleado en estudios de activación de oxígeno;¹⁴ de estos ligantes, los datos espectroscópicos y estructurales obtenidos para los complejos mononucleares de cobre(II)-superoxo (S) y cobre (III)-peroxo (P) se resumen en la **Tabla 2.2**.¹⁴ Como estrategia sintética, para la obtención de aductos cúprico superóxido se incluye la modificación de las propiedades electrónicas o estructurales del entorno de coordinación de cobre empleando con mayor frecuencia ligantes tripodales tetradentado (N4) o tridentados (N3). Estas especies generalmente presentan espectros ópticos que muestran una señal de absorción intensa alrededor de 410-430 nm y señales amplias de absorción de baja energía (~600-800 nm) y frecuencias de estiramiento en rR de $\nu(\text{O}-\text{O}) = 1110\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ y $\nu(\text{Cu}-\text{O}) = 460\text{-}480\text{ cm}^{-1}$ (las frecuencias varían según se trate de ^ES o ^SS).¹⁵

¹³ Cramer, C. J., et. al. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 601.

¹⁴ Itoh, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 115; Hatcher, L., et.al. *Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 669; Mirica, L. et. al. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1013; Lewis, E.A., et. al. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1047.

¹⁵ Elwell, C.E., et. al. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 2059.

Las especies hidropéroxido cúprico presentan bandas UV-vis características alrededor de 330-380 nm y frecuencias de estiramiento rR más bajas que para aductos análogos cúprico superóxido ($\nu(\text{O}-\text{O}) = 830-900 \text{ cm}^{-1}$) que sus análogos de superóxido (a causa de la reducción del orden de enlace O-O).¹⁶ Para la síntesis de este tipo de complejos, se han usado generalmente ligantes tripodales tetradentados.¹⁷ Las especies de oxilo cúprico (o cuprilo) aún no han sido observadas experimentalmente en disolución, ni en modelos sintéticos ni en enzimas,¹⁸ pero han sido consideradas como oxidantes potencialmente poderosos en la abstracción de átomo de H en estudios computacionales de ciclos catalíticos de monooxigenasas de cobre.¹⁰ Las entidades cuprilo han sido observadas solo en la fase gaseosa, donde se ha demostrado que son capaces de atacar los fuertes enlaces C-H en metano (104 kcal/mol).¹⁹ Características espectrales generales de UV-vis, Raman resonante y parámetros estructurales para los isómeros binucleares trans- μ -1,2-peroxo, μ - η^2 : η^2 -peroxo lateral y bis- μ -oxo se indican en la **Figura 2.3**.⁶ Los mismos son intermediarios activos críticos en la función de muchas metaloproteínas a base de cobre, cumpliendo diversas funciones de estas proteínas como el transporte de dióxígeno, hidroxilación de tirosina, oxidación de catecol y activación del enlace C-H.

¹⁶ Tano, T., et. al. *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 10431.

¹⁷ Mareque-Rivas, J.C., et. al. *Dalton Trans.* **2006**, 2316.

¹⁸ Donoghue, P.J., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17602; Dhar, D., et. al. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 1075.

¹⁹ Dietl, N., et. al. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 5544; Rijs, N.J., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 3125.

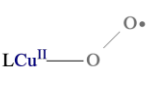
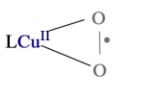
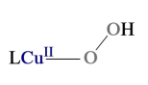
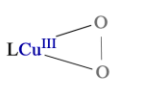
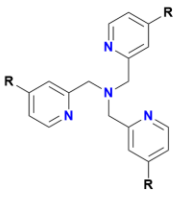
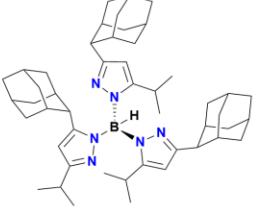
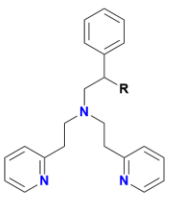
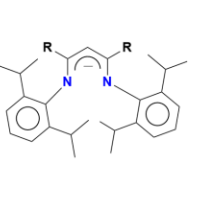
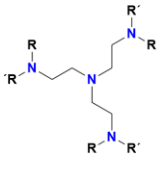
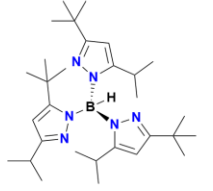
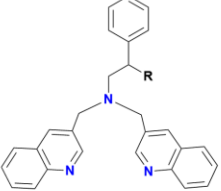
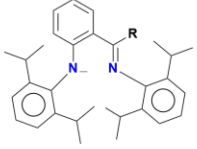
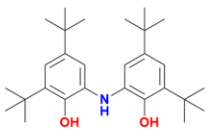
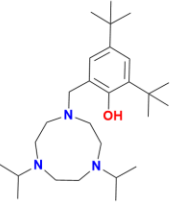
E_S	S_S	H	P
			
 TPA ^R	 HB(3- <i>t</i> -Ad-5- <i>i</i> -Prpz) ₃ ⁻	 Pye ^R	 Dk ^R
 tren ^{R,R'}	 HB(3- <i>t</i> -Bu-5- <i>i</i> -Prpz) ₃ ⁻	 Quim2 ^R	 Ai ^R
 DPH ₃	 TACN ^{PhOH}		

Tabla 2.1. Algunos ligantes usados para preparar intermediarios Cobre(II)-superoxo, Cobre(II)-hidroperoxo y Cobre(III)-peroxo.⁶

Lig_		UV-vis λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1} cm^{-1}$)	$\nu(^{16}O-^{16}O)/cm^{-1}$ ($\Delta(^{18}O)/cm^{-1}$)	$\nu(Cu-^{16}O)/cm^{-1}$ ($\Delta(^{18}O)/cm^{-1}$)	$d_{O-O}/\text{\AA}$
TPA ^H	$\eta^1 (S_E)$	410 (4000), 747 (1000)			
Tren ^{H,Bn}	$\eta^1 (S_E)$	412			
Tren ^{Me,Bn}	$\eta^1 (S_E)$	416 (~5400), 591 (~1640), 737 (~2340)	1120 (61)	474 (20)	
Tren ^{Me,Me}	$\eta^1 (S_E)$	414	1122		
Tren ^{TMG}	$\eta^1 (S_E)$	442, 690	1117 (58)		
DPH ₃	$\eta^1 (S_E)$	524, 650	964 (55)		
HB(3- <i>t</i> -Bu-5- <i>i</i> -Prpz) ₃	$\eta^2 (S_S)$		1112 (52)		1.22
HB(3-Ad-5- <i>i</i> -Prpz) ₃	$\eta^2 (S_S)$	383 (~200), 452 (~300), 699 (~40), 980 (~25)	1043 (59)	554 (20)	
TACN ^{PhOH}	$\eta^2 (S_S)$	416 (4600), 654 (1800)	1120 (62)	450 (8), 422 (5)	
Dk ^{Me}	$\eta^2 (P_I)$	~385 (~2400), ~600 (~200)	968 (51)		1.392
Al ^{Me}	$\eta^2 (P_I)$	390 (~7600), 645 (~250)	974 (66)		1.392

Tabla 2.2. Datos espectroscópicos y estructurales para los complejos mononucleares de cobre(II)-superoxo (S) y cobre (III)-peroxo (P).

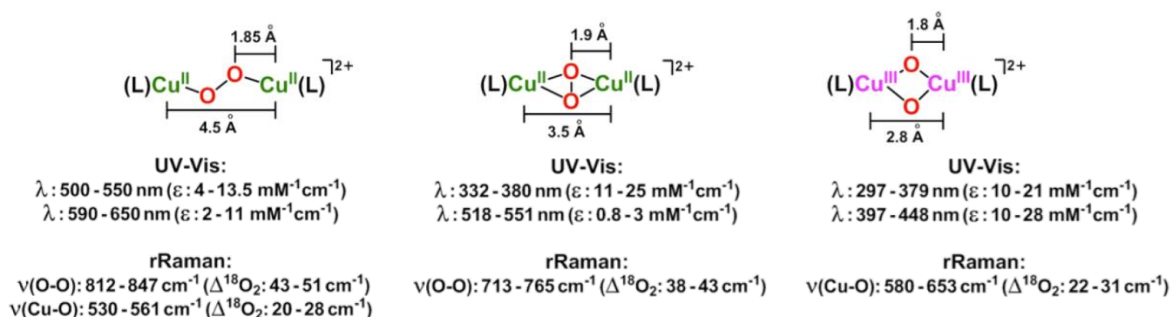


Figura 2.3. Características espectrales generales de UV-vis, Raman resonante y parámetros estructurales para los isómeros trans- μ -1,2-peroxo (^TP), μ - $\eta^2:\eta^2$ -peroxo lateral ($^{\delta}\text{P}$) y bis- μ -oxo ($^{\text{O}}$), de izquierda a derecha respectivamente.⁶

Modelos biomiméticos LPMO. Hasta la fecha se han informado pocos complejos de cobre biomiméticos inspirados en metaloenzimas LPMO, ver **Figura 2.4.**^{20,21} Estos precedentes de sistemas inorgánicos muestran ser capaces de escindir derivados de glucosa presentando al 4-nitrofenolato como grupo saliente, a excepción del trabajo publicado en nuestro grupo de investigación, donde se usó celobiosa y se detectan productos oxidativos de glucosa (ver sección de resultados).²¹ Se han sugerido como intermedios reactivos complejos cúprico-superoxo y oxilo, sin embargo, esto es aún tema de debate y solo a través de modelos sintéticos se puede obtener más información mecanística.

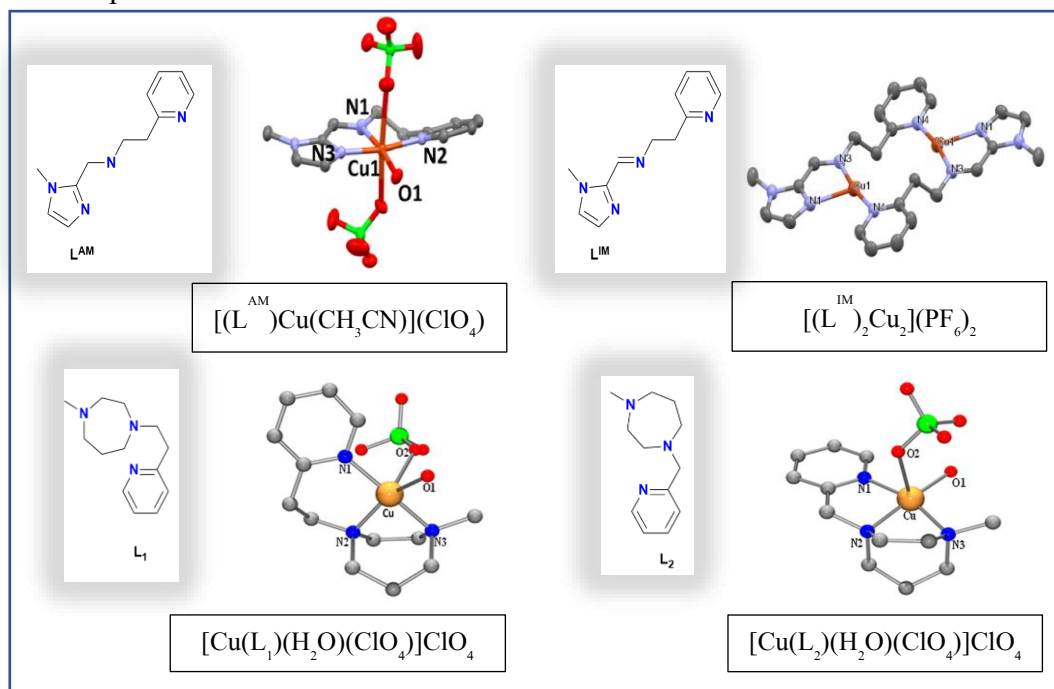


Figura 2.4. Ligantes y complejos biomiméticos inspirados en metaloenzimas LPMO.²⁰

²⁰ Concia, A.L., et. al. *Inorg. Chem.* **2017**, 56, 1023; Neisen, B.D., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 10220; Muthuramalingam, S., et. al. *J. Catal.* **2019**, 372, 352;

²¹ Neira, A.C., et. al. *ACS Omega.* **2019**, 4, 10729.

Capítulo III. Planteamiento del problema, Hipótesis y Objetivos

Planteamiento del problema

Los modelos inorgánicos inspirados en sitios activos de sistemas metaloenzimáticos ha permitido complementar el estudio estructural, espectroscópico y electrónico de dichas biomoléculas, teniendo en cuenta que se pueden variar factores como el diseño, síntesis, características catalíticas, tipo de ligantes y disolventes.¹ En este sentido, el desarrollo de modelos sintéticos ha facilitado la comprensión de los factores que rigen los detalles íntimos de la activación de O₂ y su reactividad mediada por metaloenzimas. Para estudios del par redox Cu^{III/I} en oxidaciones selectivas de una amplia gama de sustratos orgánicos,² el uso de ligantes tipo quelato provee al ion metálico condiciones electrónicas y geométricas que asisten la catálisis y además proveen estabilidad a los complejos de inspiración biológica.

En virtud de su pKa (6.17)³ y propiedades σ -donadoras y π -aceptoras, el heterociclo imidazol de la histidina es ubicuo en la naturaleza para la unión de metales de transición en los sitios activos de diversas metaloenzimas, dentro de las cuales se encuentran las LPMO. Es por esta razón que el desarrollo de ligantes N-donadores afines a dicho heterociclo se perfila como el arreglo ideal para el desarrollo de complejos biomiméticos; sin embargo, informes sobre ligantes quelantes de complejos de cobre a base de imidazoles siguen siendo escasos.

Complementariamente, la química de los ligantes basados en bencimidazol parece estar madurando rápidamente dada su accesibilidad sintética y características fundamentales. Teniendo en cuenta las consideraciones previas, y la estructura del sitio activo de las LPMO, el ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina (**2BB**) en la **Figura 3.1** se propone como un candidato viable para estudios espectroscópicos y estructurales de complejos de cobre, dado que además de presentar el átomo de nitrógeno metilado de forma análoga a la de los imidazoles del abrazo de histidina en las LPMO,⁴ el valor de pKa del 2-metilbencimidazol protonado es de 6.10.⁵

¹ Holm, R.H., et. al., *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239.

² Lewis, E.A., et al., *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1047; Himes, R.A., et. al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 119; Mealli, C. et. al., *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 711.

³ Thompson, L.K., et. al., *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 1311.

⁴ Hemsworth, G.R., et. al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 6069.

⁵ Ülküseven, B., et. al., *Rev. Inorg. Chem.* **2001**, 21, 36.

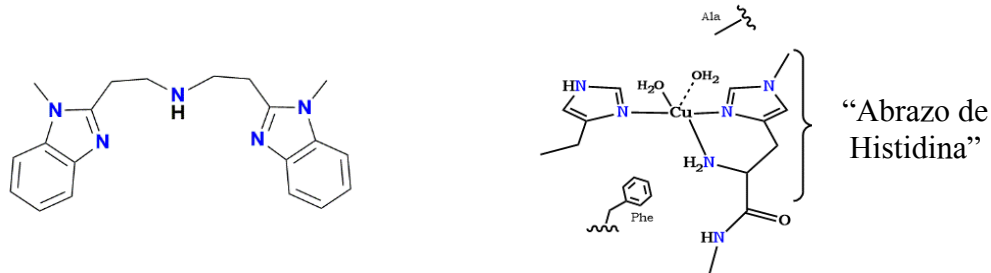


Figura 3.1. Ligante empleado bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina (**2BB**)⁶ y sitio activo de las enzimas LPMO AA9-AA11.⁷

Hipótesis

El diseño de complejos de cobre que presenten un ambiente estructural, electrónico y funcional análogo al de las monooxigenasas líticas de polisacárido, a partir del ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina (**2BB**), permitirá esclarecer detalles mecanísticos del proceso de oxidación de polisacáridos recalcitrantes por parte de las LPMO. Se propone que estudios espectroscópicos y de reactividad permitirán identificar factores que brindan al sistema la capacidad para degradar a la celobiosa como modelo del polisacárido celulosa.

Objetivo General

Sintetizar, caracterizar y estudiar la reactividad de complejos de coordinación biomiméticos de Cu en sus distintos estados de oxidación (I y II) con donadores N bencimidazólicos frente a oxígeno y peróxido. Obtener de esta forma información sobre el modo de degradación de los polisacáridos por parte de las metaloenzimas LPMO con el disacárido celobiosa como sustrato modelo.

Objetivos Particulares

- Diseñar, sintetizar y caracterizar ligantes que contengan en su esqueleto átomos donadores N de grupos bencimidazol con disposición similar a los sitios activos de LPMO.
- Sintetizar y caracterizar complejos de cobre en sus dos estados de oxidación más comunes Cu(I) y Cu(II) con los ligantes obtenidos.
- Estudiar el efecto de los ligantes sobre el potencial de media onda de par redox Cu(II)/Cu(I), así como sobre la reactividad frente a O₂, KO₂ y peróxido en presencia de sustratos modelo.
- Realizar pruebas de degradación de celobiosa a escala preparativa empleando los complejos de Cu(I) y Cu(II) obtenidos, con los agentes oxidantes: O₂, KO₂, H₂O₂, H₂O₂/Et₃N.

⁶ Sorrell, T.N., et.al., *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 207; Casella, L., et. al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 3203.

⁷ Quinlan, R.J. et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2011**, 108, 15079.

Capítulo IV. Resultados y Discusión

A partir del ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina (**2BB**)¹ se sintetizó el complejo de cobre [(**2BB**)Cu]OTf buscando emular el sitio activo de las LPMO en estado reducido y así comparar con los parámetros obtenidos para el complejo cúprico [(**2BB**)Cu(H₂O)₂](OTf)₂, que previamente se sintetizó en el grupo de investigación.²

Caracterización del complejo [(**2BB**)Cu]OTf

Con el objetivo de realizar la coordinación de O₂ y llevar a cabo los estudios de reactividad posteriores, inicialmente se hicieron intentos para aislar los complejos cuprosos de (**2BB**), empleando las sales de tetrafluoroborato y hexafluorofosfato. Sin embargo, dichos intentos se vieron obstaculizados por la baja solubilidad de los complejos en diclorometano.² Por otra parte, el uso de aniones de trifluorometanosulfonato (triflato, OTf) resultó en especies solubles en acetonitrilo apropiado para realizar caracterización de disoluciones y estudios de reactividad. La espectrometría de masas con electrospray (ESI) reveló la presencia de un pico a m/z 396, asignado a la especie monomérica [(**2BB**)Cu]⁺, **Figura 4.1**. La caracterización adicional por espectroscopía RMN ¹H y FTIR confirmó la identidad de [(**2BB**)Cu]⁺OTf; su espectro de ¹H NMR en CD₃CN muestra señales aromáticas relativamente amplias para los grupos bencimidazol a δ 7,46, 7,26 y 7,11 ppm, la resonancia para los grupos N-metilo se observó a δ 3,42, mientras que los protones de metileno dieron lugar a resonancias a δ 3.21 (-CH₂-N) y 3.02 ppm (-CH₂-C), **Anexo Figura 8.1**. La espectroscopía FTIR mostró bandas en 3273 cm⁻¹ (d) asignadas al estiramiento NH de amina central, 1027 y 1257 cm⁻¹ (f) asignadas a bandas de estiramiento SO del anión triflato, así como un par de bandas fuertes a 1147 y 1227 cm⁻¹ según lo firmado a las vibraciones de estiramiento CF; se asignó la banda a 1614 cm⁻¹ al modo de estiramiento C=N basado en bencimidazol, **Anexo Figura 8.2**. Las principales diferencias espectrales en infrarojo con el complejo cúprico previamente reportado [(**2BB**)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂, incluyen las frecuencias del estiramiento NH (d) a 3241 cm⁻¹, la intensidad ligeramente más alta del modo de estiramiento C=N observado previamente a 1617 cm⁻¹, y el hombro a 3356 cm⁻¹ que se asignó a los modos de estiramiento OH en el complejo cúprico. [(**2BB**)Cu]⁺OTf se disolvió en una cantidad mínima de CH₃CN anhidro en la caja de guantes y después de la evaporación lenta se obtuvieron cristales incoloros con calidad suficiente para llevar a cabo análisis de rayos X, cuyos parámetros se referencian en las **Tablas Anexo 8.1-8.3**.

¹ Sorrell, T.N., et.al., *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 207; Casella, L., et. al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 3203.

² Casella, L., et. al. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 1101; Castillo, I., et. al., *Inorg. Chim. Acta.* **2014**, 422, 152.

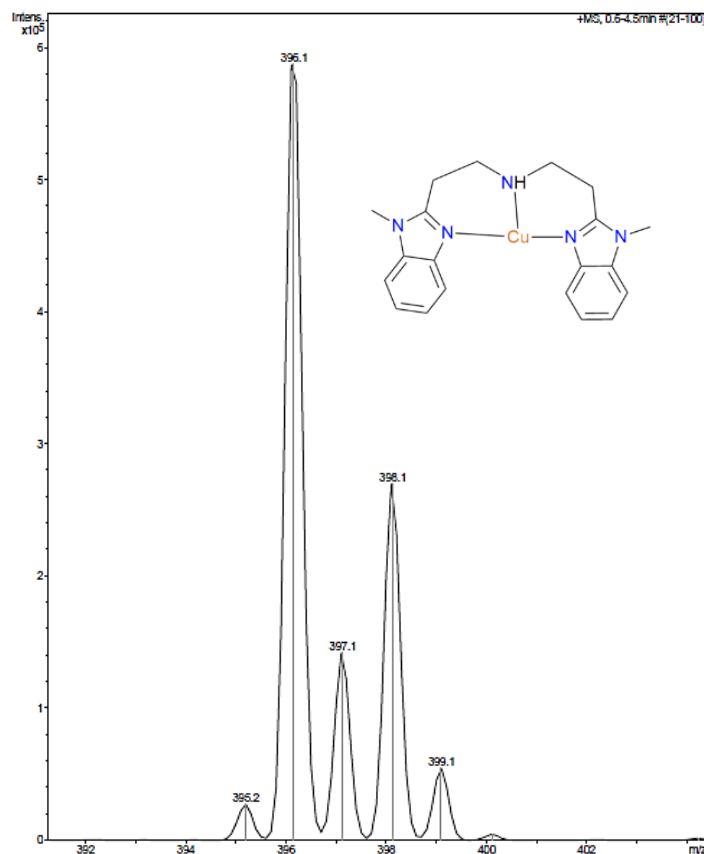


Figura 4.1. ESI-MS de $[(2BB)Cu^I]OTf$ en CH_3CN .

Estructuras en estado sólido del sistema $[(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+}$

En estado sólido los dos complejos obtenidos con el sistema (2BB) se caracterizan por presentar coordinación tridentada del ligante al metal con un entorno de coordinación en forma de T (**Figura 4.2**) y parámetros métricos comparables a los observados en las LPMO (en su forma reducida y oxidada respectivamente, señaladas en la **Tabla 4.1**). El complejo $[(2BB)Cu(H_2O)_2](OTf)_2$, presentó parámetros de enlace en el rango de los sitios activos de LPMO (distancias Cu-N ~ 1.98 Å, ángulos N-Cu-N de $\sim 97^\circ$ y $\sim 165^\circ$).

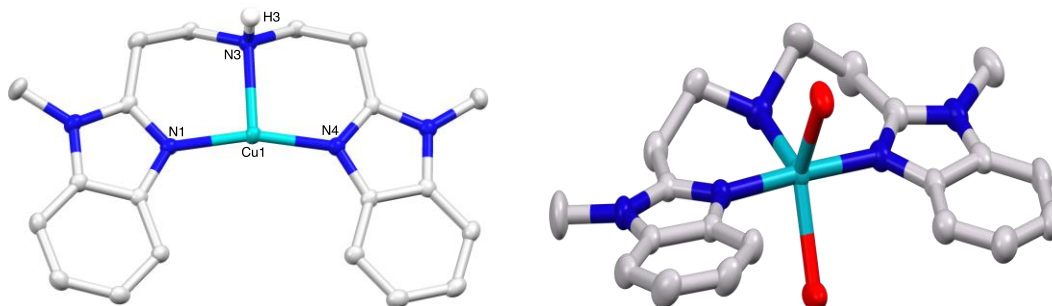


Figura 4.2. Diagrama Mercury a probabilidad del 50% del (a) catión $[2BBCu]^+$ y (b) dicatión $[2BBCu(H_2O)_2]^{2+}$. Los átomos de H -excepto H3 en la amina central en 4.2(a)- y el contraión triflato se omiten para mayor claridad. Código de color: C, gris; N, azul; O, rojo; Cu, turquesa.

Enlace	Cu(I)LsAA9A	Enlace	[(2BB)Cu]OTf
Cu-NH ₂ (His1)	2.2	Cu1-N3	2.17
Cu-Nσ (His1)	1.9	Cu1-N4	1.90
Cu-Nε (His78)	2.0	Cu1-N1	1.90
Ángulo		Ángulo	
Nσ-Cu1-Nε	165°	N4-Cu1-N1	164.54°
Nσ-Cu1-NH ₂	97°	N4-Cu1-N3	98.01
Nε-Cu1-NH ₂	97°	N1-Cu1-N3	96.82
Enlace	Cu(II)LsAA9A	Enlace	[(2BB)Cu(H ₂ O) ₂](OTf) ₂
Cu-NH ₂ (His1)	2.3	Cu1-N3	2.15
Cu-Nσ (His1)	2.0	Cu1-N4	1.95
Cu-Nε (His78)	2.0	Cu1-N1	1.95
Ángulo		Ángulo	
Nσ-Cu1-Nε	170°	N4-Cu1-N1	~165°
Nσ-Cu1-NH ₂	92°	N4-Cu1-N3	~97°
Nε-Cu1-NH ₂	92°	N1-Cu1-N3	~97°

Tabla 4.1. Longitudes y ángulos de enlace entre los complejos [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu(H₂O)₂](OTf)₂ y sus correspondientes en LsAA9 oxidada y reducida.

En contraste, el complejo [(2BB)Cu]^{I+}, **Figura 4.2(a)**, el ángulo abierto N1-Cu1-N4 de 165° es idéntico al correspondiente en los sitios activos AA9-AA1,¹ mientras que los dos ángulos cerrados N3-Cu1-N4 y N1-Cu1-N3 de 98.01° y 96.82° respectivamente, son equivalentes a los de 97° en LPMO. En la **Tabla 4.1** se presenta una comparación de las distancias de enlace, que muestra una distancia de Cu-N mayor al donador de nitrógeno central que la de los átomos de N del bencimidazol. Curiosamente, el anión triflato interactúa con [(2BB)Cu]^{I+} a través de enlaces de hidrógeno con la amina central NH, definida por una distancia O2...N3 de 3.363(3) Å, y un ángulo O2...H3-N3 de 149(2)°. Queda de esta manera evidenciado que estructuralmente, el sistema que provee el ligante (2BB) a los complejos [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu(H₂O)₂](OTf)₂, es comparable al conferido por el ambiente del sitio activo en las LPMO.

Estudios en disolución de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂

Para determinar especiación del complejo cúprico en disolución acuosa, se hicieron estudios de equilibrio, estableciendo así la naturaleza del complejo. La titulación potenciométrica de 2BB proporcionó valores de pKa de 3.68, 4.86 y 7.84 para las formas protonadas de los dos sitios bencimidazólicos y de la amina central, respectivamente. Los valores para los sitios bencimidazólicos son más bajos (en agua a 25°C) que los de bencimidazol reportado en 5.58² para 1-metilbencimidazol, 4.88 para 1-etilbencimidazol, e incluso 1-metil-5-clorobencimidazol en 3.88.³ Después del refinamiento de los datos potenciométricos con el software Hyperquad,⁴ la constante de estabilidad para [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂]²⁺ se determinó en log K = 12.44, considerando la temperatura, los volúmenes y las concentraciones de analitos (HNO₃, NaOH, biftalato de potasio, (2BB), y su complejo cúprico, ver **Figura 4.3**). Este valor de log K es alto en comparación con los de Cu(II) con 2-hidroximetilbencimidazol bidentado y 1-metil-2-hidroximetilbencimidazol, reportados en 9.30 y 9.66.⁴

¹ Frandsen, K. E. H., et. al. *Carbohydrate Res.* **2017**, 448, 187

² Quinlan, R., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 2994.

³ Davies, T., et. al. *Pharm. Pharmacol.* **1951**, 3, 420.

⁴ Gans, P., et. al. *Talanta*, **1996**, 43, 1739.

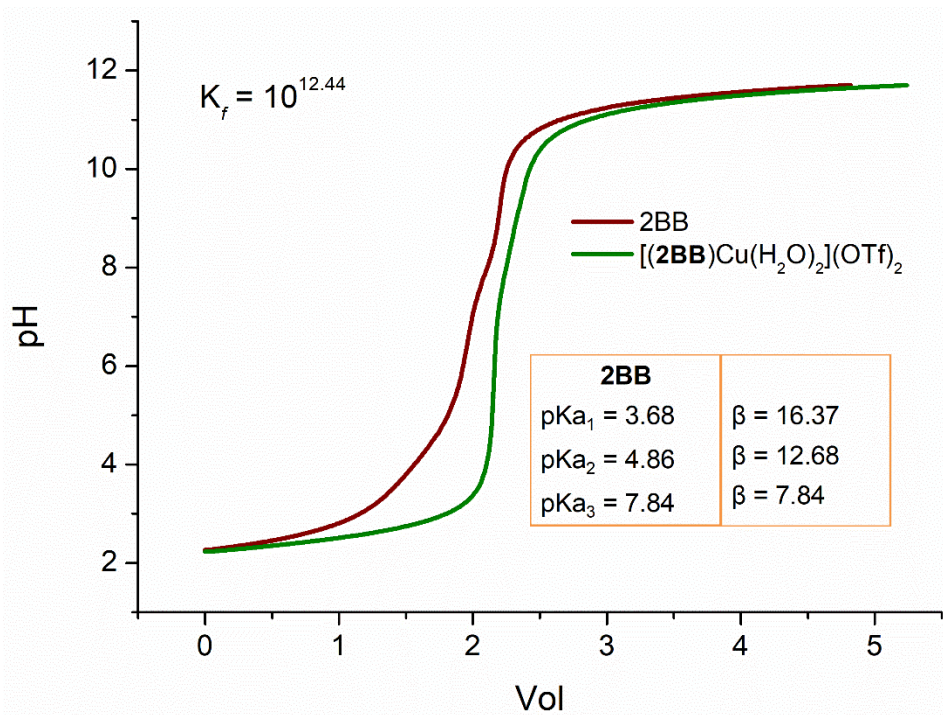


Figura 4.3. Valoración potenciométrica de **(2BB)** y $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ con NaOH 0.1 M (β denota constante acumulativa o global y K_f la constante por etapas). Se obtuvieron 486 puntos para la titulación de **2BB** y 525 para $[(2BB)Cu(H_2O)_2](OTf)_2$; simulaciones de constantes ajustadas al modelo con χ^2 menor a 12.6 con 95% de confianza, ver sección experimental.

La distribución de especies se determinó con el software MEDUSA⁵ (manteniendo la fuerza iónica en 0.1 M con NaNO₃) y se muestra que la especie dicatónica $[(2BB)Cu^{II}]^{2+}$ predomina claramente en el rango de pH de 4-8, ver **Figura 4.4**. Una o dos moléculas de agua probablemente se coordinen con el ión cúprico en disolución para formar $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_n]^{2+}$ ($n = 1, 2$), como se observa en el estado sólido.⁶ Curiosamente, se predice que una especie monodeprotonada presente alrededor de pH 7.5 y superior, que se asignó a un complejo cúprico-hidroxo $[(2BB)Cu^{II}(OH)(H_2O)_{n-1}]^+$, con $\log K = 15.88$, probablemente en forma de un dímero puenteado $[\{(2BB)Cu^{II}(H_2O)_{n-1}\}_2(\mu-OH)_2]^{2+}$. Este tipo de especies se favorecería sobre un complejo con una amina central desprotonada, basado en la evidencia experimental adicional para un complejo de dicobre con puente de hidroxilo, como se describirá más adelante. Apoyo adicional acerca de la preferencia de deprotonación de una molécula de agua coordinada sobre la de un donador amino, se encuentra en estudios que refieren el incremento de la acidez de 1-3 unidades logarítmicas⁷ en los valores de pKa de ligantes biológicamente relevantes, como efecto de la coordinación de metales. Estas observaciones sugieren que la posible participación de una amina desprotonada durante el ciclo catalítico puede descartarse en nuestro sistema, y también en el sitio activo de LPMO. Es de resaltar además que, en el sistema enzimático, la desprotonación propuesta de la amina terminal en el abrazo de

⁵ Puigdomenech, I. MEDUSA: make equilibrium diagrams using sophisticated algorithms. KTH, Stockholm; **2009**.

⁶ Castillo, I., et. al. *Inorg. Chim. Acta*. **2014**, 422, 152.

⁷ Martin, R.B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 4346.

histidina⁸ parece poco probable cerca del pH neutro,⁹ particularmente considerando las determinaciones de los valores de pKa de grupos amino terminales en complejos de péptidos ATCUN relacionados.¹⁰ Refinamiento cuántico de los datos de difracción de rayos X y neutrones también argumentan contra la desprotonación del grupo -NH₂.¹¹

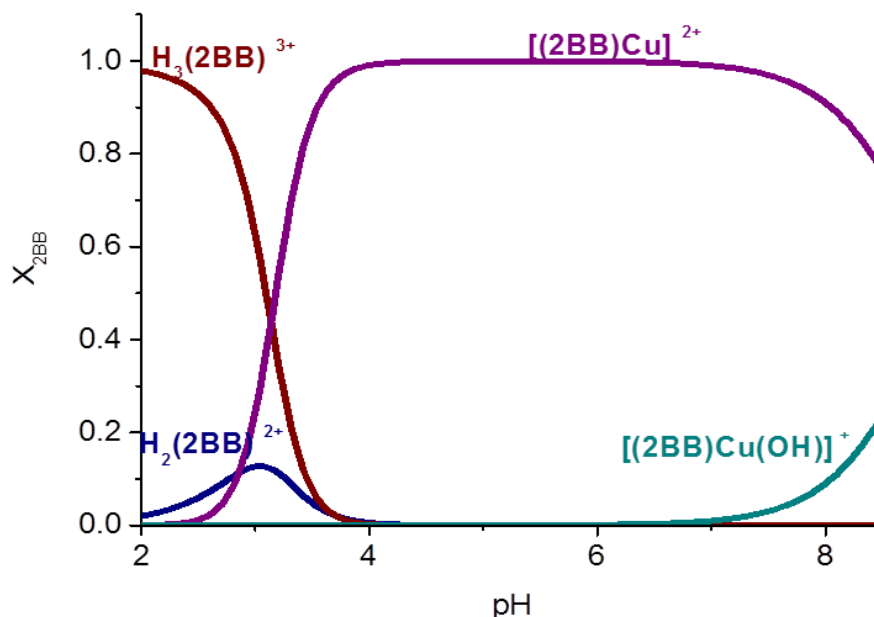


Figura 4.4. Diagrama de especiación para $[(2BB)Cu^{II}]^{2+}$.

Estudios electroquímicos

La distribución de especies está respaldada con los resultados electroquímicos obtenidos correspondientes a valores de pH 5.0, 7.0, 9.0 y 10.5 de disoluciones acuosas de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$. El sistema se comporta de manera cuasi reversible, con una señal redox en $E_{1/2} = 226$ mV vs SHE a pH 5.0-7.0, asignada al par $Cu^{II/I}$, que está en el rango de los potenciales redox reportados para LPMO (150-370 mV vs SHE). Se observaron diferencias a pH 9.0-10.5; en el primer caso, un hombro en un potencial ligeramente más negativo indica la presencia de una especie adicional. Esto se confirma a pH 10.5, donde el hombro se convierte en la única señal observada (**Figura 4.5**). En CH₃CN, el análisis electroquímico de $[(2BB)Cu^I]OTf$ muestra un comportamiento cuasi reversible, con $E_{1/2} = 76$ mV vs SHE (-272 mV vs ferricinio/ferroceno, **Figura 4.6**).

⁸ Bacik, J.-P., et. al. *Biochem.* **2017**, 56, 2529.

⁹ Frandsen, K.E.H., et. al. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 298; Kjaergaard, C.H., et. al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 8797; Bissaro, B., et. al. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13, 1123.

¹⁰ Miyamoto, T., et. al. *Chem. Lett.* **2013**, 42, 1099; Kandemir, B., et. al. *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 1355.

¹¹ Caldararu, O., et. al. *Chem. Sci.* **2019**, 10, 576.

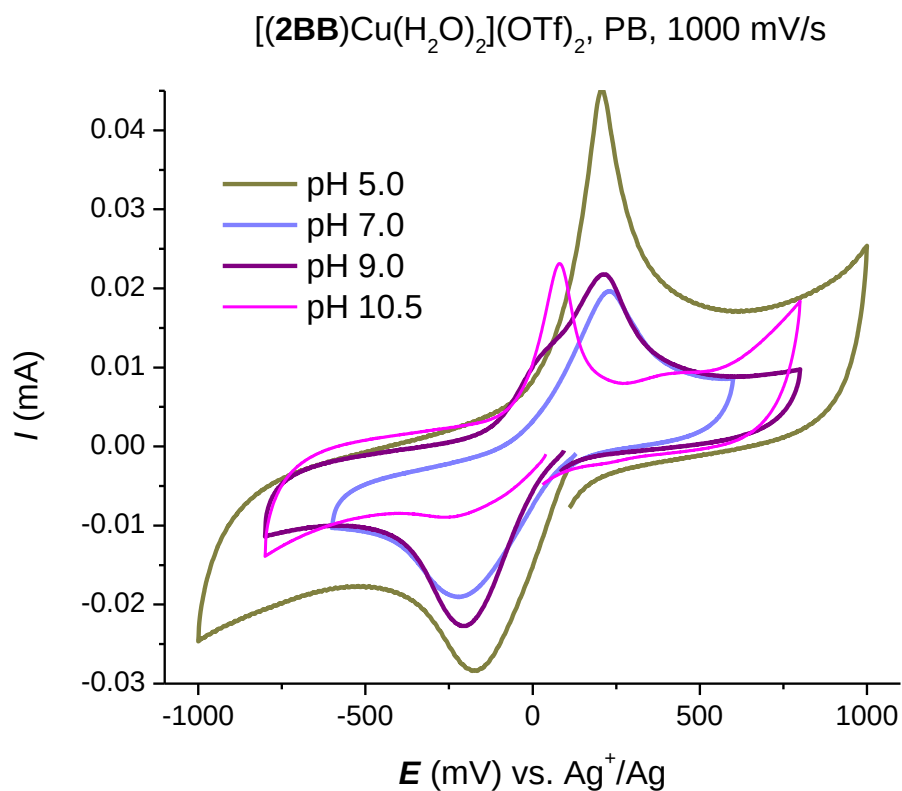
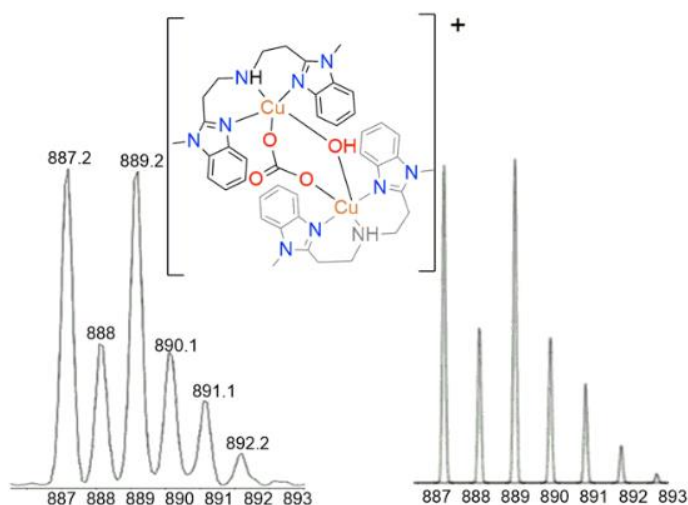


Figura 4.5. Voltamperogramas cíclicos de disoluciones 1 mM $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en buffer de fosfatos a pH 5.0, 7.0 y 9.0, y en buffer de carbonato a pH 10.5, adquiridos a 1 V s^{-1} con un electrodo de trabajo de carbono vítreo (a pH 10.5 el sistema es heterogéneo).

Figura 4.6. Voltamperogramas cíclicos del par $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$ a diferentes velocidades de barrido, usando un electrodo de trabajo de carbono vítreo, para una disolución 1 mM de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en CH_3CN .

Se obtuvo información sobre la identidad de las especies adicionales formadas a pH 9.0-10.5 a través del análisis ESI-MS de una disolución de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$. Se detectó una señal en m/z 887, que se asignó al complejo dicobre de puente mixto-hidroxilo/carbonato que se muestra en el **Esquema 4.1**, en función de su distribución isotópica y el análisis de la masa observada vs la calculada. El complejo detectado puede formarse tras la inserción aeróbica de CO_2 en un complejo dimérico con puente dihidroxilo formado inicialmente $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_x\}_2(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$.¹² Se obtuvo evidencia espectroscópica UV-vis de la formación del complejo propuesto $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_x\}_2(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$ mediante la adición de Et_3N a una disolución de acetonitrilo de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ a temperatura ambiente. De esta manera se observó una nueva banda en 330 nm ($\lambda \sim 2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que puede asignarse como una transición de Transferencia de Carga Ligante-Metal (LMCT por sus siglas en inglés) del grupo hidroxilo a $\text{Cu}(\text{II})$, ver **Figura 4.7**.

¹² Mukherjee, J., et. al. *J. Chem. Sci.* **2005**, 117, 111; Das, B., et. al. *Dalton Trans.* **2019**, 48, 3576.



Esquema 4.1. Complejo de dicobre con puente hidroxio/carbonato propuesto, formado a partir de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en agua a pH 9.0 con patrones isotópicos de espectrometría de masas experimental (izquierda) y simulado (derecha).

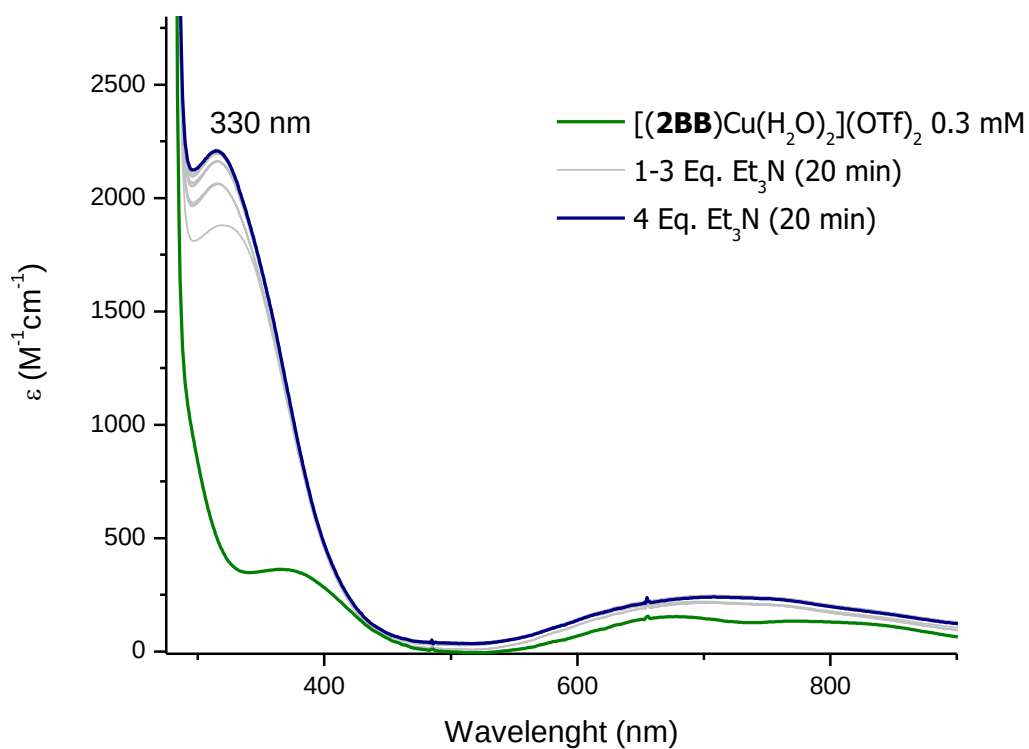


Figura 4.7. Espectro UV-vis de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ 0.3 mM en CH_3CN a temperatura ambiente (línea verde), adición de 1 a 3 equivalentes de Et_3N (líneas grises), y la adición final de un equivalente más de Et_3N (línea azul).

Estas observaciones confirman que la desprotonación de una molécula de agua coordinada es más fácil que la de la amina en nuestro sistema. Este fenómeno ocurre a un valor de pH más alto (7.5) que el utilizado en el estudio que sugiere la desprotonación de la amina terminal (es decir, pH 7.0),¹³ enfatizando aún más que la amina es probable que permanezca protonada a un pH fisiológico. Además, el valor de pH óptimo para la actividad enzimática es ligeramente ácido,⁹ lo que hace que la desprotonación de la amina terminal sea aún menos probable.

Reactividad de [(2BB)Cu^I]OTf frente a O₂

La reactividad de [(2BB)Cu^I]OTf con dioxígeno se exploró inicialmente mediante espectroscopía UV-vis a baja temperatura en disolución de acetonitrilo. El burbujeo suave de O₂ (grado extra seco, a presión controlada), a través de disoluciones 0.3 mM de [(2BB)Cu^I]OTf a 243 K resultó en la aparición de una banda ancha en 360 nm, asignada a una transferencia de carga LMCT de una especie de cobre-oxígeno, acompañado de una transición *d-d* en 680 nm; se observó un comportamiento similar en acetona a 193 K. La especie se mantuvo estable durante al menos una hora, aunque se observó decaimiento cuando se elevó la temperatura, **Figura 4.8**. Estos cambios no se observaron en condiciones similares o a una temperatura más baja en disoluciones de THF, y no se realizaron estudios de reactividad en este disolvente. En disolución acuosa de buffer de fosfatos (PB) a 273 K, no se observaron cambios significativos por espectroscopía UV-vis al burbujear O₂ luego de una reducción *in situ* de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con 1.2-1.5 equivalentes de ascorbato de sodio. Tanto en disoluciones de acetonitrilo como de PB, los productos generados a baja temperatura se caracterizaron por ESI-MS, revelando la presencia de una señal intensa en *m/z* 396 asignada a [(2BB)Cu^I]⁺, **Figura 4.1**.

La mezcla de reacción se caracterizó también por espectroscopia RPE, revelando que, aunque [(2BB)Cu^I]OTf reacciona lentamente con dioxígeno en acetonitrilo a 243 K, una señal característica de un complejo cúprico en un entorno de coordinación axial aparece después de aprox. 10 min [*g*_{||} = 2.250, *g*_⊥ = 2.082, *A*_{||} = 423 MHz (151 G), integración 21% en relación a un estándar externo de Cu(II)] (ver **Anexo Figura 8.5**). Una explicación razonable implicaría la formación inicial de un complejo cúprico-superoxo [(2BB)Cu^{II}(O₂)⁺] silencioso en RPE, probablemente en equilibrio con un complejo de dicobre(II) con puente peroxo-lateral [*{*(2BB)Cu^{II}*}*₂(μ-η²:η²O₂)²⁺] (basado en la espectroscopía UV-vis y la sección de reactividad de H₂O₂ que se expone a continuación). La abstracción de hidrógeno del disolvente o del sustrato modelo celobiosa puede resultar en la especie hidroperoxo cúprica, activa en RPE [(2BB)Cu^{II}(OOH)(S)]⁺ y/o el complejo hidroxilo subsecuente [(2BB)Cu^{II}(OH)(S)]⁺ (S = H₂O, CH₃CN). Estas especies pueden dar lugar al hombro en 330 nm por espectroscopia de absorción UV-vis (**Figura 4.8**). La oxigenación de Cu(I) que conduce a un complejo de Cu(II)-hidroperoxo a través de la abstracción H se ha observado previamente.¹⁴ Finalmente, tanto el Cu(II)-hidroperoxo como el peroxo-dicobre(II) pueden continuar reaccionando con disolvente o sustrato para generar [(2BB)Cu^{II}(OH)(S)]⁺ como producto final, en equilibrio con la forma dimérica previamente propuesta [*{*(2BB)Cu^{II}(S)*}*₂(μ-OH)₂]²⁺ (**Esquema 4.2**).

¹³ Bacik, J.-P., et. al. *Biochem.* **2017**, 56, 2529.

¹⁴ Fujii, T., et. al.. *Chem. Commun.* **2006**, 42, 4428.

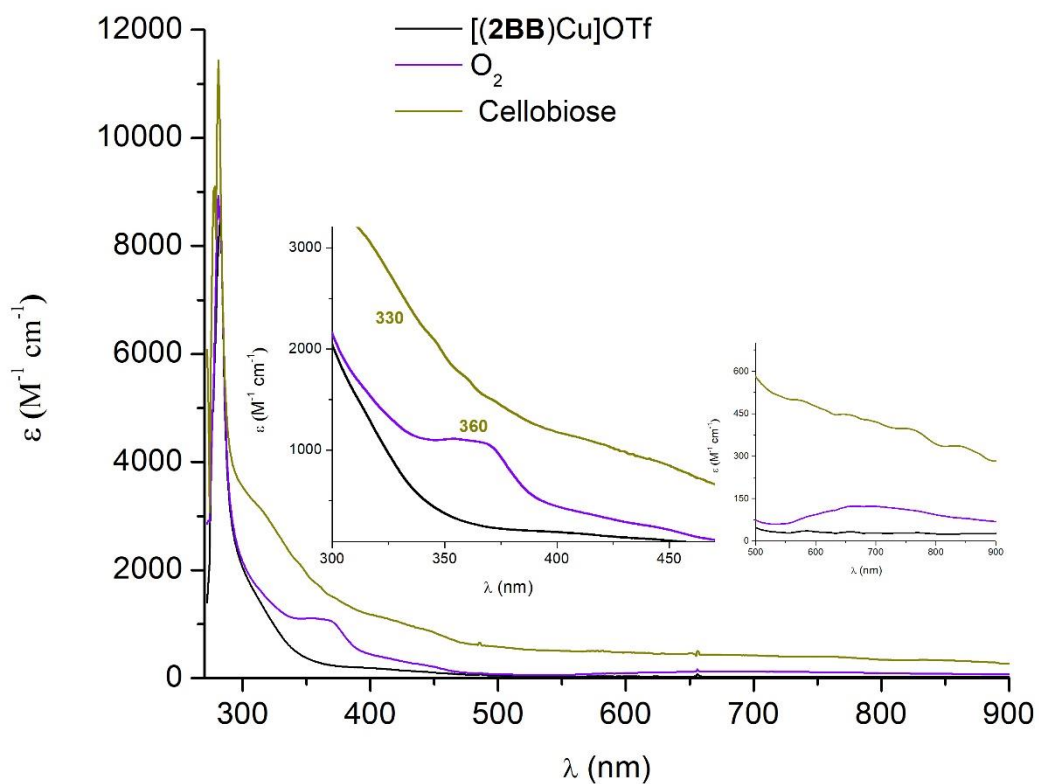
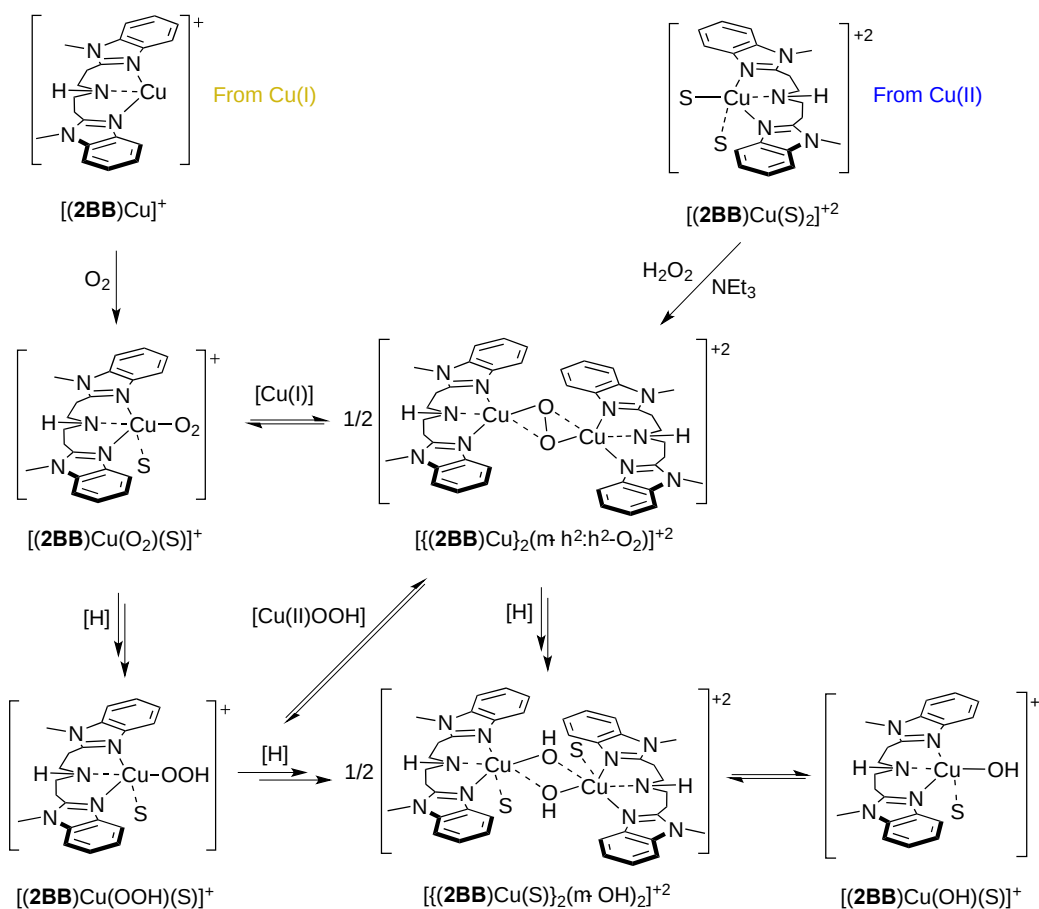


Figura 4.8. Espectro UV-vis de $[(2BB)Cu]OTf$, 0.3 mM CH_3CN a 243 K antes (línea negra), después de burbujear O_2 (línea morada) y tras la adición de celobiosa (línea verde). Inserto: región expandida de 250 a 500 nm.



Esquema 4.2. Reacciones propuestas y complejos de cobre putativos generados a partir de $[(2BB)Cu]^+/O_2$ (arriba a la izquierda) o $[(2BB)Cu^{II}(S)_2]^{2+}/H_2O_2/Et_3N$ (arriba a la derecha).

En PB/glicerol a pH 7.0 y 273 K para $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ reducido *in situ* con 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio, seguido de burbujeo de O_2 , no se observaron cambios muy evidentes (en PB aparece una señal axial débil con valores de $g_{\parallel} = 2.248$, $g_{\perp} = 2.061$, $A_{\parallel} = 448.39$ MHz; en la disolución de acetonitrilo congelado fue observada una señal rómbica débil con valores de $g_z = 2.180$, $g_y = 2.128$, $g_x = 2.031$ **Anexo Figuras 8.6 y 8.7**). Sin embargo, la adición de celobiosa a la disolución de CH_3CN oxigenada dio como resultado una señal axial en $g_{\parallel} = 2.275$, $g_{\perp} = 2.054$ [$A_{\parallel} = 502$ MHz (179 G), $A_{\perp} = 70$ MHz (25 G)] ver **Figura 4.9 y Anexo Figura 8.7**; se simuló el espectro en presencia de una o dos especies de Cu(II) y solo el primer caso resultó tener un buen ajuste (**Anexo Figura 8.8**). Ejemplos de complejos mononucleares cobre-hidroperoxo con los ligantes tripodales piridilamina y piridilamina-tioéter se han caracterizado por espectroscopía RPE y se asignaron a ambientes bipiramidales trigonales [$g_{\parallel} = 2.004$, $g_{\perp} = 2.207$, $A_{\parallel} = 305$ (109 G), $A_{\perp} = 210$ MHz (75 G)],¹⁵ o geometrías piramidales cuadradas [$g_{\parallel} = 2.24$, $g_{\perp} = 2.06$, $A_{\parallel} = 471$ MHz (168 G); $g_{\parallel} = 2.25$, $g_{\perp} = 2.04$, $A_{\parallel} = 504$ MHz (180 G)].¹⁶ Se ha reportado una situación similar con los complejos monoméricos cúprico-hidroxido: datos espectroscópicos de RPE para complejos tripodales dan lugar a señales “invertidas”, mientras que se han observado señales axiales

¹⁵ Wada A., et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 798.

¹⁶ Koderá, M., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7715; Maiti, D., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6998.

con cierto grado de rombicidad en los pocos casos reportados de complejos tetragonales de Cu(II)-OH [$g_x = 2.032$, $g_y = 2.055$, $g_z = 2.185$, $A_{Cu} = 588$ MHz (189 G), $A_N = 40$ -53 MHz (14-19 G)].¹⁷ La semejanza de los parámetros experimentales con los del entorno de especies tetragonales sugieren coordinación piramidal cuadrada para los complejos propuestos Cu(II)-hidroperoxo^{16,18} o hidroxio detectados, probablemente con donadores débiles en las posiciones axiales $[(2BB)Cu^{II}(OOH)(S)]^+$ o $[(2BB)Cu^{II}(OH)(S)]^+$ (S = disolvente, ver Esquema 4.2).

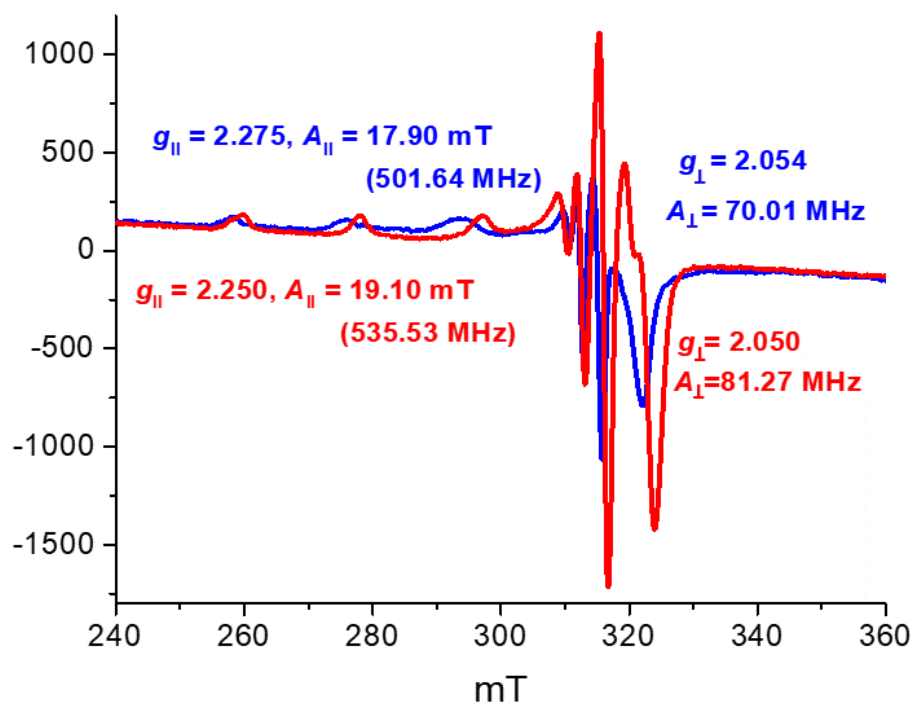


Figura 4.9. Espectros RPE de $[(2BB)Cu^I]^+$ generado *in situ* con 1.5 equivalentes de ascorbato de sodio después de burbujear O_2 y agregar 10 equivalentes de celobiosa (3 mM en PB, línea azul) y mezcla de $[(2BB)Cu^I]OTf$, 1.2 equivalentes KO_2 y 10 equivalentes de celobiosa (3 mM en CH_3CN , línea roja).

Reactividad de $[(2BB)Cu^I]OTf$ y $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ con KO_2

La reactividad de los complejos de cobre con una forma de dioxígeno reducida en un electrón se exploró con KO_2 ; esto puede ser importante para establecer el oxidante en las LPMO, ya que se ha sugerido H_2O_2 en lugar del O_2 propuesto originalmente.⁹ Por lo tanto, la adición de KO_2 a las disoluciones de $[(2BB)Cu^I]OTf$ se monitoreó mediante espectroscopía de absorción UV-vis para identificar especies potenciales obre-oxígeno, tanto en acetonitrilo como en disolución PB a pH 7.0. En acetonitrilo, el cambio espectral principal consistió en un hombro a 365 nm, que se intensificó ligeramente después de la adición de celobiosa, ver Anexo Figura 8.10. El análisis de la mezcla de reacción por ESI-MS reveló la presencia de un pico en m/z 431 asignado a $[(2BB)Cu^{II}(OH)(H_2O)]^+$, junto con picos en m/z 396 y 545 característicos de $[(2BB)Cu^I]^+$ y $[(2BB)Cu^{II}(OTf)]^+$ (Figura 4.10). Cuando se añadió celobiosa, la presencia de productos de degradación oxidativa se evidenció por ESI-MS (ver más adelante). Se observó

¹⁷ Donoghue, P.J., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17602.

¹⁸ Muthuramalingam, S., et. al. *J. Catal.* **2019**, 372, 352.

un comportamiento análogo en PB por UV-vis, aunque el hombro se observó en 345 nm, ver **Anexo Figura 8.11**. Mediante ESI-MS se detectaron tres picos relevantes: el de m/z 412 consistente con un producto de monooxigenación $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O})]^+$, que podría corresponder a la hidroxilación del ligante, aunque dicho producto no se detectó después de la desmetalación con exceso de amoníaco acuoso; una especie cuprilo ($\text{Cu}=\text{O}$) no puede sustentarse firmemente sin evidencia adicional. Se asignó un pico en m/z 428 a la especie propuesta superoxo cúprico $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O}_2)]^+$ y el de m/z 602 que se asignó tentativamente a $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O})(\text{OTf})(\text{CH}_3\text{CN})]^+$ (**Figura 4.11**). También se detectaron las especies mencionadas anteriormente en m/z 396 y 545. Estas observaciones implican que se forman especies de cobre-oxígeno altamente reactivas en el sistema $\text{Cu}(\text{I})/\text{KO}_2$, lo que permite la detección del producto final $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ que es relativamente estable.

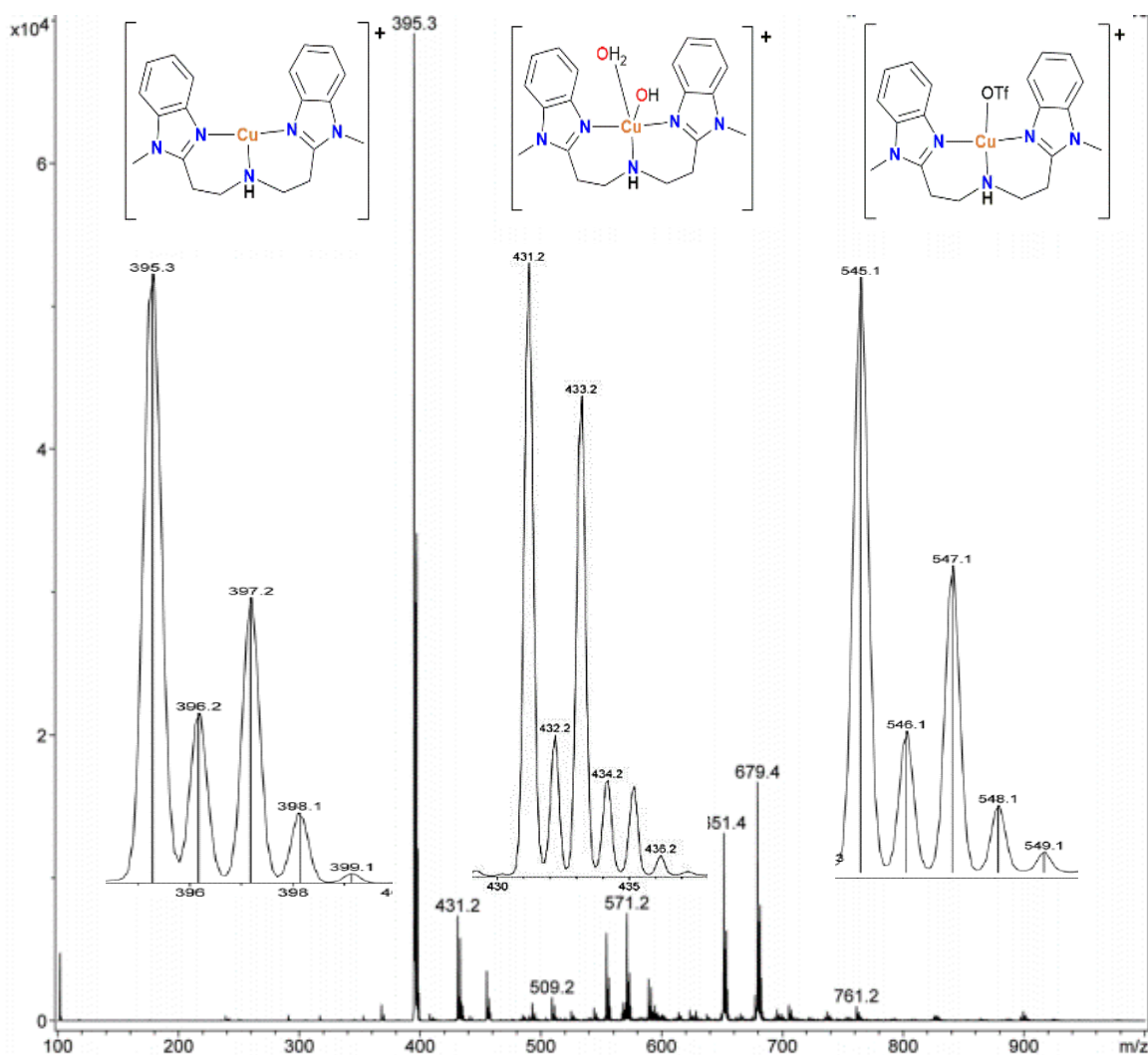


Figura 4.10. ESI-MS de $[(2\text{BB})\text{Cu}]^+\text{OTf}$ (0.3 mM en CH_3CN , 243 K) después de la adición de 1.2 equivalentes de KO_2 .

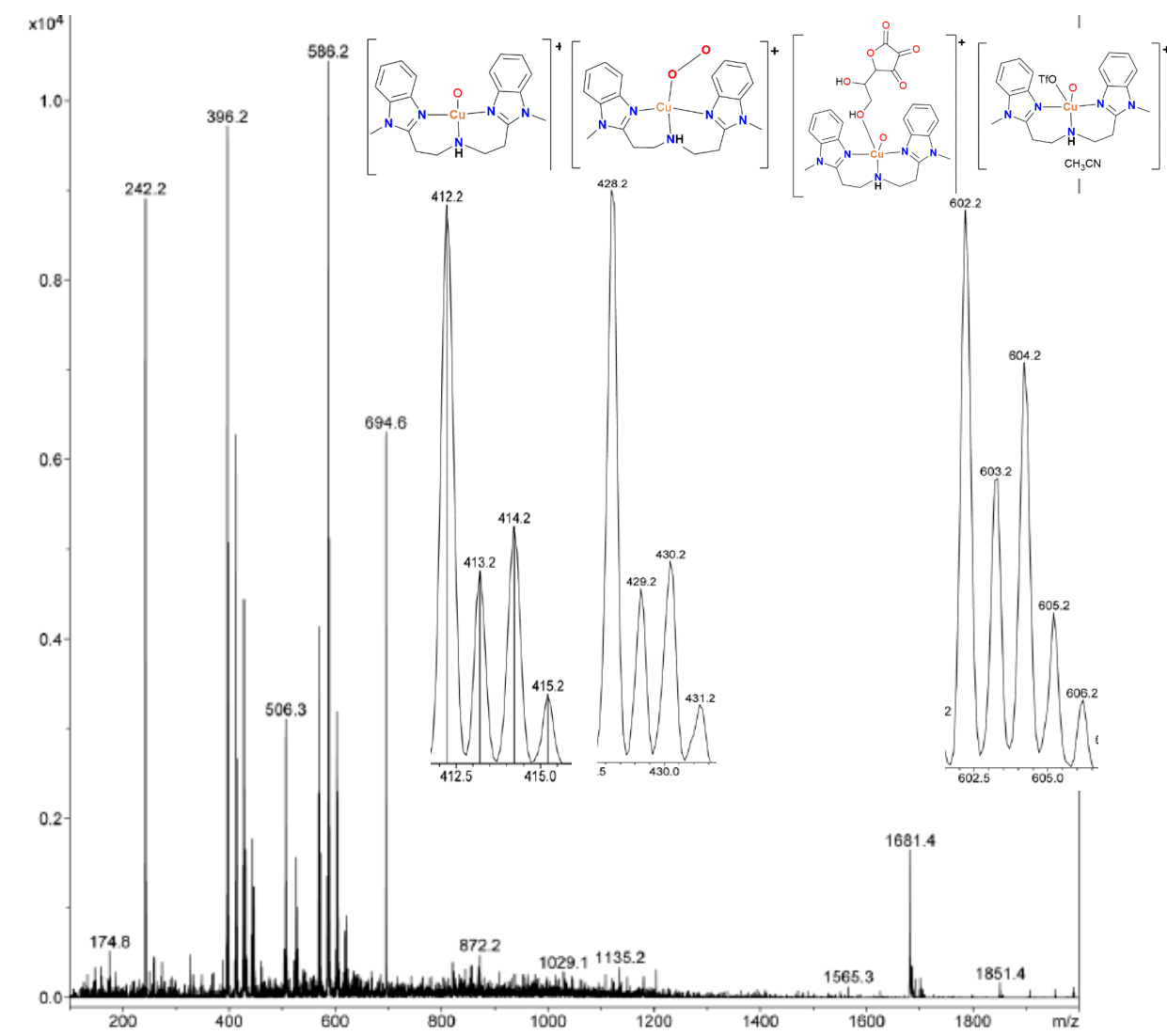


Figura 4.11. ESI-MS de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ generado *in situ* (0.3 mM en PB pH 7.0, 273 K), adición de 1.2 equivalentes de KO_2 , seguido de la adición de 10 equivalentes de celobiosa.

Los espectros de RPE registrados a partir de muestras congeladas de forma ultrarrápida en el transcurso de la reacción revelan que después de la adición de KO_2 a $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ en acetonitrilo, aparece una señal característica de un complejo cúprico en un entorno axial, con $g_{\parallel} = 2.250$, $g_{\perp} = 2.050$ [$A_{\parallel} = 536$ MHz (191 G), $A_{\perp} = 81$ MHz (29 G)] **Figura 4.9, Figuras Anexo 8.12 y 8.13**. En PB, la adición de KO_2 resultó en una señal axial asignada a especies monoméricas de $\text{Cu}(\text{II})$ ($g_{\parallel} = 2.270$, $A_{\parallel} = 494.63$ MHz, $g_{\perp} = 2.054$, **Figura Anexo 8.14**). Tanto en acetonitrilo como en PB la señal se vuelve más intensa al agregar celobiosa, posiblemente debido a la generación de la especie propuesta $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ detectada por ESI-MS, después de la abstracción de hidrógeno.¹⁹ La reacción análoga de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en disoluciones de CH_3CN o PB con KO_2 no mostró cambios considerables en sus espectros de absorción UV-vis, incluso después de la adición de

¹⁹ Donoghue, P. J., et.al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17602.

celobiosa, ver **Anexo Figuras 8.15 y 8.16**. No se obtuvo evidencia de especies de cobre-oxígeno por ESI-MS o espectroscopía RPE en las reacciones del complejo Cu(II) con KO₂. Por lo tanto, un complejo cúprico-superoxo no parece formarse bajo estas condiciones.

Reactividad de [(2BB)Cu]^{II}OTf y [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con H₂O₂

La reacción de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con H₂O₂ se monitoreó mediante espectroscopía UV-vis para determinar si se forman diferentes especies en relación con la reacción del complejo Cu(I) y O₂, en acetonitrilo y en PB (pH 7.0). Tanto en acetonitrilo como en PB no se observaron cambios con respecto a los espectros originales, incluso después de la adición de celobiosa (ver **Anexo Figuras 8.17 y 8.18** respectivamente). El análisis por HPLC-MS indicó que la celobiosa no sufrió degradación. En contraste, la reacción de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con mezclas 1:1 de H₂O₂/Et₃N en acetonitrilo dio como resultado cambios espectrales caracterizados principalmente por una absorbancia máxima alrededor de 365 nm (ver **Figuras 4.12-4.13**) y una transición *d-d* en 670 nm. Otro complejo de cobre parece estar presente, basado en el hombro observado en 330 nm.

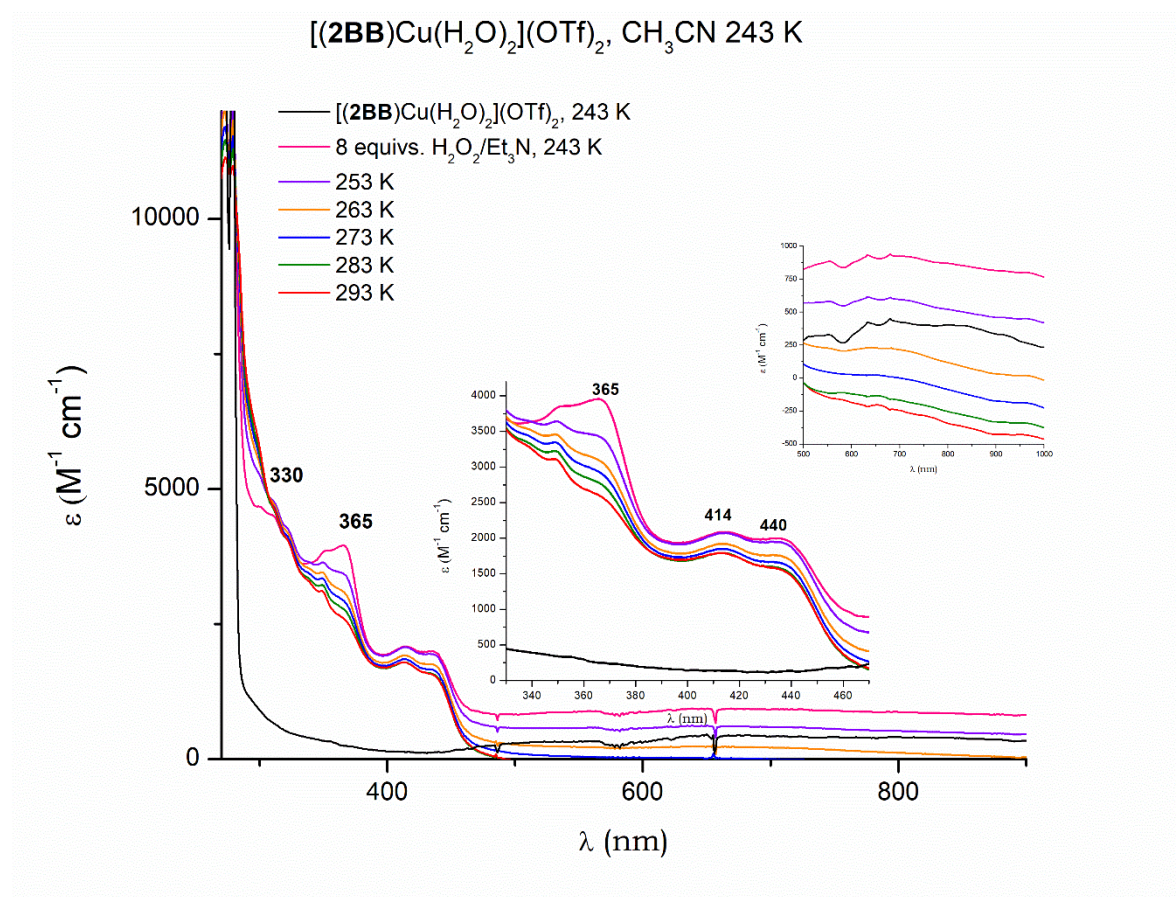


Figura 4.12. Espectros UV-vis a temperatura variable de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ (0.3 mM en CH₃CN) después de la adición de 8 equivalentes de H₂O₂/Et₃N.

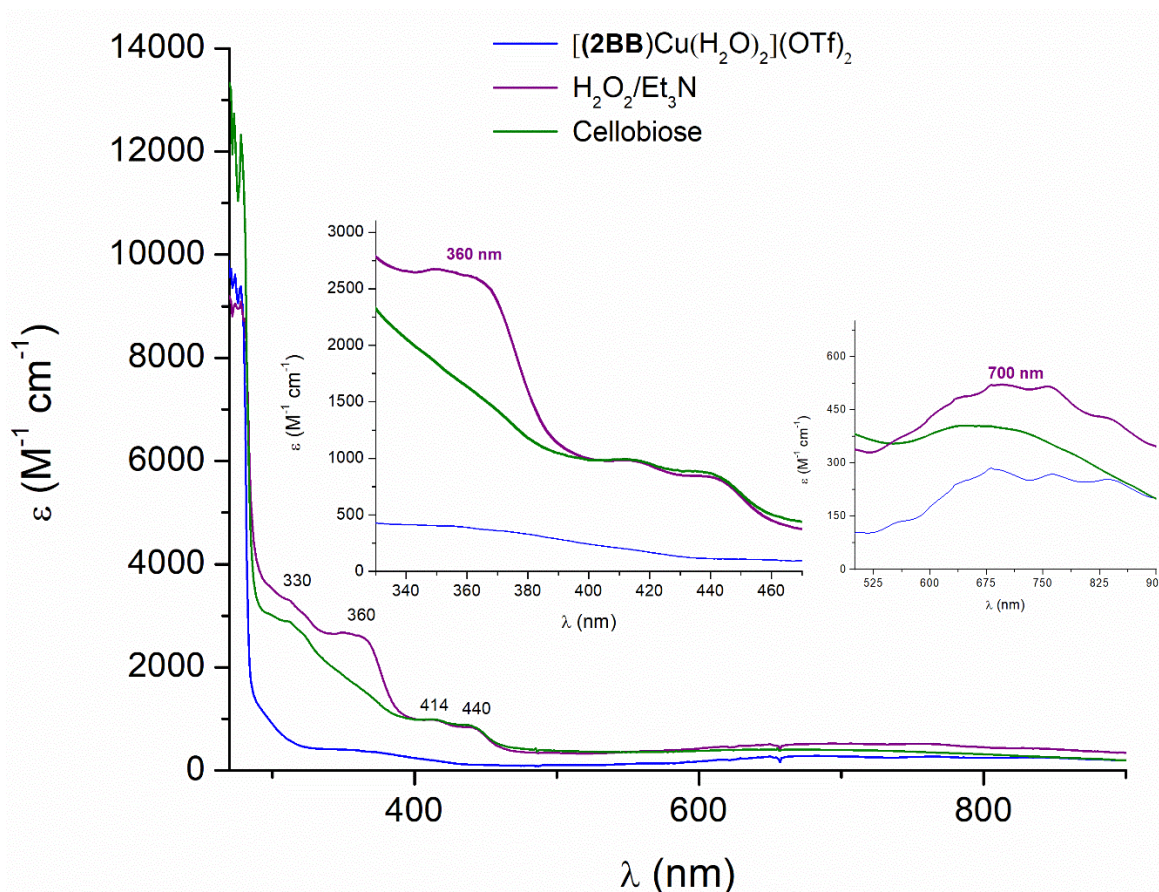


Figura 4.13. Espectro UV-vis de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM en CH_3CN , línea azul), después de la adición de 8 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ a 243 K (línea morada), y después de la adición de celobiosa (línea verde).

Una mezcla de los complejos dimérico $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$, y monoméricos $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OOH})(\text{S})]^+$ y/o $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{S})]^+$ propuestos (ver **Esquema 4.2**) pueden ser responsables de las características ópticas descritas, con un amplio precedente para los complejos $(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2\text{-peroxo})\text{dicobre(II)}$ con bandas de absorción intensa alrededor de 360 nm.²⁰ Los pocos ejemplos reportados de complejos monoméricos tetragonales hidroperoxo e hidroxó cúprico, presentan bandas LMCT que se desplazan hacia el azul con respecto a las especies diméricas peroxo-punteadas,²¹ que es consistente con nuestras observaciones en 330 nm. La similitud con el espectro de absorción UV-vis de la mezcla de reacción con $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ y dióxígeno (ver **Figura 4.14**), sugiere además la formación de la especie peroxo-dicobre(II) en la reacción de Cu(I) con O_2 descrito anteriormente. $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$ puede formarse mediante la captura rápida de un superoxo cúprico formado inicialmente $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{O}_2)]^+$, por un segundo equivalente de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$. La reacción de

²⁰ Casella, L., et. al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1611; Casella, L., et. al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 3203; Casella, L., et. al. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 7516; Garcia-Bosch, I., et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 2406; Baldwin, M.J., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10421; Pidcock, E., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1299.

²¹ Wada A., et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 798; Kodera, M., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7715; Maiti, D., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6998; Donoghue, P.J., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17602.

$[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ con H_2O_2 también se analizó por absorción UV-vis y técnicas RPE, lo que resultó en espectros con características no muy bien definidas.

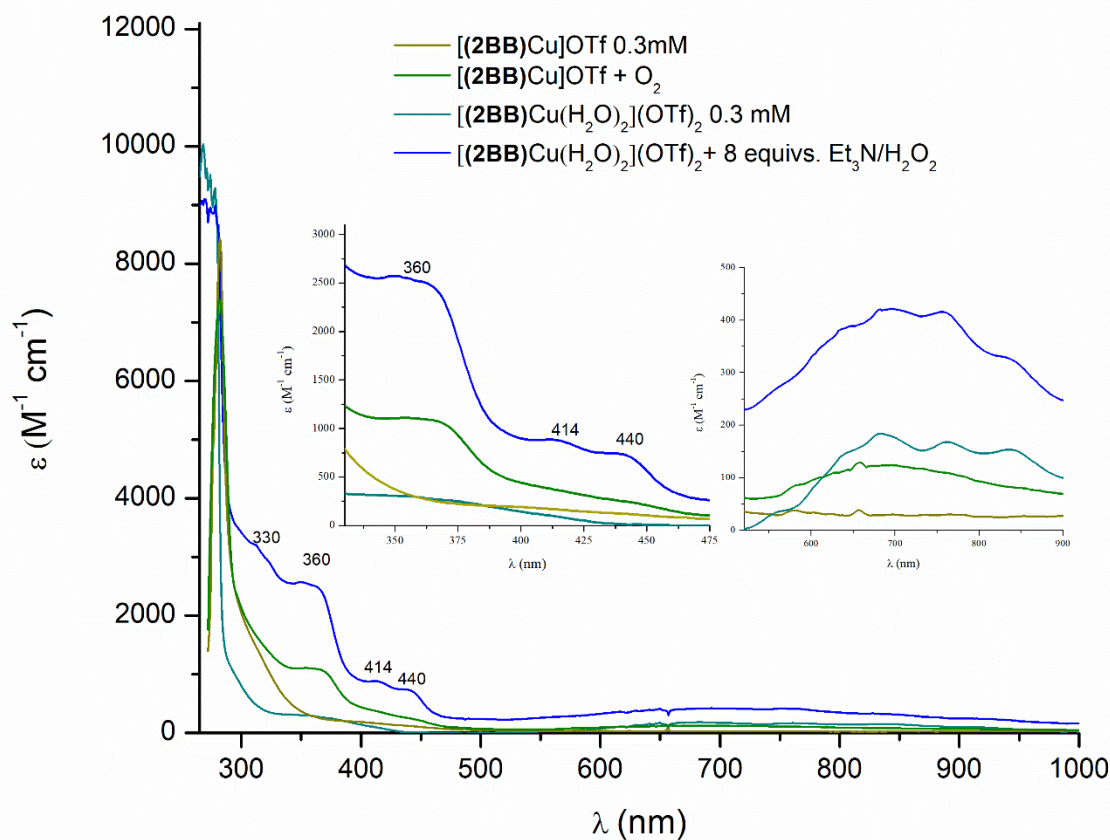


Figura 4.14. Espectros UV-vis comparativos de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$, 0.3 mM CH_3CN a 243 K antes (línea verde clara) y después de la adición de O_2 (línea verde oscura); $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$, 0.3 mM CH_3CN a 243 K antes (línea azul clara), y después de la adición de 8 equivalentes de 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en disolución de acetonitrilo (línea azul oscura). Insertos: regiones expandidas de 250 a 500 y 500 a 900 nm.

La presencia de especies dicobre en la disolución de acetonitrilo se confirmó por espectrometría de masas de ionización por criospray (CSI-MS) en condiciones similares a las empleadas para la espectroscopía de absorción UV-vis. Tan pronto como 3 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ se agregaron a $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en acetonitrilo, la muestra se inyectó a 243 K, identificando las especies $[(2\text{BB})_2\text{Cu}^{\text{II}}_2(\mu\text{-CO}_3)(\text{OTf})]^+$, $[(2\text{BB})_2\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{O}_2)]^{2+}$ y $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$. La comparación espectral con la muestra inyectada y adquirida a 293 K (una vez que la banda en 365 nm decae) muestra que se forman especies similares, pero las especies bimetalicas se favorecen a una temperatura más alta, en función de sus intensidades (Tabla 4.2, Figura 4.15).

Número	Estructura propuesta	Temperatura observada
1	$[(2BB)_2Cu^{II}_2(\mu-\eta^2-CO_3)(OTf)]^+$	243 K y 293 K
2	$[(2BB)_2Cu^{II}_2(\mu-O_2)]^{2+}$	243 K y 293 K

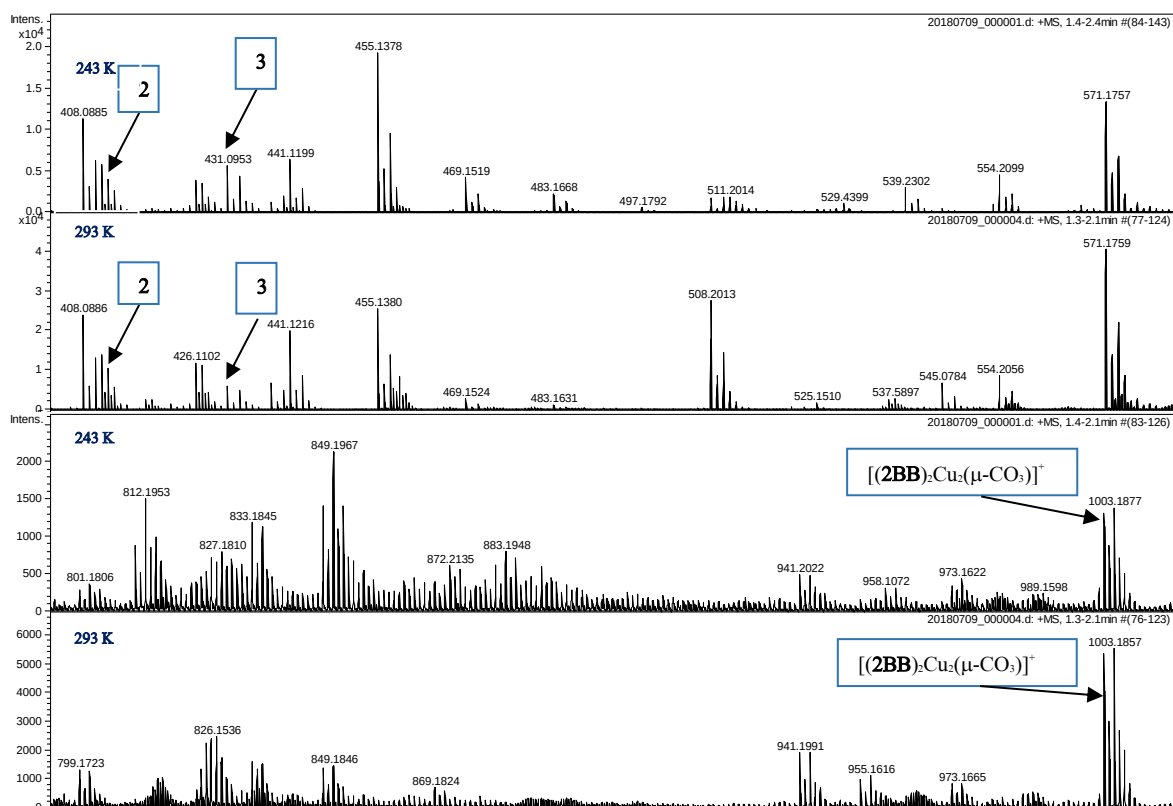
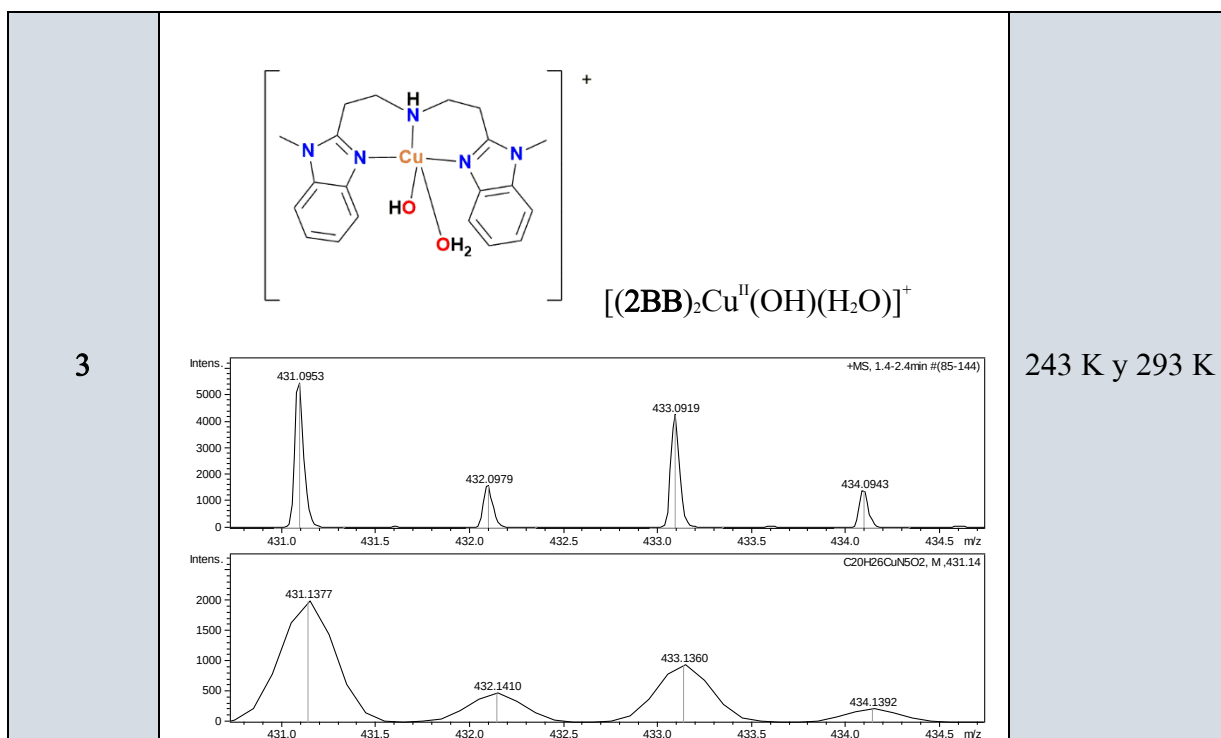


Figura 4.15. Espectros de masas, ionización positiva CSI-MS de los productos de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ con H_2O_2/Et_3N en CH_3CN , adquiridos a 243 K (arriba) y 293 K (abajo).

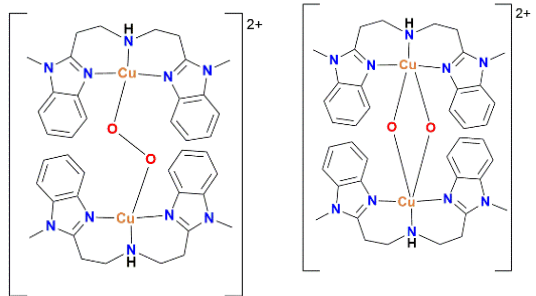
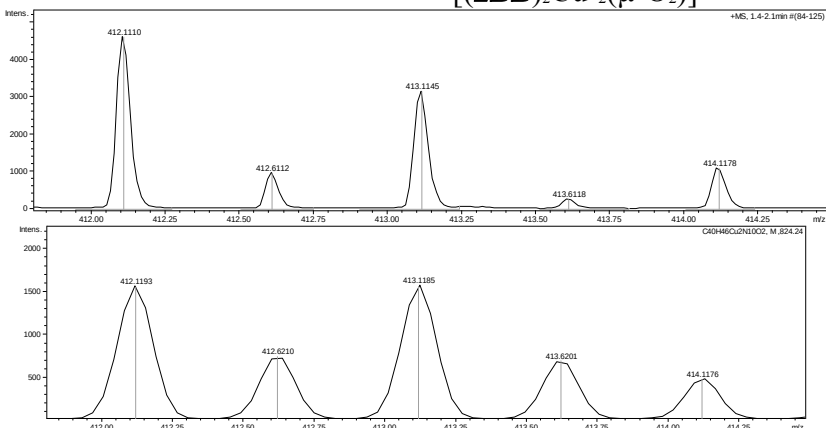
El análisis de la mezcla de reacción por espectroscopia RPE revela que después de la reacción de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ con 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en acetonitrilo, la señal característica de un complejo cúprico en un ambiente de coordinación axial se vuelve débil después de 10 min (**Anexo Figura 8.19**; la integración frente a una disolución estándar de trifluorometilsulfonato de cobre(II) 3 mM correspondía al 18% del $\text{Cu}(\text{II})$ original en disolución), probablemente debido a la formación de la especie antiferromagnéticamente acoplada $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$; esta especie es estable durante al menos 2 h a 243 K, según las mediciones de UV-vis y RPE (**Anexo Figura 8.20**). La adición de un anión potencialmente quelante como acetato (OAc^- , 3 equivalentes en metanol/acetonitrilo) a una disolución 0.3 mM de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en acetonitrilo, se probó para estudiar la naturaleza de las especies diméricas formadas tras la adición de 30 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (ver sección experimental).²² La reacción se siguió mediante espectroscopia de absorción UV-vis a 243 K, mostrando la generación de la banda en 365 nm (más intensa), atribuida a $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$, junto con nuevas bandas en 414 nm y 440 nm, **Figura 4.16**.

Figura 4.16. Espectro de absorción UV-vis de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM en CH_3CN , 3 equivalentes de NaOAc en 60 μL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$, línea negra) después de la adición de 3 equivalentes de 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (verde) y 30 equivalentes (marrón); seguimiento de la reacción y espectro final después de 100 min (púrpura).

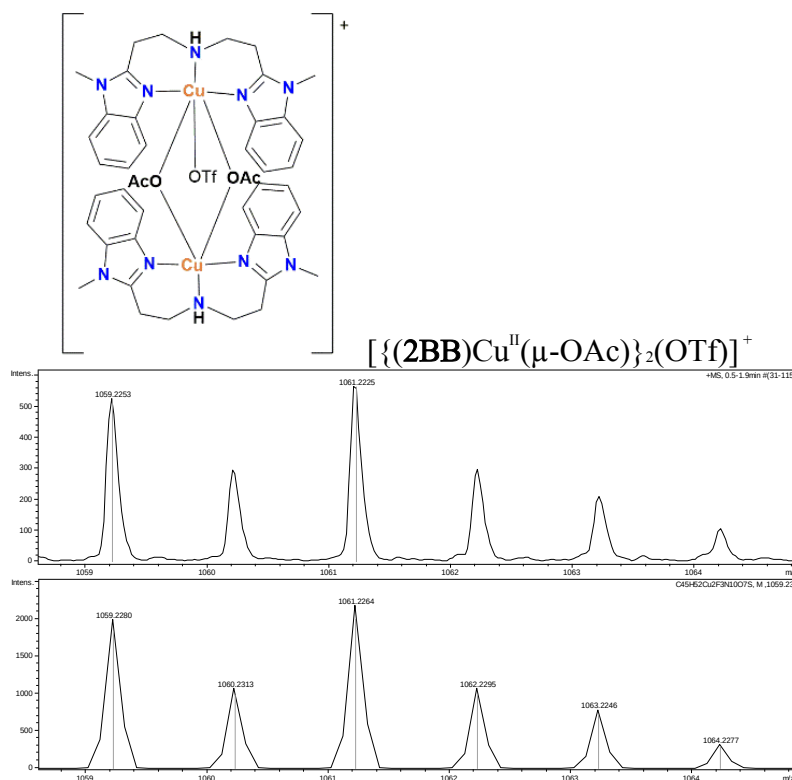
²² Hedman, B., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9268; Funahashi, Y., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16444.

La banda en 365 nm decae luego de un período de 75 minutos a 243 K, con el consiguiente aumento en la intensidad de las bandas en 414 nm y 440 nm; esta transformación ocurre casi instantáneamente al aumentar la temperatura a 293 K. Se observaron resultados similares al agregar O₂, KO₂ o H₂O₂ a complejos cuprosos y cúpricos en presencia de OAc⁻. Los productos en la mezcla de reacción fueron caracterizados por ESI-MS y los picos en *m/z* 396 y 450 se asignaron a complejos mononucleares de cobre. Una especie dimérica también fue detectada en *m/z* 886, **Esquema 4.1**. Otra especie dicobre generada parece tener estabilidad térmica limitada, así que también fueron adquiridos espectros criogénicos de masas bajo las mismas condiciones. El análisis CSI-MS de los productos finales a 243 K revelaron la presencia de [(2BB)₂Cu^{II}₂(μ-η²-OAc)₂(OTf)]⁺ y [{(2BB)Cu^{II}}₂(μ-η²:η²-O₂)]²⁺ (los patrones isotópicos experimental (superior) y simulado (inferior) de las especies de cobre identificados a 243 K y 293 K se resumen en la **Tabla 4.3**), con sus intensidades aumentando al calentar la mezcla a 293 K, **Figura 4.17**. Estudios espectroscópicos de RPE complementarios revelan que, una vez que se agrega H₂O₂/Et₃N, la señal característica del complejo cúprico en un entorno de coordinación axial (*g*_{||} = 2.270, *A*_{||} = 411.8 MHz, *g*_⊥ = 2.077) se debilita después de aproximadamente 10 minutos (*g*_{||} = 2.400, *A*_{||} = 485.4 MHz, *g*_⊥ = 2.052) debido a la formación de [{(2BB)Cu^{II}}₂(μ-η²:η²-O₂)]²⁺ acoplado antiferromagnéticamente, **Figura 4.18**.

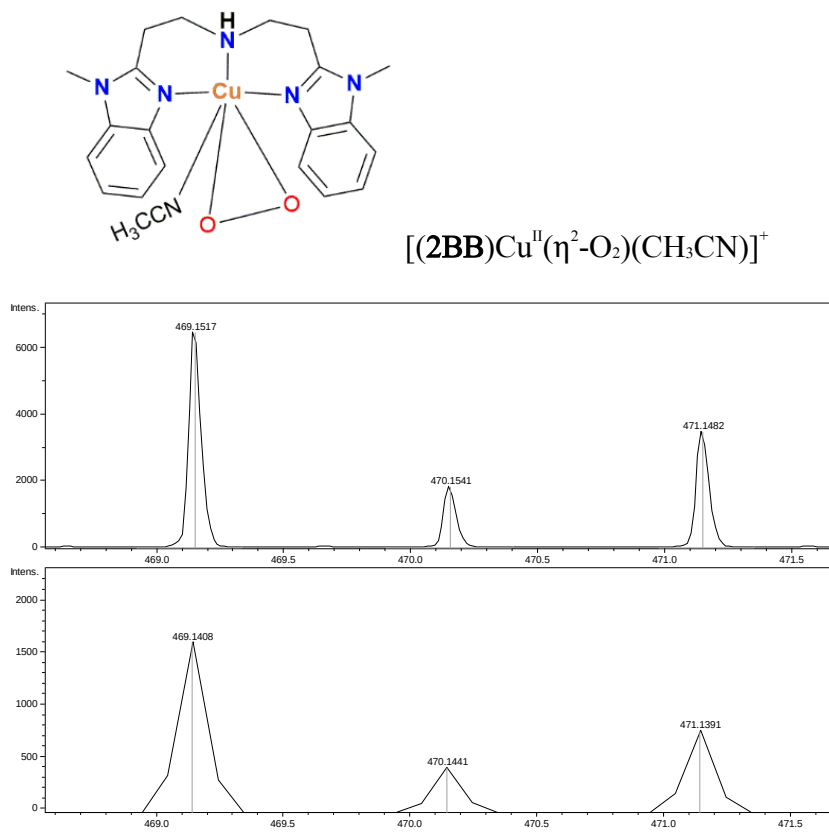
Tabla 4.3. Especies detectadas por CSI a partir de la reacción de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con H₂O₂/Et₃N en presencia de acetato de sodio.

Número	Estructura propuesta	Temperatura observada
1	 O [(2BB)₂Cu^{II}₂(μ-O₂)]²⁺ 	243 K y 293 K

2

243 K
y 293 K

3

243 K
y 293 K

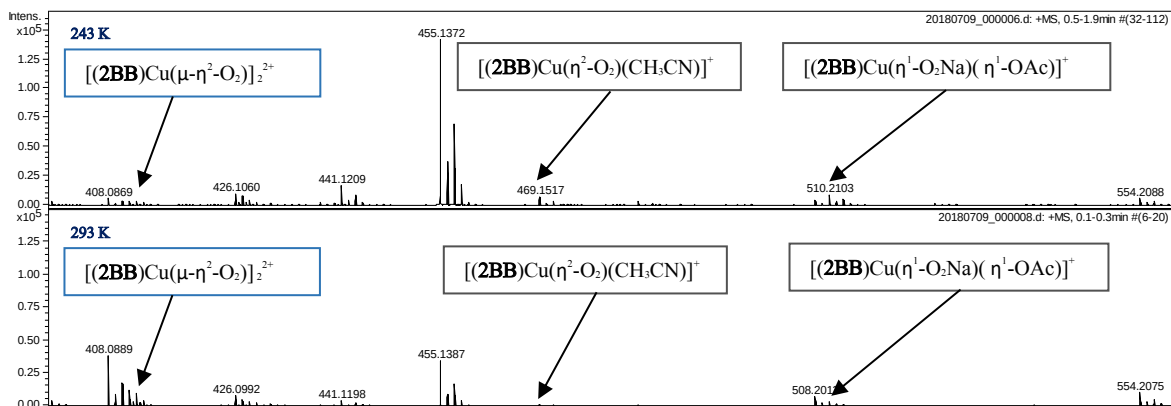
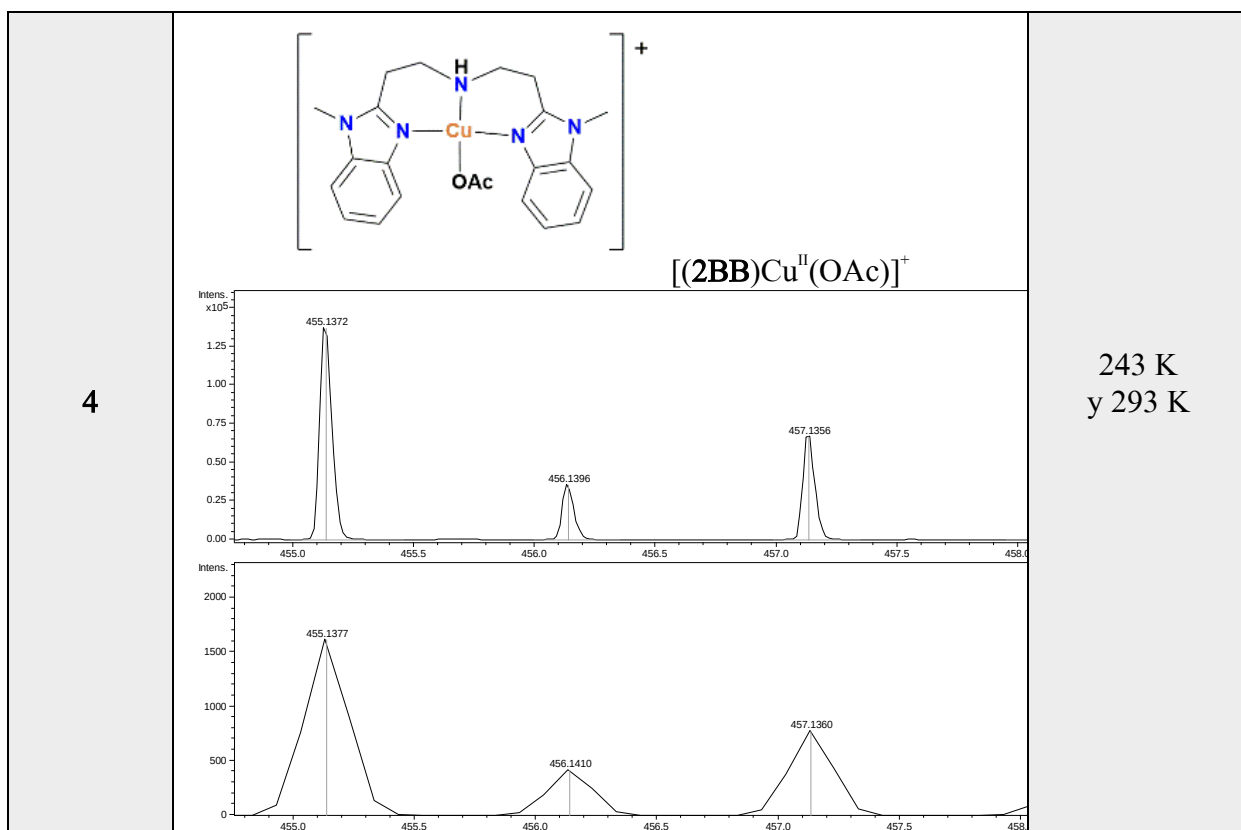


Figura 4.17. Espectros de masas, ionización positiva CSI-MS de productos de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en CH_3CN , adquiridos a 243 K (arriba) y 293 K (abajo) en presencia de NaOAc .

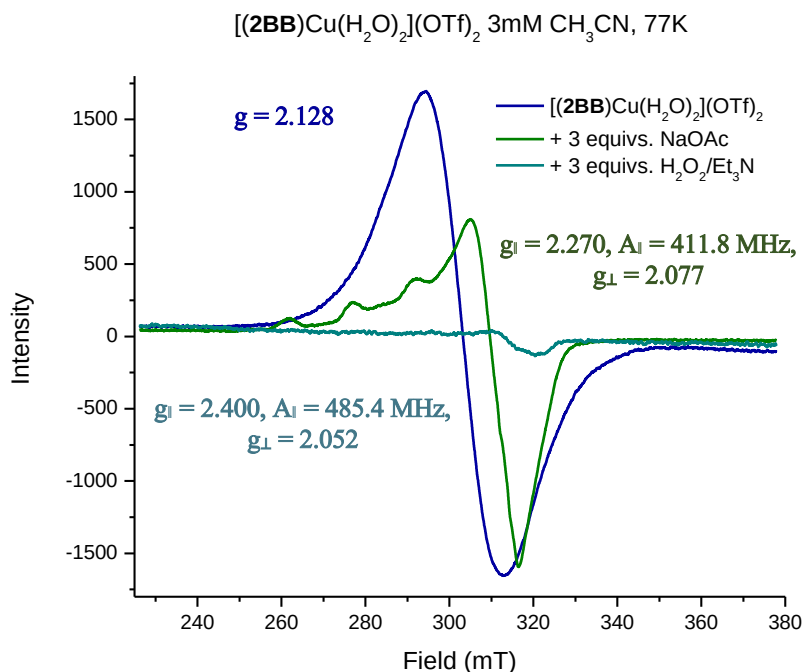


Figura 4.18. Espectro RPE de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM en CH_3CN , 243 K, línea azul), después de la adición de 3 equivalentes de acetato de sodio (línea verde) y después de la adición de 3 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (línea cian oscura).

Espectroscopía de Raman Resonante

Con el fin de llevar a cabo caracterización adicional del dímero propuesto $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$ y el complejo asociado formado después de la adición de NaOAc e intentar adjudicar la identidad de las bandas observadas por espectroscopía de absorción UV-vis en 365 nm y 414 y 440 nm, respectivamente, se realizaron experimentos de espectroscopía Raman resonante. Las mediciones fueron llevadas a cabo con las mezclas de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ y 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, con y sin acetato de sodio adicionado, posteriormente se realizó la excitación láser en 355 y 457 nm. Los espectros de Raman con excitación en 355 nm fueron hechos a 243 K para favorecer la detección de $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$, mientras que la excitación en 457 nm fue hecha a 293 K para favorecer la formación de las especies no identificadas que dan absorción máxima en 414 y 440 nm (**Figuras 4.19 y 4.20**). Como se ve en los espectros, aunque hay presencia de señales intensas, no se evidenciaron bandas claramente sensibles a marcaje isotópico ($\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ vs $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$), ya que los espectros parecen estar dominados por vibraciones basadas en los ligantes. En el caso de $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$, la banda de absorción principal en el espectro de UV-vis está asociada a una transición centrada en **2BB**.

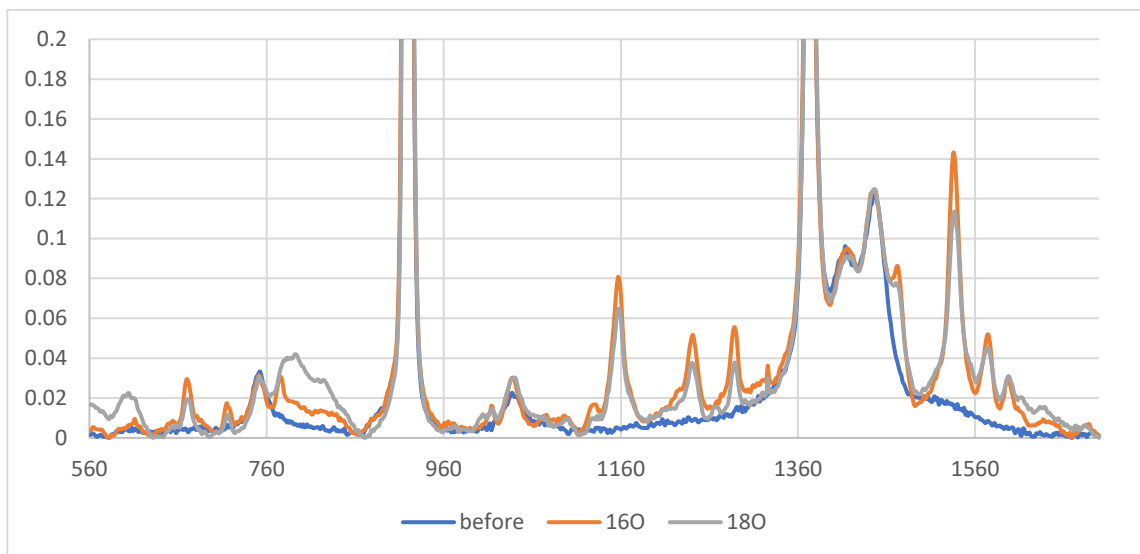


Figura 4.19. Espectro de Raman Resonante de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM en CH_3CN , 243 K, traza azul) en presencia de 3 equivalentes de acetato de sodio y después de la adición de 30 equivalentes de $\text{H}_2^{16}\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (línea naranja) o $\text{H}_2^{18}\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (línea gris).

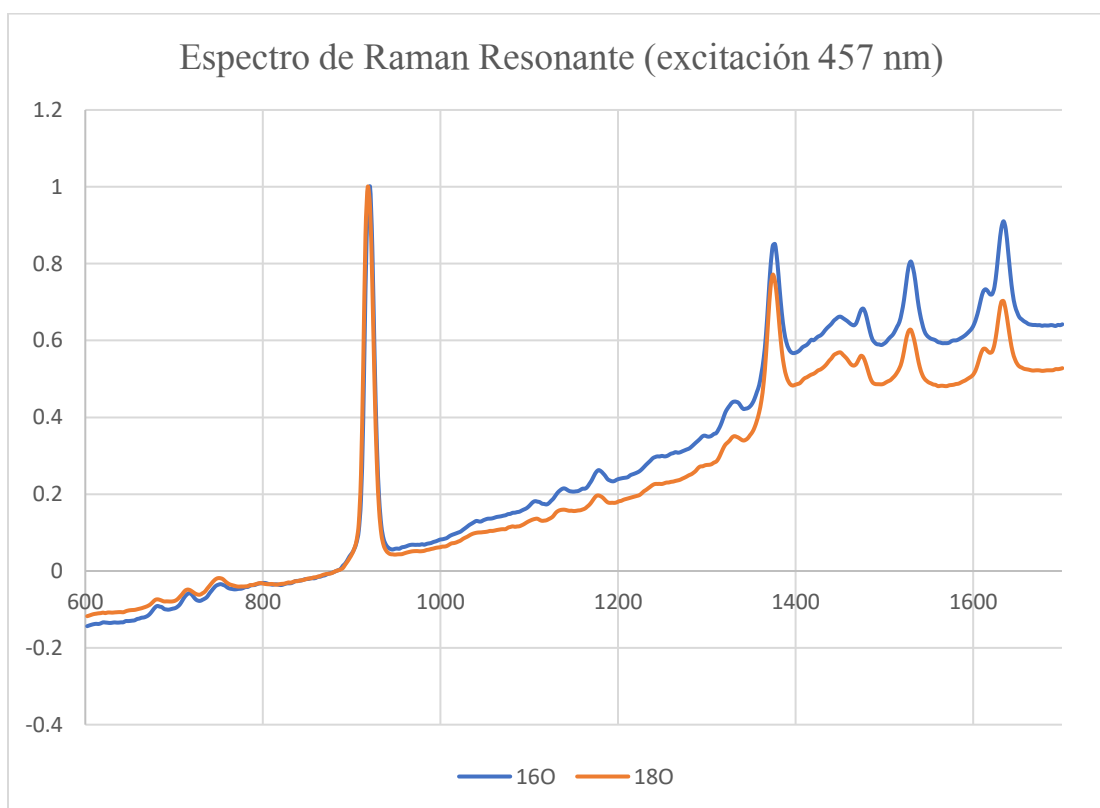


Figura 4.20. Espectro de Raman Resonante de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM en CH_3CN) en presencia de 3 equivalentes de acetato de sodio y 30 equivalentes $\text{H}_2^{16}\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (293 K, línea azul) o $\text{H}_2^{18}\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (línea naranja).

Oxidaciones a escala preparativa de celobiosas con [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu(H₂O)₂](OTf)₂

Se realizaron pruebas de degradación de celobiosas (10 equivalentes con respecto al complejo de cobre) con disoluciones de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ 0.3 mM en acetonitrilo y 10 equivalentes de H₂O₂/Et₃N a 243 K (ver sección experimental). Se evaporaron los materiales volátiles a presión reducida y los sólidos resultantes se disolvieron en agua y se analizaron por HPLC-MS. Se detectaron 11 compuestos en el cromatograma, tal como se muestra en la **Figura 4.21**. La identidad de los componentes mayoritarios fue asignada con base en la comparación de los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, de donde se determina que el compuesto 1 corresponde a celobiosas, el 2 a un posible producto de monooxidación de celobiosas, los productos 7-9 a mezclas de posibles productos de deshidratación y el producto 11, con un m/z de 241, a gluconato de sodio. (ver Anexos: **Figura 8.21** y **Tabla 8.4**).

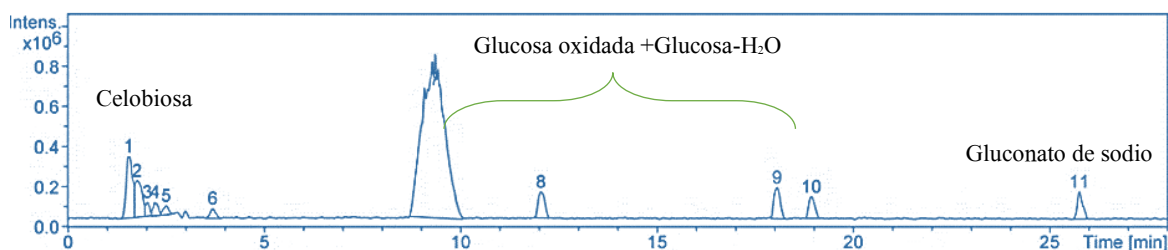


Figura 4.21. Cromatograma de productos de en disolución de acetonitrilo con 0.3 mM de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂, 10 equivalentes de H₂O₂/Et₃N y 10 equivalentes de celobiosas.

De manera similar, se realizó una reacción comparativa generando el complejo de Cu(I) *in situ* a partir de la reducción de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con 10 equivalentes de ascorbato de sodio y posterior burbujeo de O₂, seguido de la adición de 10 equivalentes de celobiosas (ver sección experimental), se detectaron 4 compuestos mayoritarios, como se muestran en la **Figura 4.22** y se con base a los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, se asignó la identidad de cada fracción: la 1, correspondiente a celobiosas, la 2 ácido ascórbico, el 3 a una mezcla de glucosa y derivado de deshidratación y la 4, con un m/z de 241, a gluconato de sodio. (ver Anexos: **Figura 8.22** y **Tabla 8.5**).

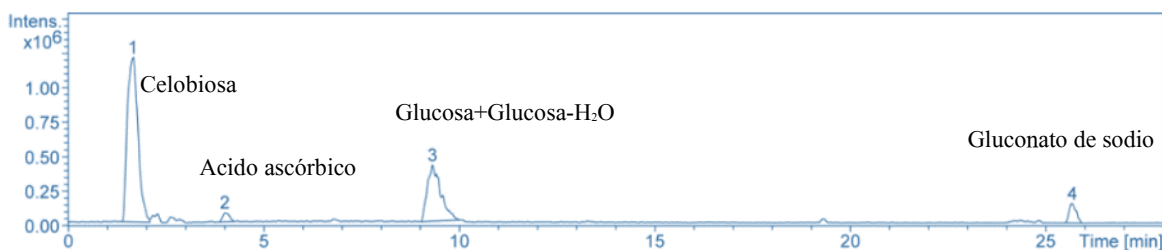


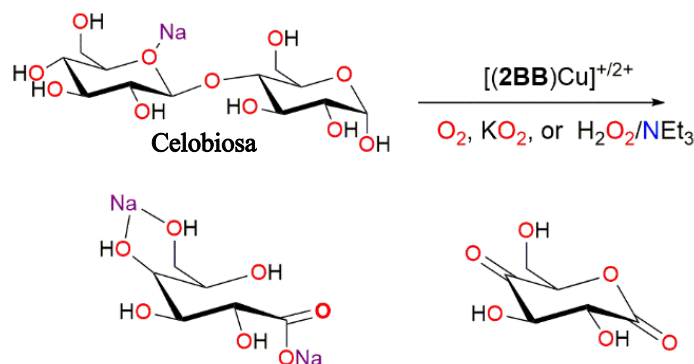
Figura 4.22. Cromatograma de la reacción de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ 0.3 mM en acetonitrilo con 10 equivalentes de L-ascorbato de sodio, burbujeo de O₂ y 10 equivalentes de celobiosas.

Así pues, siendo que como producto común de estas reacciones se detectó gluconato de sodio por HPLC-MS (**Esquema 4.3** y **Tabla 4.4**), se demuestra que el sistema [(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+} tiene

actividad biomimética para la degradación oxidativa de celobiosa en presencia del agente oxidante apropiado.

Cabe señalar que adicionalmente se hizo otra reacción empleando $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ generado *in situ* en PB con O_2 como oxidante (ver sección experimental), la cual mostró ser ligeramente más selectiva hacia la formación de ácido glucónico (cuando se emplean 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio para la reducción *in situ*) y gluconato (con 2.4 equivalentes de ascorbato de sodio), ya que se detectaron en mayor rendimiento por HPLC-MS (ver Anexos: **Figuras 8.23-8.24** y **Tablas 8.6-8.7**). En PB con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ como oxidante, la glucosa doblemente oxidada en el **Esquema 4.3**, es el producto principal (se detectaron 10 compuestos en el cromatograma de los cuales el compuesto 1 corresponde a celobiosa, 2,3 y 5 a glucosa doblemente oxidada, 4 a glucosaldehído, 6 a asociación de glucosa oxidada y producto de deshidratación, 7-9 a productos de deshidratación y el 10 a gluconato de sodio, ver Anexo **Figura 8.25** y **Tablas 8.8** con asignación de compuestos). La reacción con H_2O_2 como oxidante muestra un mayor grado de degradación de la celobiosa, pero se observan más productos (es decir, H_2O_2 es un oxidante más activo, pero menos selectivo, **Tabla 4.4**).

Las reacciones también se realizaron usando complejo cúprico reducido *in situ* (con 1.2 y 2.4 equivalentes de ascorbato) y KO_2 como agente oxidante, con productos de degradación similares detectados, además de celobiosa sin degradar (Anexos: **Figuras 8.27-8.28** y **Tablas 8.10-8.11**). Los experimentos de control con $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$, CuSO_4 , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ y $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (Anexos: **Figuras 8.29, 8.31-8.34**) no muestran degradación oxidativa de la celobiosa, aunque se detectó un producto de deshidratación previamente observado en m/z 334. Finalmente, se debe tener cuidado en la interpretación de los cromatogramas, ya que todas las muestras que contienen H_2O_2 tienen un producto de lixiviación de la columna de HPLC (Anexo **Figura 8.30**).



Esquema 4.3. Degradación de la celobiosa por $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}/\text{I}-2+/+}]$ y varios oxidantes, con los productos más relevantes detectados por HPLC-MS.

Como dato comparativo se probó la oxidación de glucosa en PB con 0.3 mM $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ y 10 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (Anexo **Figura 8.26**, **Tabla 8.9**), resultando en el producto de monooxidación como principal componente en relación con la doble oxidación (33% frente a 14%). Además de la glucosa sin reaccionar, se detectaron gluconato de sodio y gluconaldehído en pequeñas cantidades (**Tabla 4.4**). El único precedente de sistemas inorgánicos relacionados capaces de escindir derivados de glucosa no presenta

uniones directas entre glucósidos como la celobiosa, sino al 4-nitrofenolato como grupo saliente.²³

Tabla 4.4. Compendio de especies asignadas en reacciones de degradación de celobiosa y glucosa (% de rendimiento por integración de HPLC).

Condiciones	Degradación celobiosa							Degradación Glucosa
	O ₂ + Cu(I) <i>in situ</i> + 10 equiv. ascorbato de sodio	O ₂ + Cu(I) <i>in situ</i> + 1.2 equiv. ascorbato de sodio (PB)	O ₂ + Cu(I) <i>in situ</i> + 2.4 equiv. ascorbato de sodio (PB)	KO ₂ + Cu(I) <i>in situ</i> + 1.2 equiv. ascorbato de sodio (PB)	KO ₂ + Cu(I) <i>in situ</i> + 2.4 equiv. ascorbato de sodio (PB)	H ₂ O ₂ /Et ₃ N + Cu(II)(CH ₃ CN)	H ₂ O ₂ /Et ₃ N + Cu(II) (PB)	
Asignación								
% [2Celobiosa+H] ⁺	-	-	-	43.8	75	-	-	-
% [Celobiosa-OH] ⁺	-	-	-	-	-	5.1	-	-
% [Na+2Celobiosa] ⁺	-	-	-	-	-	-	8.1	-
% [Na+Celobiosa] ⁺	65	9.1	1.6	-	-	7.7	-	-
% [Na+Celobiosa-OH] ⁺	-	8	10.5	-	-	-	-	-
% [Na+Celobiosa-2OH] ⁺	28	63.5	12	-	-	70	-	-
% [Na+Glucosa] ⁺	-	-	-	2.1	4.9	-	-	13.1
% [Na+Gluconato] ⁺	5	-	19.3	4.3	-	3	2.1	1.3
% [NaGlucosil sodio éter +2H ₂ O] ⁺	-	15.6	18.5	-	-	-	-	-
% [Na+Ácido Glucónico] ⁺	-	-	-	-	1.8	-	-	-
% [K+Ácido Glucónico+H ₂ O] ⁺	-	3.8	-	-	-	-	-	-
% [Glucosa monooxidada+C ₂ H ₄ O ₂] ⁺	-	-	1.4	-	-	-	-	-
% [Glucosa doblemente oxidada+H] ⁺	-	-	2	8.7	-	-	18	14.2
% [K+Glucosa+H ₂ O] ⁺	-	-	16.5	-	-	-	-	-
% [2Celobiosa doblemente oxidada+H] ⁺	-	-	-	31.6	-	-	-	-
% [Glucosa oxidada +celobiosa+H] ⁺	-	-	-	7.2	10.8	-	15.2	33
% [Na+Glucosa +C ₃ H ₄ O ₂] ⁺	-	-	-	-	-	3.3	-	-
% [Na+Glucosa+Glucosa-2OH] ⁺	-	-	-	-	-	4	-	-
% [Na+Glucosa doblemente oxidada+2H ₂ O] ⁺	-	-	-	-	-	-	37.2	-
% [Na+Glucosa o Na+Glucaldehído] ⁺	-	-	-	-	-	-	10	4.9
% [Glucotriosa+H] ⁺	-	-	-	-	-	-	2.2	-

²³ Concia, A.L., et. al. *Inorg. Chem.* **2017**, 56, 1023; Muthuramalingam, S., et. al. *J. Catal.* **2019**, 372, 352.

Estudios computacionales

La viabilidad termodinámica de las especies cobre-oxígeno que pueden formarse en presencia de los agentes oxidantes analizados (O_2 , KO_2 y H_2O_2), fue evaluada mediante estudios de teoría de funcionales de la densidad (DFT por sus siglas en inglés). Las reacciones de $[(2BB)Cu^I]^+$, $[(2BB)Cu^{II}]^{2+}$, $[(2BB)Cu^I(S)]^+$ y $[(2BB)Cu^{II}(S)]^{2+}$ ($S = H_2O$, CH_3CN) con oxígeno molecular, superóxido de potasio o peróxido de hidrógeno fueron evaluadas teniendo en cuenta que parecen generar la especie dimérica $[\{(2BB)Cu^{II}\}_2(\mu-\eta^2:\eta^2-O_2)]^{2+}$ y potencialmente $[\{(2BB)Cu^{III}\}_2(\mu-O)_2]^{2+}$. Las estructuras optimizadas fueron validadas por comparación de los parámetros de enlace obtenidos, con los observados en la caracterización estructural de los complejos.

Complejos iniciales: $[(2BB)Cu^I]^+$ y $[(2BB)Cu^{II}]^{2+}$ fueron considerados con una molécula de agua o de CH_3CN coordinada, dado que dichos disolventes fueron empleados para mediciones físicas y pruebas de reactividad. Para ambos disolventes, la coordinación de una molécula es energéticamente favorable, con valores entre 3 y 30 kcal mol⁻¹ (Tabla 4.5). Las energías libres de Gibbs para los complejos cuprosos con disolvente coordinado, calculadas para $[(2BB)Cu^I(H_2O)]^+$ y $[(2BB)Cu^I(CH_3CN)]^+$ fueron -3 y -5 kcal mol⁻¹, bastante bajas en comparación con las constantes de enlace calculadas para sus contrapartes cúpricas. Esto es consistente con la falta de evidencia experimental para moléculas de disolvente coordinadas en estado sólido o en disolución por ESI-MS, lo cual puede ser atribuido a la alta labilidad de los centros de Cu(I). Las geometrías de $[(2BB)Cu^I]^+$ y la coordinación de disolvente relacionado $[(2BB)Cu^I(H_2O)]^+$ fueron optimizadas y sus principales parámetros geométricos se muestran en la Tabla Anexo 8.12. La optimización inicial fue ensayada con $[(2BB)Cu^I]^+$ y probada subsecuentemente con una molécula de H_2O como ligante, revelando que los átomos de nitrógeno se mantienen en una configuración plana. En la molécula resultante $[(2BB)Cu^I(H_2O)]^+$, el centro cuproso debe estar definido como tetracoordinado, pero la distancia calculada del átomo de nitrógeno de la amina central al ion Cu^+ es considerablemente más larga que en ausencia de H_2O coordinada (2.407 vs 2.940 Å).

Tabla 4.5. Energías libres de formación de $[(2BB)Cu^I]^+$ y $[(2BB)Cu^{II}]^{2+}$ con $S = H_2O$ o CH_3CN .

Reacciones	ΔG (fase gas)	ΔG (CH_3CN)
$[(2BB)Cu^I]^+ + CH_3CN \rightarrow [(2BB)Cu^I(CH_3CN)]^+$	-11.2	-4.8
$[(2BB)Cu^{II}]^{2+} + CH_3CN \rightarrow [(2BB)Cu^{II}(CH_3CN)]^{2+}$	-30.9	-16.8
$[(2BB)Cu^I]^+ + H_2O \rightarrow [(2BB)Cu^I(H_2O)]^+$	-8.9	-3.1
$[(2BB)Cu^{II}]^{2+} + H_2O \rightarrow [(2BB)Cu^{II}(H_2O)]^{2+}$	-26.6	-19.0

Propiedades redox: Los potenciales redox para los pares $[(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+}$, $[(2BB)Cu(CH_3CN)^{II/I}]^{2+/+}$ y $[(2BB)Cu(H_2O)^{II/I}]^{2+/+}$ fueron estimados por simulación de los procesos de oxidación en disolución de acetonitrilo y referenciados al par ferricinio/ferroceno.²⁴ El potencial calculado para la especie trigonal $[(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+}$ fue 219 mV, que difiere significativamente del calculado con una molécula de acetonitrilo coordinada

²⁴ Gagne, R.R., et. al. *Inorg. Chem.* **1980**, 19, 2854.

(-135 mV) o agua (-305 mV). Dado que los últimos valores, con disolvente coordinado a los centros de cobre, están razonablemente cerca al valor determinado experimentalmente en disolución de acetonitrilo ($E_{1/2} = -272$ mV vs. Fc^+/Fc), la coordinación de disolvente parece ser plausible. En todos los casos, los pares redox involucran un proceso centrado en el metal, es decir el par $\text{Cu}^{\text{II/I}}$.

Especies diméricas: Durante nuestros intentos por detectar especies cobre-oxígeno que pueden ser responsables de la oxidación de celobiosa, los candidatos principales son las especies dicobre(II) $[\{(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$ y derivados que tienen acetato como co-ligante. Debido a que varias geometrías para los núcleos Cu_2O_2 se han descrito en la literatura,²⁵ se consideraron diferentes conformaciones de los ligandos en la optimización molecular de especies dicobre, **Figura 4.24**. Sus energías relativas en acetonitrilo fueron calculadas (**Tabla 8.13**) y, como se esperaba teniendo en cuenta los resultados experimentales, los complejos bimetalícos mostraron ser más estables que los complejos mononucleares de Cu(I) con arreglo de T por más de 20 kcal mol⁻¹ en CH_3CN . Sin embargo, la presencia de acetato modifica la coordinación de dioxígeno alrededor de los centros metálicos, prediciendo la especie adicional $[\{(\mathbf{2BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1\text{-O}_2)(\mu\text{-AcO})]^+$.

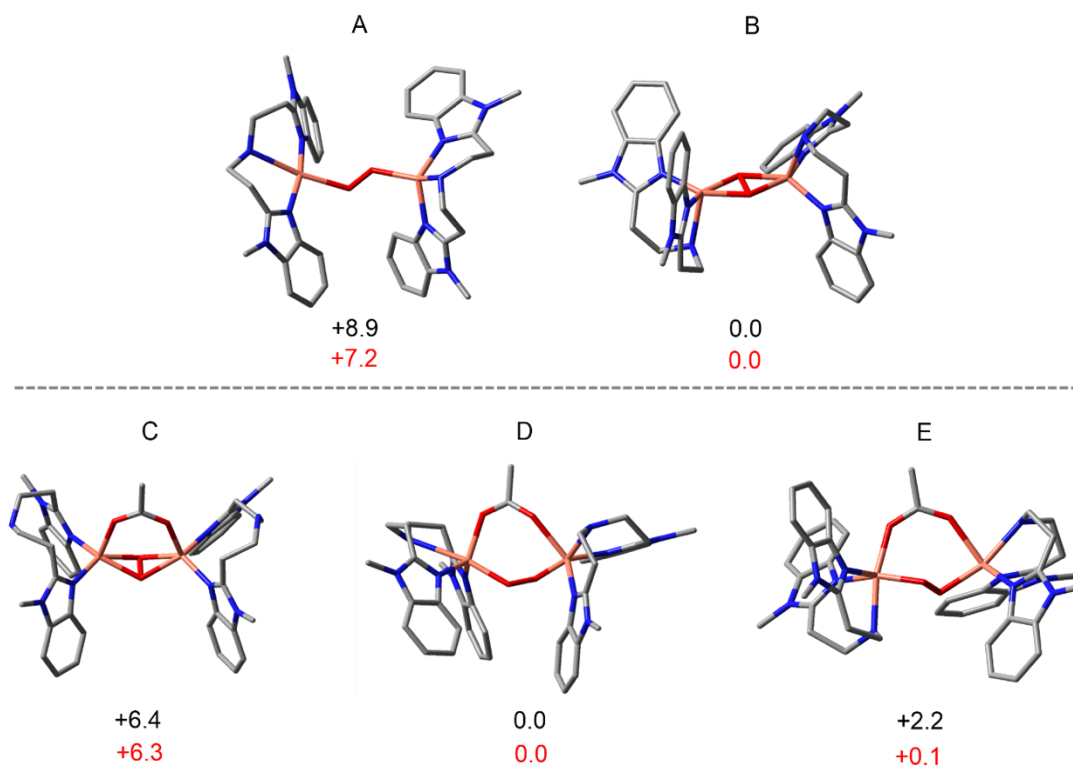


Figura 4.24. Complejos diméricos calculados, con diferencia de energías en kcal mol⁻¹ (las letras negras corresponden a la fase gaseosa, las letras rojas corresponden a las de acetonitrilo como PCM).

²⁵ Baldwin, M.J., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10421; Pidcock, E., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1299; Ottenwaelder, X., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9268; Funahashi, Y., et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16444.

Los espectros de UV-vis fueron calculados para complejos con y sin acetato como co-ligante (**Figura 4.25**). Aparentemente, la coordinación de un acetato puente no altera las transiciones electrónicas principales en los complejos bimetalicos. Para $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$, fue calculada una banda intensa alrededor de 330 nm con carácter de transferencia de carga de **2BB** a dióxígeno, junto con una señal más débil en 420 nm con carácter MLTC. La primera banda es consistente con la absorción en 365 nm observada experimentalmente. Para la especie optimizada $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1\text{-O}_2)(\mu\text{-AcO})]^+$ (especie D en la **Figura 4.24**), una banda de intensidad media se predice en 420 nm, aunque la predicha en 650 nm no se observa experimentalmente (**Figuras 4.24 y 4.26**); la asignación de $[\{(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}\}_2(\mu\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1\text{-O}_2)(\mu\text{-AcO})]^+$ es solamente tentativa, sin verificación experimental.

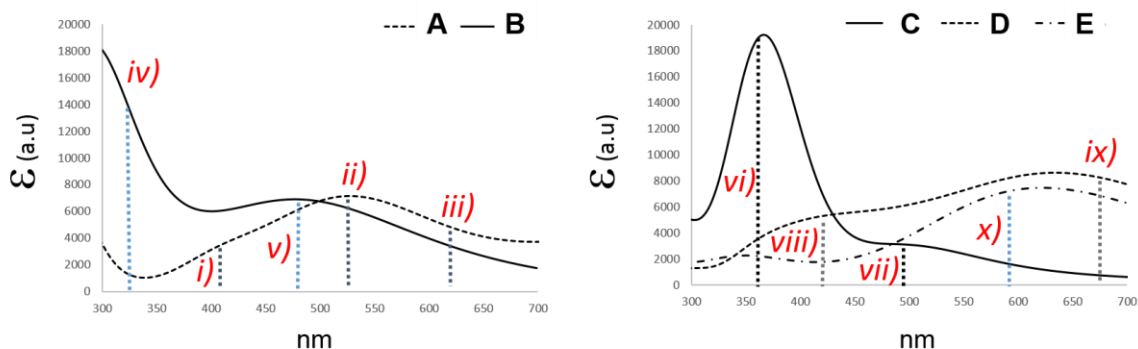


Figura 4.25. Espectros simulados de UV-vis de las especies diméricas A-E (ver **Figura 4.24**) de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ con una molécula de O_2 , con o sin CH_3COO^- (AcO^-) en la fase gas y CH_3CN como PCM.

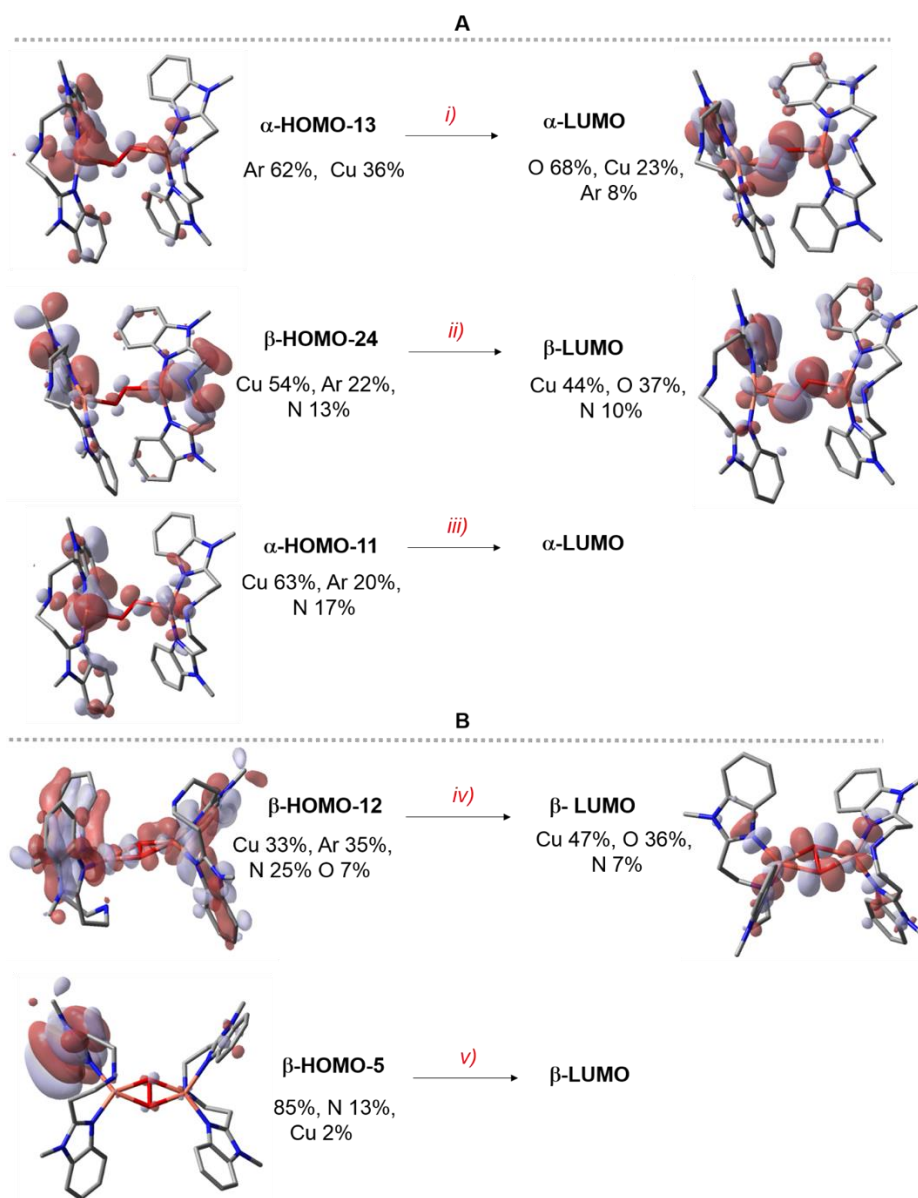


Figura 4.26. Transiciones electrónicas calculadas para los espectros UV-vis simulados de las especies A-E.

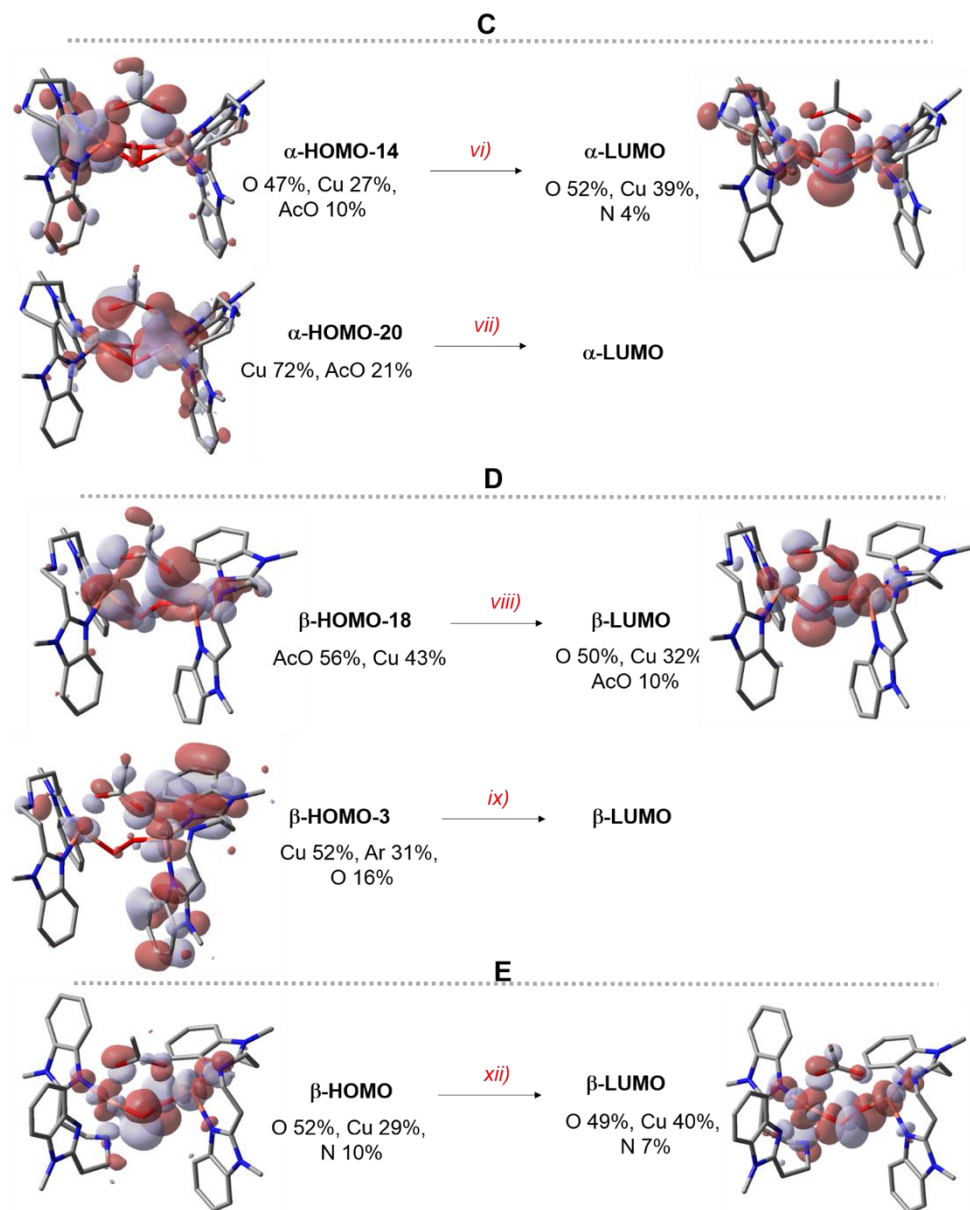


Figura 4.26. Transiciones electrónicas calculadas para los espectros UV-vis simulados de las especies A-E (continuación).

Capítulo V. Conclusiones

$[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ actúa como un modelo estructural y electrónico del sitio reducido de las enzimas LPMO. Los estudios de especiación a diferentes valores de pH, junto con las mediciones electroquímicas y de espectrometría de masas a pH 9.0-10.5, nos permiten establecer que el pK_a de las moléculas de agua unidas a los centros cúpricos coordinados a **2BB** es más bajo que el de la amina central del ligante. Esta observación es relevante para el sistema enzimático, donde parece estar imposibilitada la deprotonación de la amina en el abrazo de histidina que se ha propuesto en la literatura.

La escisión oxidativa de celobiosa como sustrato modelo de polisacáridos como la celulosa puede efectuarse en presencia de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ o $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ bajo las condiciones apropiadas. La identificación clara de una especie cobre-oxígeno responsable de la activación C-H que conlleva a la ruptura oxidativa de la celobiosa no fue posible a través de los métodos espectroscópicos empleados: absorción UV-vis a baja temperatura, espectrometría de masas, Raman resonante o RPE en CH_3CN o PB. Sin embargo, se detectaron especies intermediarias reactivas potenciales por ESI-MS, y también se identificó el complejo $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ como el producto final común a todos los estudios de reactividad llevados a cabo, lo cual proporcionó algunas pistas con respecto a las posibilidades mecanísticas descritas.

Los estudios de HPLC-MS a escala preparativa evidenciaron mayor degradación de celobiosa cuando se proporcionó una fuente más reducida como agente oxidante en nuestro sistema (es decir H_2O_2 vs O_2), lo cual sin embargo conllevó a una menor selectividad. Esto es consistente con el mecanismo tentativo que se ha propuesto para las LPMOs, el cual implica que la combinación reactiva más competente es $\text{Cu}(\text{I})/\text{H}_2\text{O}_2$.¹ Además existen propuestas donde H_2O_2 se postula como el agente oxidante natural para la degradación de polisacáridos.² No obstante, la identificación de las especies activas cobre-oxígeno involucradas en el paso clave de activación de enlaces C-H sigue siendo un desafío en la química bioinorgánica del cobre.

¹ Walton, P. H., et. al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, 31, 195.

² Itoh, S. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2066; Quist, D.A., et. al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, 22, 253.

Capítulo VI. Perspectivas

Como complemento de los resultados obtenidos con el sistema $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$ para publicación se deben repetir los estudios de degradación de polisacáridos recalcitrantes diferentes a celobiosa.

Con el fin de establecer estudios comparativos, estructurales y funcionales de los sistemas basados en bencimidazol e inspirados en el sitio activo de las LPMO, se requiere realizar la síntesis y caracterización completa de los complejos cúpricos y cuprosos con los otros ligantes propuestos: (1F-2B) y (2F-2B), cuyas estructuras se referencian en la **Figura 8.1**.

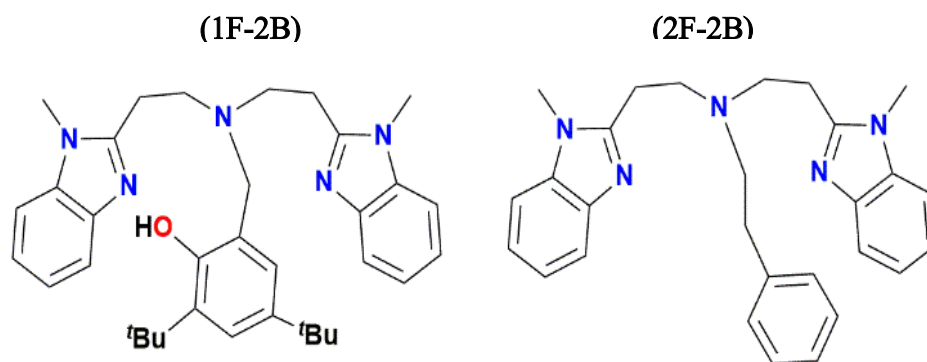


Figura 8.1. Estructuras de los ligantes complementarios basados en bencimidazol.

Adicionalmente, se requiere establecer las características redox inferidas por los sistemas $[(1\text{F-2B})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$ y $[(2\text{F-2B})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$, compararlas con el que provee $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$, y así poder adquirir información sistemática inherente a la implicación estructural en las características electrónicas y de mecanismo de degradación de polisacáridos recalcitrantes. Simultáneamente se deberá correlacionar con la información existente para el proceso de oxidación de polisacáridos de difícil degradación por enzimas LPMO en consideración a la estructura del sitio activo.

Es necesario realizar las pruebas de reactividad y monitoreo (por espectroscopía UV-vis, RPE, Raman resonante, CSI-MS entre otras) de los sistemas $[(1\text{F-2B})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$ y $[(2\text{F-2B})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$ con los diferentes agentes oxidantes: O_2 , KO_2 , H_2O_2 , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, de manera análoga al trabajo hecho para el sistema $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$, con miras a establecer las diferentes especies cobre-oxígeno que se favorecen en cada caso. De esta forma se podrá establecer de manera más firme la actividad oxidativa con las potenciales especies cobre-oxígeno generadas en la degradación de celobiosa.

Finalmente, se deberán complementar los estudios de degradación de celobiosa, para extenderlos a celulosa y nuevos polisacáridos mediante estudios de HPLC-MS, empleando los sistemas propuestos $[(1\text{F-2B})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$ y $[(2\text{F-2B})\text{Cu}^{\text{II/I}}]^{2+/+}$.

Capítulo VII. Sección experimental

7.1 General. Todos los procedimientos sintéticos para compuestos sensibles al aire fueron realizados bajo atmósfera de nitrógeno seco en la caja de guantes MBraun o por técnicas de Schlenk convencionales en línea de vacío/N₂. El THF y el éter etílico se obtuvieron libres de oxígeno y de agua destilando sobre sodio/benzofenona bajo atmósfera de N₂; el acetonitrilo fue destilado con CaH₂. Para análisis de RMN se utilizaron CDCl₃ 99.8% y CD₃CN 99.8%, obtenidos de Sigma-Aldrich o Cambridge Isotope Laboratories. Los reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales y se usaron tal como se recibieron; **2BB**¹ y [(**2BB**)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂² fueron sintetizados de acuerdo a los procedimientos reportados en la literatura.

7.2 Equipos. Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Electrothermal MelTemp y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo se adquirieron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 entre 4000 y 400 cm⁻¹ como pastillas de KBr. Los experimentos de monitoreo por UV-visible se realizaron empleando el espectrofotómetro Agilent modelo 8453 equipado con criostato Unisoku USP-203-A refrigerado con nitrógeno líquido. Los análisis elementales fueron obtenidos con un instrumento Exeter Analytical CE-440. Los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) se adquirieron en tubos de cuarzo a 77K con un espectrómetro JEOL JES-TE300 de 1.4T de campo magnético de banda X (9.4GHz). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ¹H y ¹³C se adquirieron con un espectrómetro JEOL Eclipse 300 o un Bruker Avance DRX a 300 y 75 MHz o 500 y 125 MHz respectivamente, usando la señal residual de disolvente prótico residual o TMS como referencias internas (TMS δ = 0.00, CHCl₃ δ = 7.26 ppm, CD₃CN δ = 1.94). Los experimentos de espectrometría de masas mediante ionización por electrospray (ESI-MS) se determinaron con un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA. Los espectros de masas por bombardeo de átomos rápidos en modo positivo (FAB⁺) fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas JEOL JMS-SX-102A operado a un voltaje de aceleración de 10 kV de una matriz de alcohol nitrobenílico, usando átomos de Xenón a 6 keV. Los espectros de masas por ionización por Criospray fueron obtenidos en un instrumento Bruker MicrOTOF-Q II perteneciente a los Serveis Tecnics de la Universidad de Girona. Las muestras fueron introducidas en un espectrómetro de masas por inyección directa a la fuente de iones usando una jeringa y fueron calibradas externamente usando formiato de sodio. Se usó un aditivo de criospray. La temperatura de la nebulización y secado de gases fue fijada a -30°C. El instrumento fue operado en modos de ionización tanto positivo como negativo.

7.3 Cristalografía de rayos X. Se montó un monocristal de [(**2BB**)Cu^I]OTf en una fibra de vidrio y la muestra se estudió en un difractómetro Oxford Diffraction Gemini "A" con un área de detector CCD (λ_{MoKα} = 0.71073 Å, monocromador: grafito) equipado con una fuente de rayos-X sellada a 130 K. las constantes de celda unitaria se determinaron con un set de escaners 15/3 marcos/medición (1° en ω). El set de datos consistió en 235 marcos y una

¹ Sorrell, T.N., et.al., *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 207; Casella, L., et. al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 3203.

² Casella, L., et. al. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 1101; Castillo, I., et. al., *Inorg. Chim. Acta.* **2014**, 422, 152.

distancia de cristal al detector de 55.00 mm. El método de doble paso de barrido fue usado para excluir cualquier ruido. Las frames colectadas fueron integradas usando una matriz de orientación determinada a partir de los marcos adquiridos. Los paquetes de software CrysAlisPro y CrysAlis RED se usaron para la recolección de datos e integración.³ El análisis de los datos integrados no reveló decaimiento alguno. Las constantes de celda finales fueron determinadas por un refinamiento global de 12733 reflexiones ($\theta < 29.51^\circ$). los datos recolectados fueron corregidos por absorción, midiendo corrección de absorción analítica usando un modelo cristalino multifacético basado en expresiones bajo la simetría Laue usando reflexiones equivalentes.⁴ La resolución estructural y refinamiento fueron llevados a cabo con los software SHELXS-2014⁵, SHELXL-2014⁶ y WinGX v2014.1,⁷ para preparar el material para publicación. Refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa fue llevado a cabo por minimización ($F_o^2 - F_c^2$).² Todos los átomos diferentes de hidrógeno fueron refinados anisotrópicamente. El átomo de H del grupo amino (H–N) fue ubicado en el mapa de diferencia y refinado isotrópicamente con $U_{iso}(H) = 1.2$ para H–N. los átomos de H unidos a los átomos de C fueron ubicados en posiciones idealizadas geométricamente y refinadas como si se trabajara con sus átomos padre, con C–H = 0.95– 0.99 Å y con $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C)$ para los grupos aromáticos y grupos metileno y $U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(C)$ para los grupos metilo. Un resumen de los datos cristalográficos se presenta en las **Tablas Anexo 8.1-8.3**, del capítulo de caracterización. Las figuras de las estructuras cristalinas fueron adquiridas con el programa Mercury versión 1.1.4 para Windows. Los datos cristalográficos se han depositado en el Centro de Datos Cristalográficos Cambridge CCDC 1821707. Copias de los datos pueden ser obtenidos sin cargo del CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

7.4 Detalles computacionales. Cálculos sin restricciones fueron llevados a cabo usando el paquete Gaussian 09.⁸ Se aplicó el método de funcional híbrido de densidad conocido como B3LYP.⁹ Potenciales efectivos de núcleo (ECP) fueron usados para representar los electrones más internos de los átomos de metales de transición y el set de base de calidad de doble valencia- ζ LANL2DZ asociado con los pseudopotenciales.¹⁰ El conjunto de base que fue usado para los elementos de grupo principal fue 6-31G*.¹¹ Los efectos de disolvente fueron tomados en cuenta en los cálculos como campos dieléctricos continuos (acetónitrilo, $\epsilon = 36.64$ y agua $\epsilon = 78.3553$)¹² mediante el uso de geometrías optimizadas para la fase gas (cálculos de punto único). Las energías libres de Gibbs en disolución fueron calculadas a partir del ciclo termodinámico de procesos químicos por adición de los efectos de disolvente. Los potenciales redox fueron estimados a partir de estos cálculos de disolvente usando como referencia el valor de 5.08 V para el estándar absoluto de electrodo de hidrógeno (SHE) en acetónitrilo.¹³ Los parámetros geométricos fueron analizados usando el programa SHAPE.¹⁴

³ Agilent (2013). CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England.

⁴ Clark, R.C., et. al. The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals. *Acta Cryst.* **1995**, 51, 887.

⁵ Sheldrick, G.M. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Cryst.* **2015**, A71, 3.

⁶ Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Cryst.* **2015**, C71, 3.

⁷ Farrugia, L.J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 837.

⁸ Frisch, M.J., et. al. Gaussian 09, Revision A.02; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, **2016**.

⁹ Becke, A.D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648; Lee, C., et. al. *Phys. Rev. B.* **1988**, 37, 785.

¹⁰ Hay, P.J., et. al. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299.

¹¹ Hariharan, P.C. et. al. *Theor. Chim. Acta.* **1973**, 28, 213; Francel, M. M., et. al. *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 3654.

¹² Tomasi, J., et. al. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2027; Amovilli, C., et. al. *Adv. Quantum Chem.* **1998**, 32, 227.

¹³ Trasatti, S. *Pure Appl. Chem.* **1986**, 58, 955; Persson, I. *Pure Appl. Chem.* **1986**, 58, 1153.

¹⁴ SHAPE, version 2.0, Llunell, M.; Casanova, D.; Cirera, J.; Alemany, P.; Alvarez, S. Barcelona, **2010**.

Las energías de excitación vertical fueron obtenidas a partir de TD-DFT tal como se implementó en Gaussian 09 en presencia de disolvente (acetonitrilo). Los cálculos fueron desarrollados al mismo nivel computacional como estados singulete para las especies diméricas, usando la aproximación de simetría rota. También se calcularon estados singulete y triplete de capa cerrada, observando tan solo pequeñas diferencias energéticas.

7.5 Electroquímica. Las mediciones de voltamperometría cíclica fueron hechas bajo atmósfera de N₂ en CH₃CN anhidro o en disoluciones de buffer de carbonato a pH 10.5 o buffer de fosfato a pH = 5.0, 7.0 y 9.0, con un potenciostato-galvanostato CH Instruments equipado con un electrodo de trabajo de carbono vítreo y un electrodo auxiliar de platino. Los potenciales fueron tomados versus un electrodo de pseudoreferencia de AgBr(s)/Ag(alambre) inmerso en una disolución 0.1 M de NBu₄Br en acetonitrilo o en agua destilada, dependiendo del experimento. Todos los voltamperogramas fueron adquiridos desde el potencial de corriente nula ($E_i = 0$) y fueron tomados en ambas direcciones, positiva y negativa, a una velocidad de barrido de 0.10 V s⁻¹. De acuerdo con la convención de la IUPAC, los voltamperogramas medidos en acetonitrilo fueron referenciados contra el sistema ferricinio/ferroceno (Fc⁺/Fc)¹⁵ para establecer los valores de potenciales de media onda ($E_{1/2}$) a partir de la expresión $E_{1/2} = (E_a + E_c)/2$. Para obtener el valor de corriente normalizada para cada complejo, la corriente medida fue dividida en la concentración molar exacta de las especies electroactivas.

7.6 Estudios en disolución. Para las titulaciones potenciométricas, el electrodo fue calibrado en agua, usando buffers estándar a 25°C. Fue empleada una disolución comercial 0.1 M de NaOH, a la cual se le determinó la cantidad de carbonatos presentes usando el método de Gran, asegurando que su concentración fuera menor al 5%. La disolución de HNO₃ a concentración 8 mM fue preparada directamente de ácido concentrado. Se usó biftalato de potasio como estándar interno (previo secado en estufa a vacío por 24 h antes de usar). Los analitos **2BB** y [(**2BB**)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ fueron acidificados en una relación 1:8 con respecto a HNO₃ para asegurar la protonación completa, manteniendo en cada caso una concentración igual a 1.21×10^{-3} mol L⁻¹. Durante todas las mediciones, las disoluciones fueron mantenidas en una celda especial con un recirculador de agua a 25°C, agitadas bajo atmósfera de nitrógeno, controlando la fuerza iónica a 0.1 M con NaNO₃ y trabajando exclusivamente bajo condiciones homogéneas. Los datos potenciométricos fueron obtenidos por triplicado para cada caso (ácido, base, estándar interno, analitos) usando el titulador automático Titrino 702 SM y el programa TIAMO1.3; para cada triplicado se determinó la desviación estándar y los valores finales fueron promediados. Subsecuentemente, el software Hyperquad¹⁶ fue empleado para simular los datos obtenidos, de tal manera que las constantes se ajustaran al modelo con una χ^2 menor a 12.6 con 95% de confianza y finalmente, la distribución de especies fue determinada usando el programa MEDUSA.¹⁷ Los valores estimados de pK_a se muestran en la **Figura 4.3**.

7.7 Síntesis de [(2BB**)Cu^I]OTf.** En la caja de guantes a atmósfera inerte, se disolvieron (**2BB**) (100 mg, 0.30 mmol) y [Cu^I(CH₃CN)₄]OTf (113 mg, 0.30 mmol) en 10 mL de CH₃CN

¹⁵ Gagne, R. R., et. al. *Inorg. Chem.* **1980**, 19, 2854.

¹⁶ Gans, P., et. al. *Talanta*, **1996**, 43, 1739.

¹⁷ Puigdomenech, I. MEDUSA: make equilibrium diagrams using sophisticated algorithms. KTH, Stockholm; **2009**.

anhidro; luego de 3 h, los volátiles se evaporaron a presión reducida y los sólidos obtenidos fueron lavados con 10 mL de éter etílico anhidro para dar lugar a un producto microcristalino incoloro [(2BB)Cu^I]OTf (39 mg): Rendimiento: 24%; p.f. 150-152°C; ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN): δ 7.46 (s, 5H, Ar), δ 7.26 (s, 1H, Ar), δ 7.11 (p, J = 7.2 Hz, 5H, Ar), δ 5.30 (dd, J = 13.4, 3.3 Hz, 1H, NH), δ 3.42 (m, 7H, N-metilo), δ 3.21 (m, 1H, CH₂N-), δ 3.02 (dt, J = 40.4, 20.2 Hz, 4H, CH₂C-); ESI-MS *m/z*: [(2BB)Cu^I]⁺ = 396, [(2BB)Cu^I(OTf)]⁺ = 545; UV-vis (CH₃CN): 264 (1744), 270 (1577), 282 (7044); IR (KBr): 3273, 2957, 2906, 2852, 1614, 1503, 1481, 1452, 1410, 1327, 1257, 1227, 1147, 1067, 1027, 974, 936, 850, 825, 750, 656, 633, 570, 515, 455, 434; Análisis elemental calculado para C₂₁H₂₂CuF₃N₅O₃S (%): C, 46.28; H, 4.07; N, 12.85; experimental: C, 46.71; H, 4.15; N, 12.75.

7.8 Deprotonación de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ con Et₃N. El experimento de deprotonación para [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ fue llevado a cabo en una celda de UV-vis a temperatura ambiente, usando 2 mL de disolución de complejo a concentración 0.3 mM en disolución de acetonitrilo del complejo. La adición de un equivalente de Et₃N (2 μL en acetonitrilo) fue seguida por UV-vis cada 5 minutos por un lapso de 20 minutos, manteniendo agitación constante. El procedimiento de adición de base se repitió tres veces más para una adición total de 4 equivalentes. **Figura 4.7.**

7.9 Generalidades de los estudios de reactividad. Los estudios de reactividad que se llevaron a cabo con los complejos (2BB)-cobre, fueron monitoreados por UV-vis, ESI-MS y RPE. Para UV-vis, fueron preparadas disoluciones de concentración 0.3 mM del complejo en estudio, 2.5 mL de disolución fueron transferidas a una celda óptica de 1 cm (tipo Schlenk en caso del complejo cuproso, la cual fue sellada con un septum de goma). La celda fue transferida a un criostato pre-enfriado y llevada a 243 o 273 K, dependiendo del disolvente usado (CH₃CN, PB pH 7.0) permitiendo llegar al equilibrio de temperatura por 20 minutos antes de la reacción. La oxigenación del complejo cuproso fue llevada a cabo, mediante el burbujeo de dióxígeno por 50 s a través de la disolución usando una cánula; la adición de KO₂, H₂O₂ 35% o H₂O₂/Et₃N disueltos en CH₃CN, H₂O, o una mezcla MeOH/CH₃CN (2:3) fue hecha de forma tal que por cada 2 μL de disolución, estuviera presente 1 equivalente de agente oxidante. La estabilidad de las especies formadas fue monitoreada mediante la medición de absorbancia cada 5 min por un periodo de una hora. La reversibilidad de cada sistema generado, también fue determinada mediante burbujeo de Ar por cánula a la disolución durante 50 s. Una vez las especies cobre-oxígeno se formaron, se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa como sustrato (disueltos en 20 μL de agua o de la mezcla 2:3 H₂O/CH₃CN) bajo agitación; las muestras fueron monitoreadas midiendo absorbancia cada 5 min por lapso de 40 min. Las mismas muestras fueron inyectadas al espectrómetro ESI-MS bajo las condiciones adecuadas.

La caracterización por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE) de banda-X fue realizada en acetonitrilo congelado o PB pH 7.0/glicerol. En tubos quartz de RPE se tomaron 200 μL de disolución stock 3 mM del complejo cuproso o cúprico en CH₃CN o PB/glicerol ([(2BB)Cu^I]OTf fue preparado en caja de guantes bajo atmósfera de nitrógeno) y fueron sellados con septum de goma. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido antes de la adquisición espectral a 77 K para CH₃CN y PB/glicerol. Los tubos fueron calentados en baños de hielo (273 para disolución en PB) o hielo:acetona (243 K para disolución en

CH₃CN) hasta que las muestras se volvieron fluidas. La oxigenación de los complejos cuprosos fue llevada a cabo mediante burbujeo de O₂ por 50 s a través de las disoluciones, usando una cánula larga. Los agentes oxidantes usados fueron: KO₂ en 1:1 metanol/acetonitrilo o H₂O₂; H₂O₂ o H₂O₂/Et₃N, manteniendo la relación de tal forma que cada 2 µL de disolución, contuvieran 1 equivalente de agente oxidante. Posterior a la adición, los espectros fueron adquiridos nuevamente a 77 K. Después de la formación de las especies cobre-oxígeno, se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 20 µL (de agua o la mezcla 2:3 MeOH/CH₃CN) y el espectro se adquirió a 77 K. La generación *in situ* del complejo de Cu(I) a partir de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ fue realizada mediante adición de 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio en 20 µL de agua destilada o la mezcla 2:3 MeOH/CH₃CN.

Los espectros Raman a 355 y 405 nm fueron tomados a -30°C (soporte de celda QNW de control de temperatura) y temperatura ambiente. Los espectros Raman tomados a 355 (láser Cobolt, 10 mW) y 457 (láser Cobolt, 50 mW) usaron un sistema elaborado en el laboratorio, en el cual el láser se enfocó en la muestra en una disposición de retrodispersión de 180° y la dispersión Raman se recolectó colimada y posteriormente fue reenfozada a través de un par de lentes plano-convexas de 2.5 cm de diámetro (f = 15 y 10 cm, respectivamente). La luz recolectada se filtró con un filtro de borde de paso largo apropiado (Semrock) y se dispersó con un espectrógrafo Shamrock500i (ancho de corte 80 micrones, Andor Technology) con una rejilla de 2400 L/mm a 300 nm y un espectrógrafo Shamrock300i (ancho de corte 80 micrones, Andor Technology) con una rejilla de 1200 L/mm a 500 nm, respectivamente. Los datos se registraron usando Andor Solis (Andor Technology) con calibración espectral realizada usando el espectro Raman de acetonitrilo/tolueno 50:50 (v:v).¹⁸ Las muestras se mantuvieron en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria. El análisis y procesamiento de espectros se realizó utilizando el programa Spectragryph 1.2.11.¹⁹

7.9.1 Reactividad de [(2BB)Cu^I]OTf con O₂ y celobiosa. Para las especies cobre-oxígeno generadas después de la oxigenación de [(2BB)Cu^I]OTf en disolución de acetonitrilo, la estabilidad de las especies formadas fue monitoreada midiendo la absorbancia en 360 nm a 243 K, **Figura 4.8**. Se burbujeó argón a través de la disolución para determinar la estabilidad de las especies formadas y posteriormente, 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 20 µL de agua fueron añadidos. Los productos en la mezcla de reacción fueron caracterizados mediante ESI-MS. También se llevaron a cabo experimentos a temperatura variable previos a la adición de celobiosa.

7.9.2 Caracterización RPE de las especies Cu(I) + O₂. A disoluciones 3 Mm de [(2BB)Cu^I]OTf en acetonitrilo congelado (77 K) o THF (133 K) se les burbujeó dioxígeno lentamente para formar las especies cobre-oxígeno y seguidamente se adquirió cada espectro (77 K o 133 K). Las muestras fueron mantenidas en refrigeración (255 K) por 24 horas y el espectro fue adquirido nuevamente a 77 K.

7.9.3 Experimentos RPE de [(2BB)Cu]OTf generado *in situ* en Buffer de Fosfatos pH 7.0/glicerol o en CH₃CN. El complejo [(2BB)Cu^I]⁺ se generó *in situ* en buffer de fosfatos (PB)

¹⁸ McCreery, R. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. Ch. 10, John Wiley & sons, Inc. New York, 2000.

¹⁹ <https://www.effemm2.de/spectragryph/>.

a pH 7.0/glicerol a partir de 300 μ L de disolución 3mM de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ con 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio en agua. Luego de que se burbujeó oxígeno a través de la disolución y se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa disuelta en agua. Finalmente, se elevó la temperatura de los tubos hasta 273 o 243 K y esta condición se mantuvo por 2 h, se congeló en nitrógeno líquido y se adquirió un espectro final.

7.9.4 Espectros RPE de $[(2BB)Cu^I]$ generado *in situ* en PB/glicerol + celobiosa. Una variación del experimento previo se llevó a cabo a partir de una disolución en PB de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ a 273 K, luego se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa disuelta en agua y finalmente se burbujeó O_2 . La disolución se mantuvo a 273 K por 1 h y luego se enfrió a 77 K para adquirir el espectro. Posteriormente se agregaron 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio disueltos en agua, y se obtuvo un espectro. Se burbujeó oxígeno a la muestra, la disolución se mantuvo a 273 K por 20 min y luego se adquirió un nuevo espectro. Subsecuentemente, el tubo se mantuvo a 243 K por 2 h y después de congelar en nitrógeno líquido, se tomó el espectro RPE.

7.9.5 Reactividad con KO_2 . Una disolución de $[(2BB)Cu^I]OTf$ en acetonitrilo se mantuvo a 243 K y empleando una cánula, se adicionaron 1.2 equivalentes de KO_2 en MeOH/ CH_3CN y la reacción fue monitoreada midiendo la absorbancia máxima en 365 nm cada 5 min por un periodo de 40 min, luego se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa y se monitoreó cada 5 min por 40 min adicionales. El producto generado en CH_3CN posterior a la adición de KO_2 se analizó por ESI-MS, **Figura 4.10**.

Un segundo experimento fue llevado a cabo generando el complejo de Cu(I) *in situ* por adición de 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio disueltos en 20 μ L de agua a una disolución de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ en PB a 273 K. Tan pronto como la disolución de KO_2 fue agregada, la reacción fue monitoreada por UV-vis cada 5 min por periodo de 1 h. Los productos generados luego de la adición de KO_2 se analizaron por ESI-MS, **Figura 4.11**.

Se realizaron estudios complementarios de RPE para $[(2BB)Cu^I]OTf$ en disoluciones de acetonitrilo o PB pH 7 congelado (77 K). Se adicionaron 10 equivalentes de KO_2 disuelto en 6 μ L 1:1 metanol/acetonitrilo (se tomó espectro RPE a 77 K) y después se adicionó celobiosa (10 equivalentes en 2:3 MeOH/ CH_3CN), se dejó una hora de reacción a 243 K y se tomó espectro nuevamente a 77 K, **Anexo Figuras 8.12 y 8.13**.

En PB, $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ se redujo *in situ* con 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio; el espectro RPE se adquirió a 77 K antes y después de la reducción. Luego fueron adicionados 1.2 equivalentes de KO_2 disueltos en agua destilada y finalmente, se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa disueltos en agua destilada. Se tomó el espectro una vez adicionado cada reactivo y después de una hora de reacción a 273 K, se congeló la muestra a 77 K, **Anexo Figura 8.14**. Para las especies cobre-oxígeno generadas a partir de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ y KO_2 , se llevaron a cabo estudios de UV-vis en disoluciones de CH_3CN o PB pH 7 a 243 K o 273 K, respectivamente. Tan pronto como la disolución de KO_2 se adicionó (1.2 equivalentes en 2:3 CH_3CN/H_2O o agua pura, respectivamente), se monitoreó la reacción cada 5 min por un periodo de 40 min midiendo el espectro UV-vis. El comportamiento espectral en CH_3CN y PB se monitoreó cada 5 min por lapso de una hora una vez se adicionaron 10 equivalentes de celobiosa disueltos en agua destilada a 273 K.

7.9.6 Reactividad de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ con H_2O_2 , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ y celobiosa. Se transfirieron disoluciones del complejo $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en CH_3CN y PB a celdas y se enfriaron a 243 K o 273 K respectivamente. Se agregaron 1-5 equivalentes de H_2O_2 en disoluciones de acetonitrilo o PB en cada. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se realizó una segunda prueba con una disolución en acetonitrilo de la mezcla 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (16 μL). Cuando se adicionó la disolución de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, se monitoreó la formación de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-O}_2)](\text{OTf})_2$ midiendo la absorbancia máxima en 365 nm, **Figura 4.12**. Se burbujó argón a través de la disolución para verificar la reversibilidad y luego 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 20 μL de agua fueron adicionados, **Figura 4.13**. Se caracterizó por CSI-MS en tiempo real la naturaleza de las especies Cu-oxígeno generadas luego de la adición de agente oxidante y los productos en la mezcla de reacción con celobiosa fueron caracterizados por HPLC-MS.

7.9.7 Caracterización RPE de especies $\text{Cu}(\text{II}) + \text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$. Caracterización RPE de las especies cobre-oxígeno generadas a partir de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en presencia de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, fue llevada a cabo en disolución de acetonitrilo congelado. La muestra de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en CH_3CN se dispuso en un tubo de cuarzo y el espectro que se adquirió a 77 K. Después de calentar a 243 K, se adicionaron 5 equivalentes de la mezcla 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en acetonitrilo. La muestra se mantuvo a 255 K por 24 h y el espectro que se adquirió nuevamente a 77 K.

7.9.8 Reactividad de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en presencia de acetato de sodio. La reactividad de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en disolución de acetonitrilo con 3 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ disueltos en 6 μL de acetonitrilo se analizó en presencia de 3 equivalentes de NaOAc mediante espectroscopía UV-vis. La reacción se monitoreó cada 5 min por periodo de 1h, **Figura 4.16** y luego se fue elevando la temperatura a 293 K en intervalos de 10 K. Los productos en la mezcla de reacción fueron caracterizados por ESI-MS. También fueron adquiridos espectros criogénicos de masas bajo las mismas condiciones, para ello se realizaron mediciones de espectrometría de masas de ionización por criospray (CSI) empleando un instrumento Bruker MicrOTOF-Q II perteneciente a Servicios Técnicos de la Universidad de Girona. Las muestras fueron introducidas en la fuente de iones de espectrómetro de masas mediante inyección directa usando una jeringa y usando formiato de sodio como estándar externo de calibración. Un aditamento de criospray fue usado para CSI-MS. La temperatura de nebulización y secado de gases fue ajustada a 243 K. El voltaje de capilaridad fue fijado a -4500 V y la energía de colisión a 8-10 eV. El instrumento fue operado tanto en modo de ionización positivo, como en modo negativo. Siguiendo el procedimiento de reactividad descrito y monitoreando el proceso mediante UV-vis. Una muestra fue tomada de la celda con una pipeta Pasteur pre-enfriada y se dispuso en un vial a baño de acetonitrilo-nitrógeno líquido (243 K) e inmediatamente se inyectó en el instrumento MicrOTOF-Q II usando una jeringa Hamilton mantenida a 243 K. Se incrementó la temperatura hasta 293 K en la celda UV-vis y después del decaimiento de la banda a 365 nm (75 min), una nueva muestra fue inyectada. Estudios de RPE complementarios se llevaron a cabo en disoluciones de acetonitrilo congelado. El espectro de la muestra de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ fue adquirido a 77 K, se adicionó una disolución de acetato de sodio (6 μL de disolución metanol/acetonitrilo 2:3),

luego 6 μL con 3 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en disolución de acetonitrilo y se tomó el espectro RPE a 77 K en cada caso.

7.10 Generalidades degradación de celobiosa y glucosa a escala preparativa. Los estudios se llevaron a cabo con 3 mL de los complejos **(2BB)**-Cu, 10 equivalentes de agente oxidante o atmósfera de O_2 a 273 K (PB) o 243 (CH₃CN) y 10 equivalentes de celobiosa o glucosa disueltos en 1 mL de agua destilada. Las mezclas se agitaron por 2 h antes de caracterizar por HPLC-MS con un espectrómetro Agilent 1200 infinity Q-ToF equipado con una columna Poroshell 120.

7.10.1 Degradación de celobiosa a escala preparativa en CH₃CN. A partir de 3 mL de 0.3 mM [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ en disolución de acetonitrilo, se hicieron dos pruebas: la primera con adición 10 equivalentes de la mezcla $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en disolución de acetonitrilo (16 μL), seguida de la adición de 10 equivalentes de celobiosa disuelta en 1 mL de agua destilada, manteniendo a baño de hielo:acetona (243 K) por 2 h. La segunda prueba, consistió en reducir con 10 equivalentes de L-ascorbato de (+)-sodio disueltos en 1 mL de agua destilada, luego burbujear oxígeno por 50 s en la disolución usando una cánula y finalmente adicionar de 10 equivalentes de celobiosa disuelta en 1 mL de agua destilada, manteniendo a baño de hielo:acetona (243 K) por 2 h.

En ambos casos, se evaporaron los materiales volátiles a presión reducida y los sólidos resultantes se disolvieron en agua y se analizaron por HPLC-MS. La identidad de los componentes mayoritarios fue asignada con base en la comparación de los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, como se muestra en el capítulo 4.

7.10.2 Oxidaciones a escala preparativa de celobiosa con [(2BB)Cu^I] generado in situ y O₂ en PB. Se hicieron reacciones a partir de 3 mL de disolución 0.3 mM de [(2BB)Cu(H₂O)₂](OTf)₂ en PB pH 7.0 y (a) 1.2 equivalentes de (+)-L-ascorbato de sodio disuelto en 1 mL de agua destilada, burbujeo de dióxígeno a presión controlada por 50 s a través de la disolución usando una cánula y adición final de 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 1 mL de agua destilada, manteniendo agitación en baño de hielo (273 K) por 2 h (b) 2.4 equivalentes de (+)-L-ascorbato de sodio disuelto en 1 mL de agua destilada, burbujeo de dióxígeno a presión controlada por 50 s a través de la disolución usando una cánula y adición final de 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 1 mL de agua destilada, manteniendo agitación en baño de hielo (273 K) por 2 h. Los productos resultantes fueron analizados por HPLC-MS, (ver Figuras Anexo 8.23, 8.24 y Tablas Anexo 8.6, 8.7 respectivamente).

7.10.2 Comparación de la degradación de celobiosa y de glucosa con [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ y H₂O₂/Et₃N en PB. Los productos de degradación oxidativa de celobiosa fueron comparados con los obtenidos con glucosa a partir de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ como oxidante; las reacciones se realizaron a escala preparativa con 3 mL de [(2BB)Cu(H₂O)₂](OTf)₂ 0.3 mM en disolución de PB a pH 7.0 para cada caso. La primera prueba se hizo con 10 equivalentes de disolución acuosa $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (16 μL) y adición de 10 equivalentes de celobiosa disuelta en 1 mL de agua destilada en un baño de hielo:acetona (273 K), por 2 h. La segunda prueba se realizó con adición de 10 equivalentes de disolución acuosa de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (16 μL), seguida de la adición de 10 equivalentes de glucosa disuelta en 1 mL de agua destilada en un baño de hielo:acetona

(273 K), por 2 h. Los productos resultantes se analizaron por HPLC-MS, ver Anexos: **Figura 8.25, 8.26 y Tabla 8.8, 8.9**).

7.10.3 Degradación de celobiosa con $[(2BB)Cu]$ in situ y KO_2 en PB. Se hicieron reacciones a partir de 3 mL de disolución 0.3 mM de $[(2BB)Cu(H_2O)_2](OTf)_2$ en PB pH 7.0 y (a) 1.2 equivalentes de (+)-L-ascorbato de sodio disuelto en 1 mL de agua destilada, adición de 1.2 equivalentes de KO_2 disueltos en 1 mL de agua destilada y adición final de 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 1 mL de agua destilada, manteniendo agitación en baño de hielo (273 K) por 2 h (b) 2.4 equivalentes de (+)-L-ascorbato de sodio disuelto en 1 mL de agua destilada, adición de 1.2 equivalentes de KO_2 disueltos en 1 mL de agua destilada y adición final de 10 equivalentes de celobiosa disueltos en 1 mL de agua destilada, manteniendo agitación en baño de hielo (273 K) por 2 h. Los productos resultantes fueron analizados por HPLC-MS, Anexos: **Figuras 8.27-8.28 y Tablas 8.10-8.11**.

7.10.4 Reacciones de control. Además de la inyección directa de celobiosa (30 mg en agua destilada) **Anexo Figura 8.29** y de la mezcla oxidante H_2O_2/Et_3N (10 equivalentes con respecto a celobiosa, 16 μ L en agua destilada) **Anexo Figura 8.30**, se realizaron 4 reacciones de control adicionales para el análisis de degradación de 10 equivalentes de celobiosa (30mg) disuelta en 0,5 mL de agua destilada: (a) con una cantidad equimolar de la mezcla H_2O_2/Et_3N (16 μ L de disolución en agua destilada), manteniendo reacción en un baño de enfriamiento con hielo (273 K) durante 2 horas, **Anexo Figura 8.31**; (b) con 1 equivalente de $CuSO_4$ disuelto en 1 mL de agua destilada en un baño de enfriamiento con hielo (273 K) durante 2 horas, **Anexo Figura 8.32**; (c) con 1 equivalente de $CuSO_4$ disuelto en 1 mL de agua destilada y 10 equivalentes de la mezcla H_2O_2/Et_3N (16 μ L de disolución en agua destilada), manteniendo reacción en un baño de enfriamiento con hielo (273 K) durante 2 horas, **Anexo Figura 8.33** y (d) con 1 equivalente de $[(2BB)Cu(H_2O)_2](OTf)_2$ disuelto en 1 mL de CH_3CN /agua destilada (1:3) manteniendo reacción en un baño de enfriamiento con hielo (273 K) durante 2 horas, **Anexo Figura 8.34**.

Capítulo VIII. Anexos

Espectros de caracterización adicional [(2BB)Cu]OTf

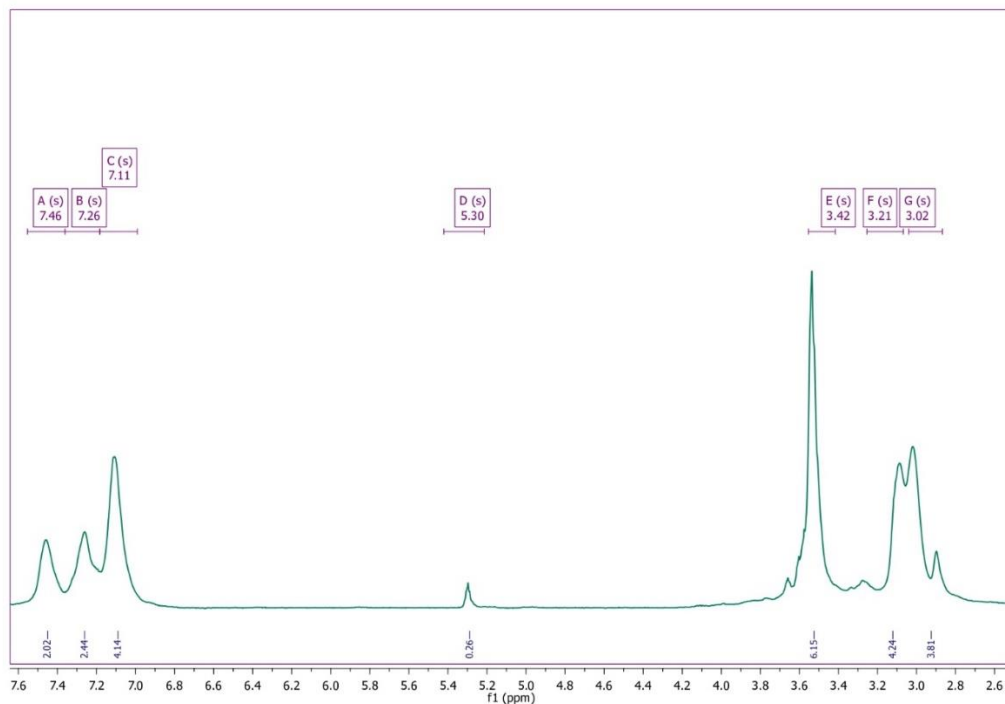


Figura 8.1. Espectro RMN ¹H en CD₃CN de [(2BB)Cu]OTf.

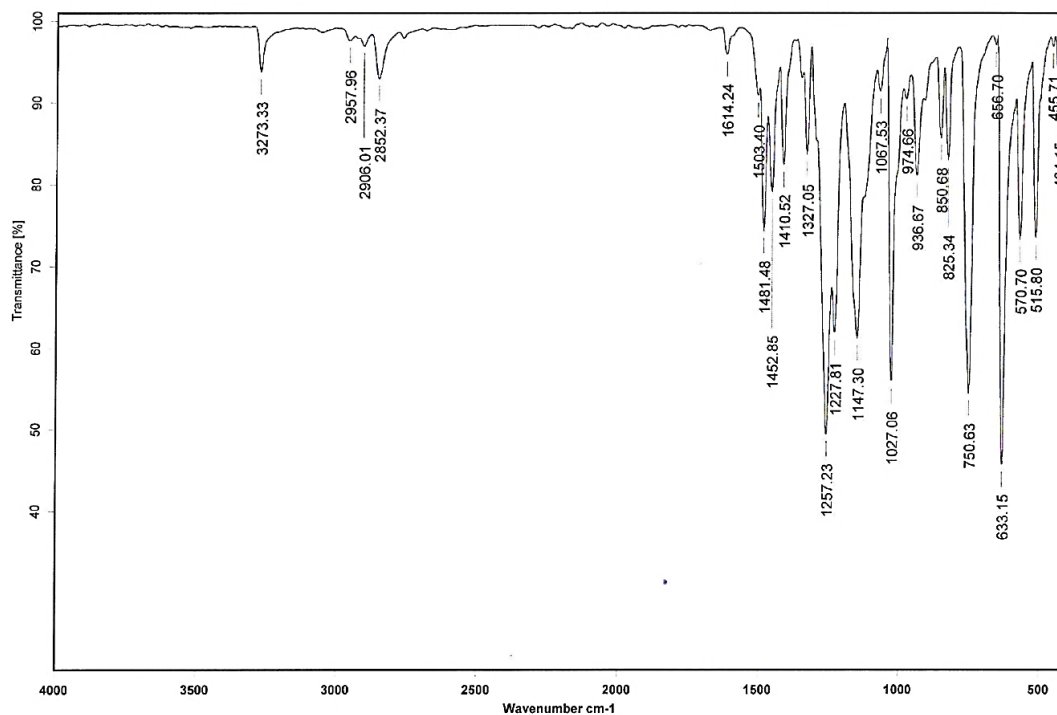


Figura 8.2. Espectro IR de [(2BB)Cu]OTf en pastilla de KBr.

Datos DRX de caracterización del complejo [(2BB)Cu]OTf

Tabla 8.1. Resumen de los datos cristalográficos para [(2BB)Cu]OTf.

Código de identificación	[(2BB)Cu]OTf	
Fórmula empírica	C ₂₁ H ₂₃ Cu F ₃ N ₅ O ₃ S	
Peso fórmula	546.04	
Temperatura	130(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	<i>P</i> 21/ <i>n</i>	
Dimensiones de celda unitaria	<i>a</i> = 14.4404(6) Å	$\alpha = 90^\circ$
	<i>b</i> = 8.0852(3) Å	$\beta = 95.581(4)^\circ$
	<i>c</i> = 18.8842(8) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	2194.35(15) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculated)	1.653 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	1.152 mm ⁻¹	
F(000)	1120	
Tamaño de cristal	0.500 x 0.250 x 0.120 mm ³	
Rango theta para colección de datos	3.530 to 29.515°	
Índice de rangos	-17<= <i>h</i> <=19, -9<= <i>k</i> <=11, -23<= <i>l</i> <=24	
Reflexiones colectadas	12733	
Reflexiones independientes	5245 [R(int) = 0.0272]	
Compleitud a theta = 25.242°	99.7 %	
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	5245 / 1 / 312	
Bondad de ajuste en F ²	1.030	
Índices finales R [<i>I</i> >2sigma(<i>I</i>)]	R1 = 0.0398, wR2 = 0.0911	
R índices (todos los datos)	R1 = 0.0526, wR2 = 0.0998	
Coefficiente de extinción	n/a	
Mayor diferencia pico y agujero	0.591 and -0.606 e Å ⁻³	

Tabla 8.2. Longitudes de enlace [Å] para [(2BB)Cu]OTf.

C(1)-N(1)	1.329(3)	C(14)-C(20)	1.384(3)
C(1)-N(2)	1.359(3)	C(14)-N(4)	1.392(3)
C(1)-C(9)	1.497(3)	C(14)-C(15)	1.396(3)
C(2)-N(2)	1.384(3)	C(15)-N(5)	1.386(3)
C(2)-C(7)	1.392(3)	C(15)-C(17)	1.389(3)
C(2)-C(3)	1.396(3)	C(16)-N(5)	1.454(3)
C(3)-C(4)	1.391(3)	C(17)-C(18)	1.382(3)
C(3)-N(1)	1.395(3)	C(18)-C(19)	1.400(4)
C(4)-C(5)	1.389(3)	C(19)-C(20)	1.379(3)
C(5)-C(6)	1.397(3)	C(21)-F(3)	1.327(5)
C(6)-C(7)	1.390(3)	C(21)-F(2)	1.329(5)
C(8)-N(2)	1.464(3)	C(21)-F(1)	1.333(4)
C(9)-C(10)	1.516(3)	C(21)-S(1)	1.798(3)
C(10)-N(3)	1.473(3)	Cu(1)-N(4)	1.9018(19)
C(11)-N(3)	1.463(3)	Cu(1)-N(1)	1.9086(19)
C(11)-C(12)	1.524(3)	Cu(1)-N(3)	2.1739(19)
C(12)-C(13)	1.491(3)	O(1)-S(1)	1.434(2)
C(13)-N(4)	1.334(3)	O(2)-S(1)	1.432(2)
C(13)-N(5)	1.362(3)	O(3)-S(1)	1.431(2)

Tabla 8.3. Ángulos de enlace [°] para [(2BB)Cu]OTf.

N(1)-C(1)-N(2)	111.7(2)	F(3)-C(21)-F(2)	108.6(3)
N(1)-C(1)-C(9)	126.9(2)	F(3)-C(21)-F(1)	108.3(3)
N(2)-C(1)-C(9)	121.4(2)	F(2)-C(21)-F(1)	107.3(3)
N(2)-C(2)-C(7)	132.1(2)	F(3)-C(21)-S(1)	111.3(3)
N(2)-C(2)-C(3)	105.52(19)	F(2)-C(21)-S(1)	110.1(3)
C(7)-C(2)-C(3)	122.4(2)	F(1)-C(21)-S(1)	111.1(2)
C(4)-C(3)-N(1)	130.1(2)	N(4)-Cu(1)-N(1)	164.54(8)
C(4)-C(3)-C(2)	120.8(2)	N(4)-Cu(1)-N(3)	98.01(8)
N(1)-C(3)-C(2)	109.13(19)	N(1)-Cu(1)-N(3)	96.82(8)
C(5)-C(4)-C(3)	117.4(2)	C(1)-N(1)-C(3)	105.84(18)
C(4)-C(5)-C(6)	121.3(2)	C(1)-N(1)-Cu(1)	124.84(16)
C(7)-C(6)-C(5)	121.8(2)	C(3)-N(1)-Cu(1)	128.94(15)
C(6)-C(7)-C(2)	116.3(2)	C(1)-N(2)-C(2)	107.83(18)
C(1)-C(9)-C(10)	116.1(2)	C(1)-N(2)-C(8)	126.6(2)
N(3)-C(10)-C(9)	112.78(18)	C(2)-N(2)-C(8)	125.6(2)
N(3)-C(11)-C(12)	112.27(18)	C(11)-N(3)-C(10)	110.20(17)
C(13)-C(12)-C(11)	115.22(19)	C(11)-N(3)-Cu(1)	110.13(14)
N(4)-C(13)-N(5)	111.3(2)	C(10)-N(3)-Cu(1)	109.36(14)
N(4)-C(13)-C(12)	126.0(2)	C(13)-N(4)-C(14)	106.28(19)
N(5)-C(13)-C(12)	122.6(2)	C(13)-N(4)-Cu(1)	123.71(15)
C(20)-C(14)-N(4)	130.9(2)	C(14)-N(4)-Cu(1)	129.12(16)
C(20)-C(14)-C(15)	120.2(2)	C(13)-N(5)-C(15)	107.63(19)
N(4)-C(14)-C(15)	108.9(2)	C(13)-N(5)-C(16)	128.2(2)
N(5)-C(15)-C(17)	131.8(2)	C(15)-N(5)-C(16)	124.13(19)
N(5)-C(15)-C(14)	105.9(2)	O(3)-S(1)-O(2)	113.76(14)
C(17)-C(15)-C(14)	122.3(2)	O(3)-S(1)-O(1)	115.75(13)
C(18)-C(17)-C(15)	116.8(2)	O(2)-S(1)-O(1)	114.92(12)
C(17)-C(18)-C(19)	121.4(2)	O(3)-S(1)-C(21)	103.19(17)
C(20)-C(19)-C(18)	121.1(2)	O(2)-S(1)-C(21)	103.89(18)
C(19)-C(20)-C(14)	118.2(2)	O(1)-S(1)-C(21)	103.10(15)

Espectros RPE de caracterización de especies Cu(I) + O₂

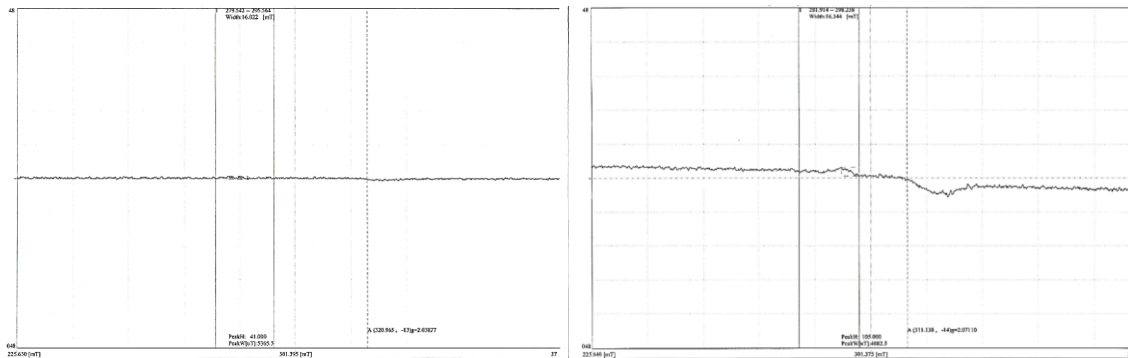


Figura 8.3. Espectros RPE de [(2BB)Cu]OTf en THF a 133 K (izquierda) y en CH₃CN a 77 K (derecha).

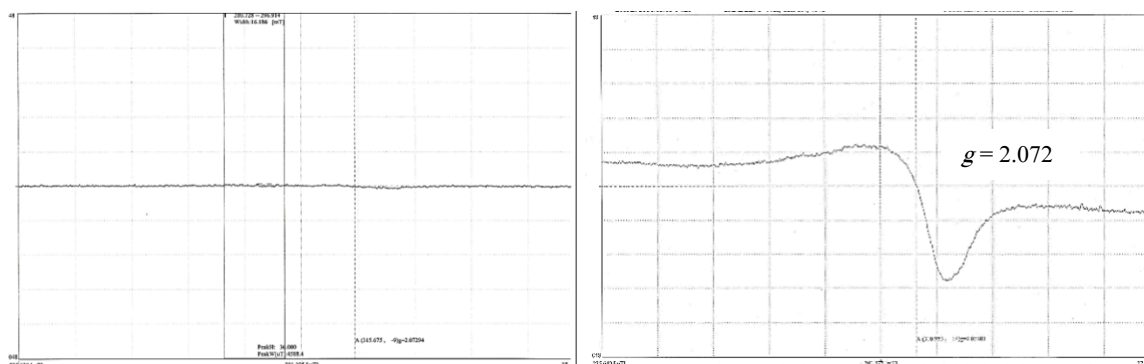


Figura 8.4. Espectros RPE de [(2BB)Cu]OTf en THF a 133 K (izquierda) y en CH₃CN a 77 K (derecha) después de burbujeo de oxígeno (a 195 K para la disolución en THF o 243 K para la disolución en CH₃CN).

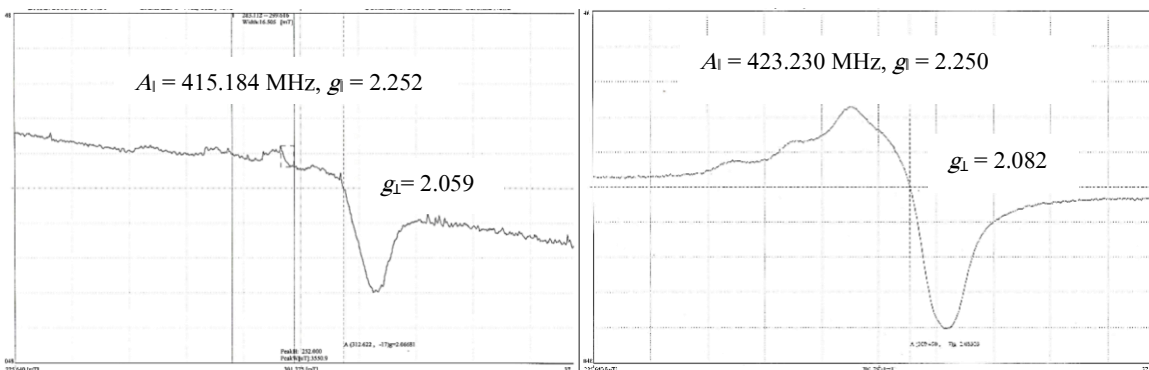


Figura 8.5. Espectros RPE de [(2BB)Cu]OTf a 77 K en THF (izquierda) y en CH₃CN (derecha) después de 24 horas a 255 K.

Espectros RPE experimentos de $[(2BB)Cu]^+$ generado *in situ* en PB pH 7.0/glicerol, o en $CH_3CN + O_2$

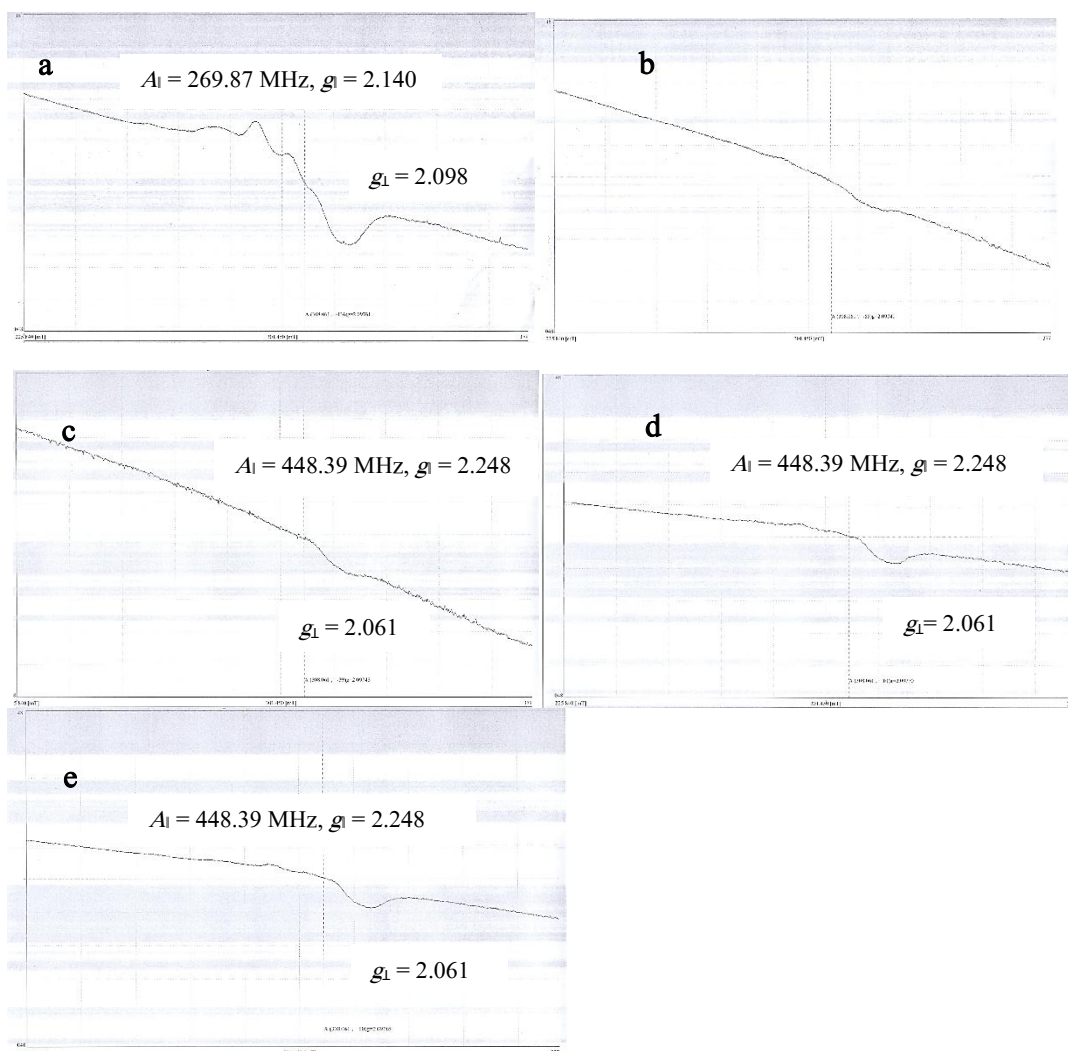


Figura 8.6. Espectros RPE de $[(2BB)Cu(H_2O)_2](OTf)_2$ (3 mM en PB/glicerol a 77 K) (a), después de la reducción con 1.2 equivs de ascorbato de sodio (b), luego de burbujeo de O_2 (a 273 K) (c), posterior a 2 h de la adición de 10 equivalentes de celobiosa (d) y pasadas 4h (e).

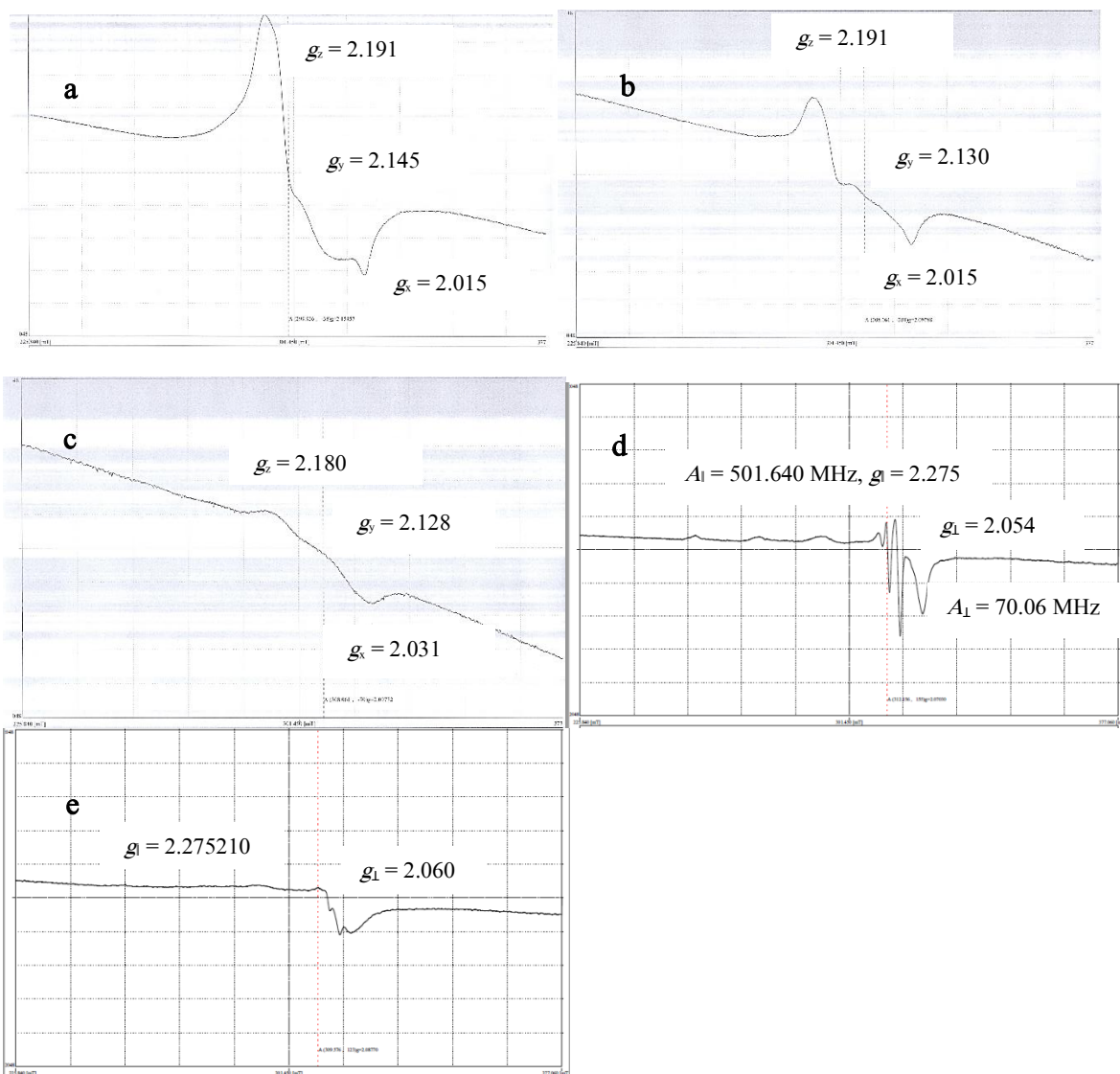


Figura 8.7. Espectros RPE de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM en CH_3CN a 77 K) (a), después de reducción con 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio (b), luego de burbujeo de O_2 (a 243 K) (c), posterior a la adición de 10 equivalentes de cellobiosa (ver simulación de RPE Figura 8.8) (d) y después dev 4 h (e).

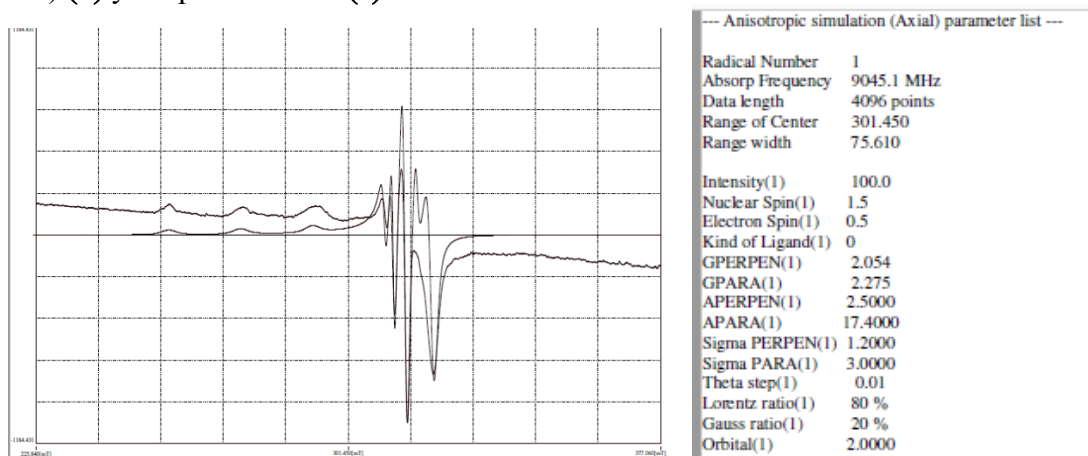


Figura 8.8. Simulación espectro de RPE $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM en CH_3CN a 77 K), reducido, luego del burbujeo de O_2 y posterior a 2 h de la adición de 10 equivalentes de celobiosa (**Figura 8.7**).

Espectros RPE experimentos de $[(2\text{BB})\text{Cu}]^+$ generado *in situ* en PB/glicerol + O_2 + celobiosa

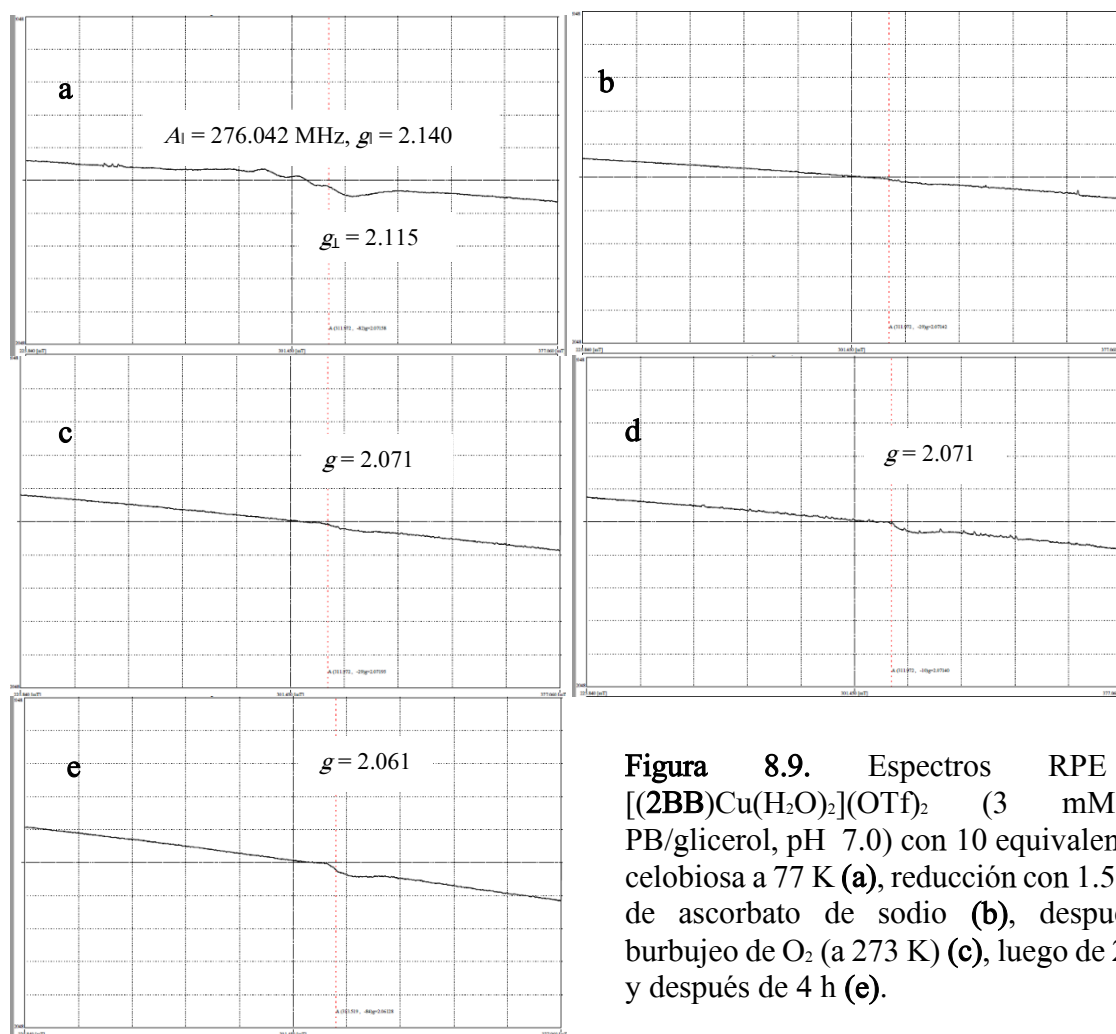


Figura 8.9. Espectros RPE de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM in PB/glicerol, pH 7.0) con 10 equivalentes de celobiosa a 77 K (**a**), reducción con 1.5 equiv de ascorbato de sodio (**b**), después de burbujeo de O_2 (a 273 K) (**c**), luego de 2 h (**d**) y después de 4 h (**e**).

Espectros de reactividad con KO_2 y celobiosa

Figura 8.10. Espectros UV-vis de reactividad de [(2BB)Cu]OTf (0.3 mM en CH₃CN, 243 K, línea verde), después de la adición de 1 equivalente de KO₂ (línea naranja) y luego de la adición de 10 equivalentes de celobiosa (línea cian).

Figura 8.11. Espectros UV-vis de reactividad de [(2BB)Cu]⁺ generado *in situ* (0.3 mM en PB pH 7.0, 273 K) con 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio, seguido de la adición de 1.2 equivalentes de KO₂ y adición final de 10 equivalentes de celobiosa.

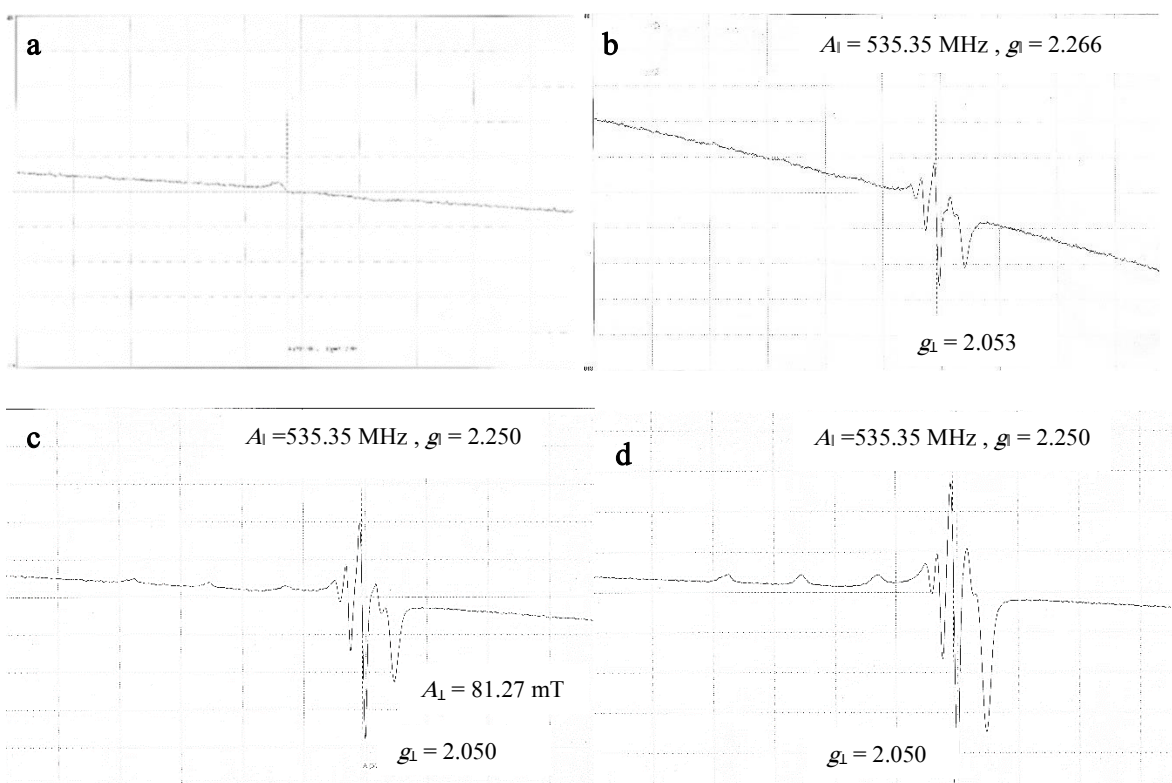


Figura 8.12. Espectros RPE de $[(2BB)Cu]OTf$ (3 mM en CH_3CN a 77 K) (a), después de la adición de 1.2 equivalentes de KO_2 (a 243 K) (b), luego la adición de 10 equivalentes de celobiosa (a 243 K; ver la simulación en la **Figura 8.11**) (c) y después de 1 h de reacción a 243 K (d).

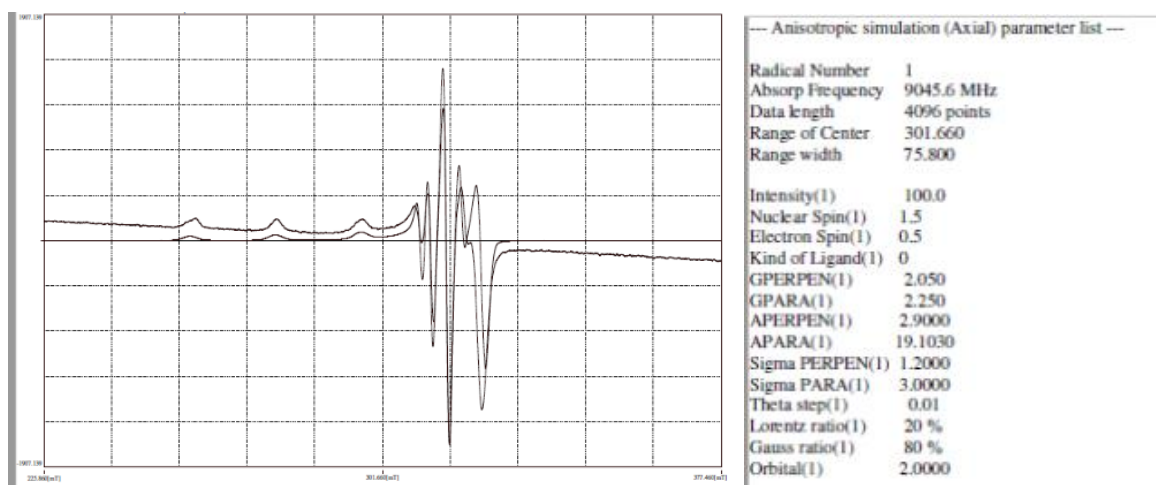


Figura 8.13. Espectro RPE simulado de $[(2BB)Cu]OTf$ (3 mM en CH_3CN a 77 K), después de 2 h de adición de 10 equivalentes de celobiosa (**Figura 8.10c**).

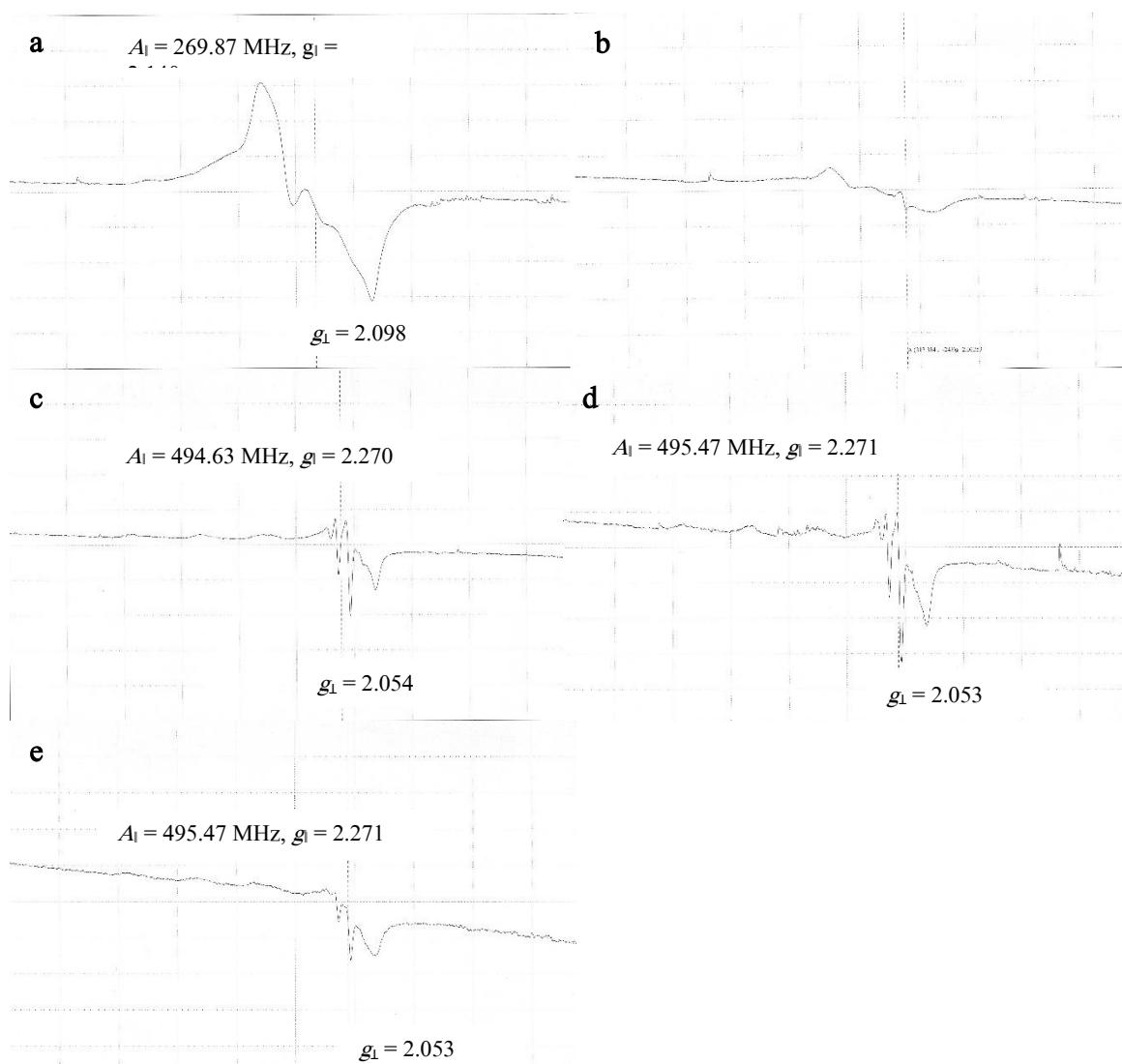


Figura 8.14. Espectros RPE de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (3 mM en PB/glicerol, pH 7.0) a 77 K (**a**), reducción con 1.2 equivalentes de ascorbato de sodio (**b**), después de la adición de 1.2 equivalentes de KO_2 (a 273 K) (**c**), con 10 equivalentes de celobiosa (**d**) y luego de 1 h de reacción (**e**).

Figura 8.15. Espectros UV-vis de reactividad de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM en CH_3CN , 243 K) con 1.2 equivalentes de KO_2 seguidos por la adición de 10 equivalentes de celobiosa.

Figura 8.16. Espectros UV-vis de reactividad de $[(\mathbf{2BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM en PB pH 7.0, 273 K), después de la adición de 1.2 equivalentes de KO_2 y finalmente seguidos por la adición de 10 equivalentes de celobiosa.

Espectros de reactividad de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ con H_2O_2 y celobiosa

Figura 8.17. Espectros UV-vis de reactividad de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM, CH_3CN), después de la adición de 1-5 equivalentes de H_2O_2 a 273 K y luego de la adición de 10 equivalentes de celobiosa.

Figura 8.18. Espectros UV-vis de reactividad de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM, PB), luego de la adición de 1-5 equivalentes de H_2O_2 a 273 K y después de la adición de 10 equivalentes de celobiosa.

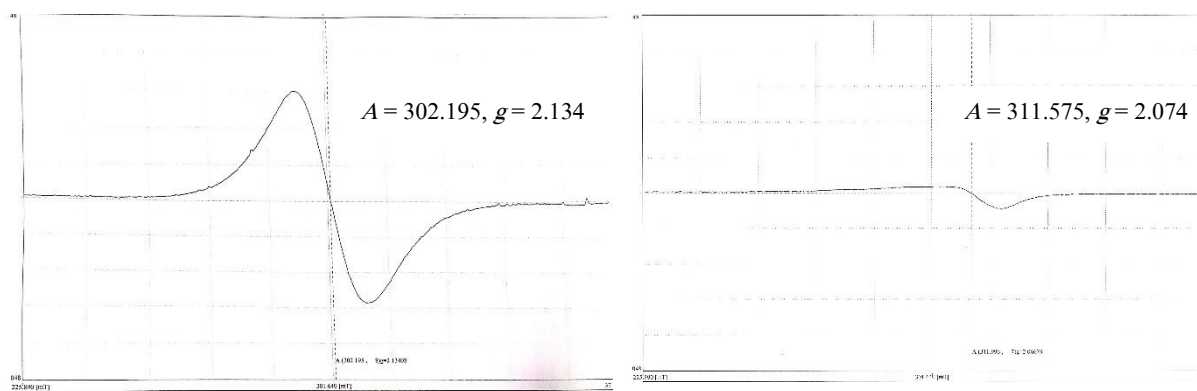


Figura 8.19. Espectros RPE de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en CH_3CN a 77 K antes (izquierda) y después de la adición de 5 equivalentes de una disolución en acetonitrilo 1:1 de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (derecha).

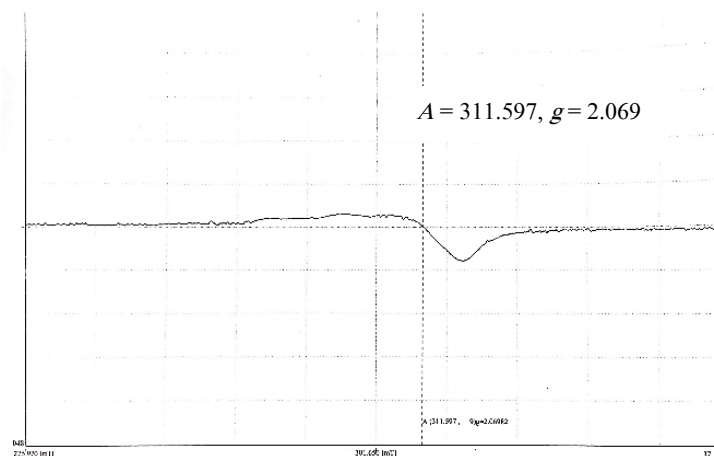


Figura 8.20. Espectro RPE de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en CH_3CN a 77 K, después de la adición de 5 equivalentes de una disolución 1:1 en acetonitrilo, de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, 24 h a 255 K.

Oxidaciones a escala preparativa de celobiosa con [(2BB)Cu]OTf y [(2BB)Cu(H₂O)₂](OTf)₂ en CH₃CN

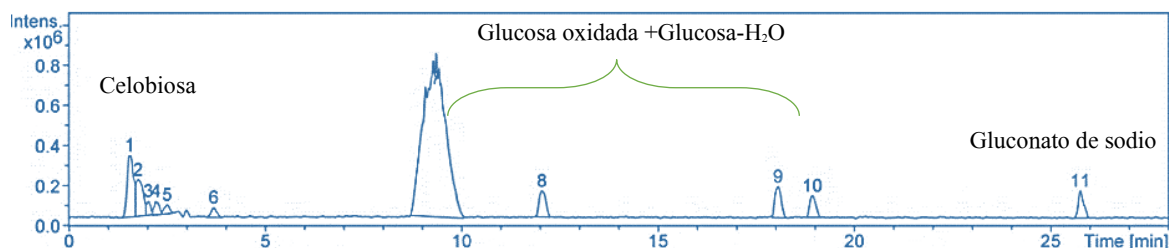


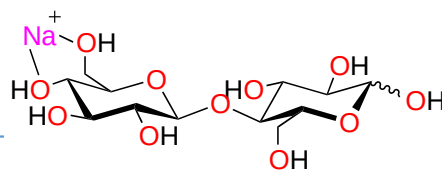
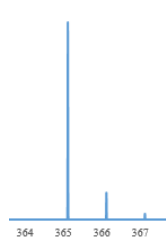
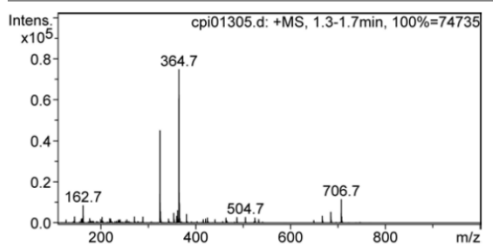
Figura 8.21. Cromatograma de productos de en disolución de acetonitrilo con 0.3 mM de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂, 10 equivalentes de H₂O₂/Et₃N y 10 equivalentes de celobiosa.

Tabla 8.4. Áreas relativas de compuestos separados en el cromatograma.

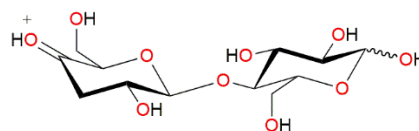
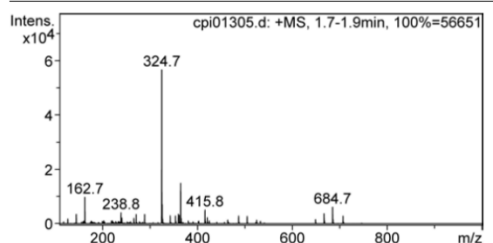
#	Tiempo de retención (min)	%Área Fracción
1	1.6	7.7
2	1.8	5.1
7	9.3	69.9
8	12.0	3.3
9	18.1	3.9
10	18.9	2.5
11	25.7	3.0

La identidad de los componentes mayoritarios fue asignada con base en la comparación de los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, como se muestra a continuación:

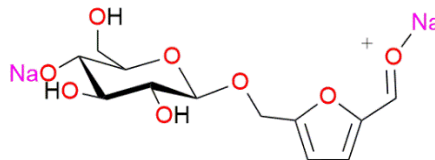
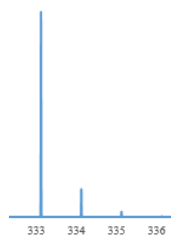
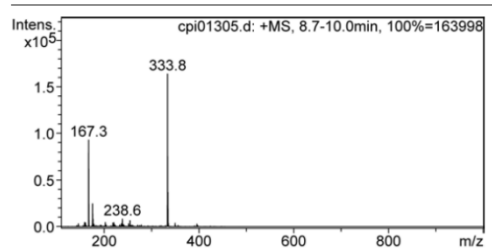
Cmpd 1, 1.6 min



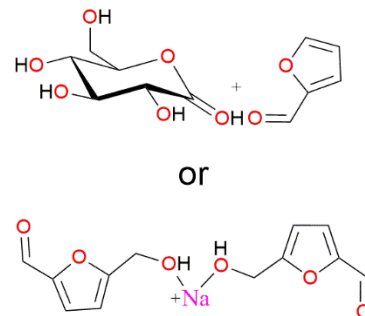
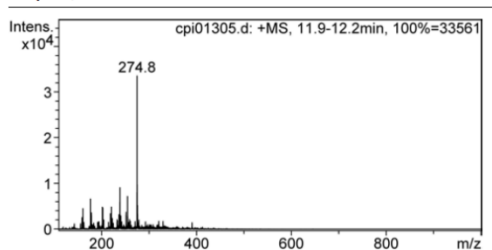
Cmpd 2, 1.8 min



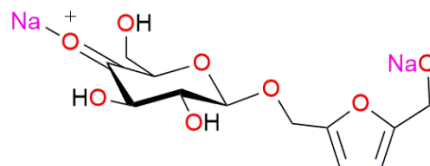
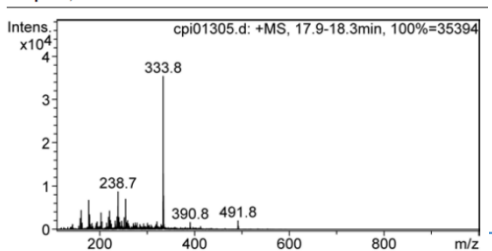
Cmpd 7, 9.3 min



Cmpd 8, 12.0 min



Cmpd 9, 18.1 min



Cmpd 11, 25.7 min

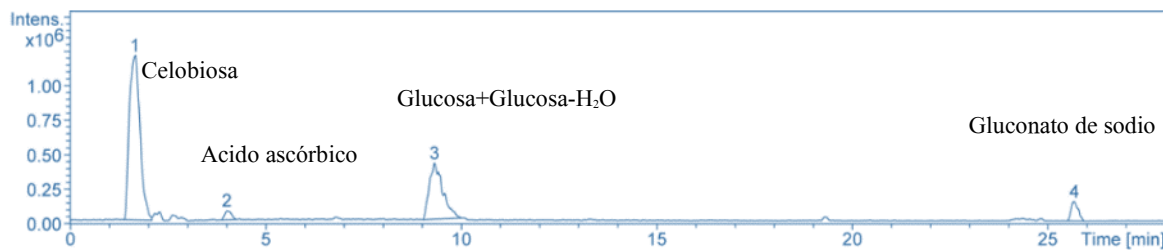
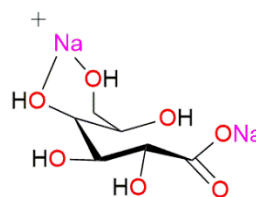
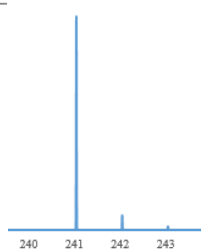
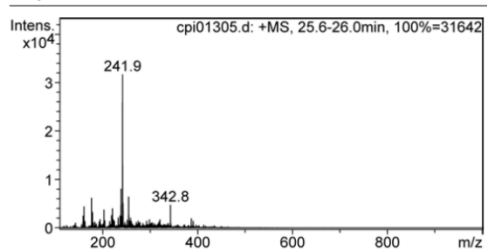


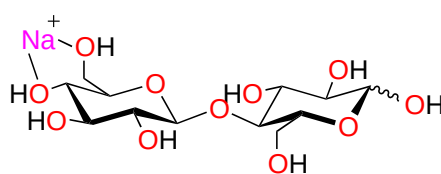
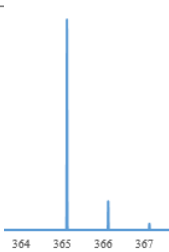
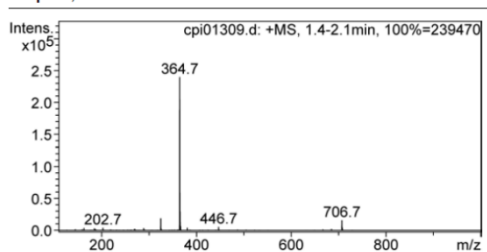
Figura 8.22. Cromatograma de la reacción de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ 0.3 mM en acetonitrilo con 10 equivalentes de L-ascorbato de sodio, burbujeo de O_2 y 10 equivalentes de celobiosa.

Tabla 8.5. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma (el compuesto 1 corresponde a celobiosa).

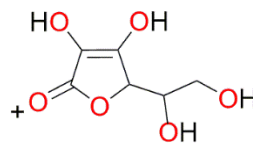
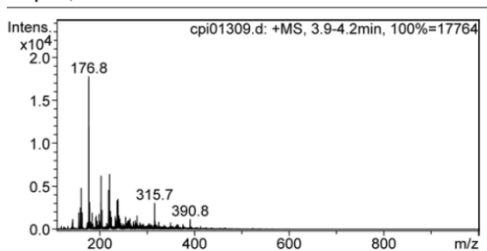
#	Tiempo de retención (min)	Área Fracción%
1	1.7	64.9
2	4.0	2.2
3	9.3	27.9
4	25.7	5.0

La identidad de cada fracción fue asignada como se muestra a continuación:

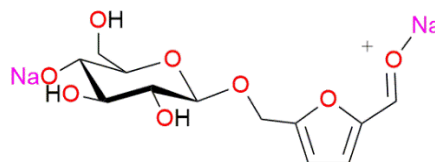
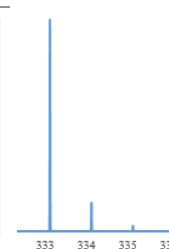
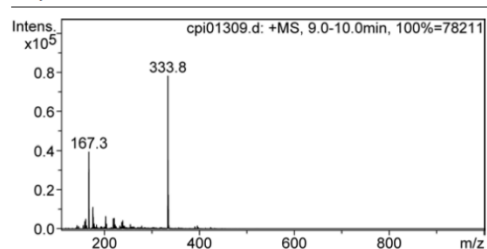
Cmpd 1, 1.7 min



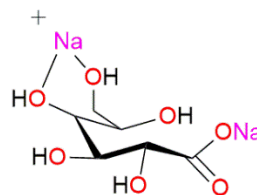
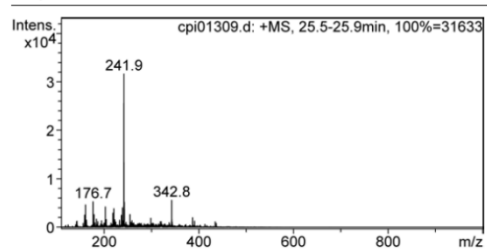
Cmpd 2, 4.0 min



Cmpd 3, 9.3 min



Cmpd 4, 25.7 min



Oxidaciones a escala preparativa de celobiosa con $[(2BB)Cu]^+$ generado *in situ* y O_2 en PB

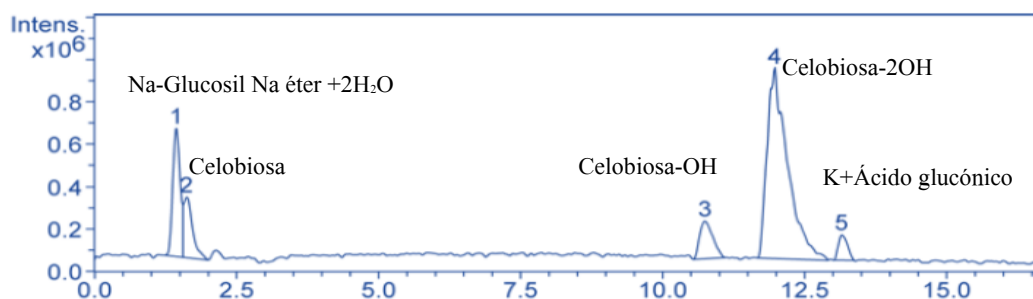


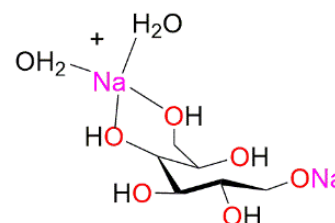
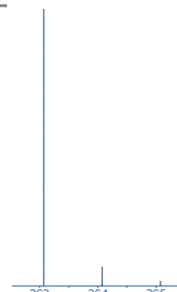
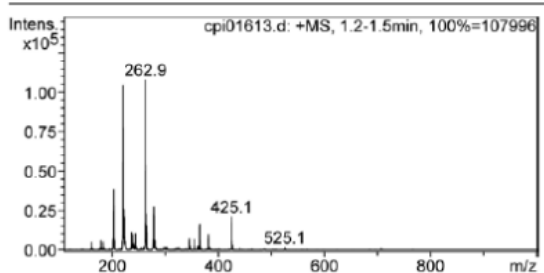
Figura 8.23. Cromatograma de la reacción de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ 0.3 mM en PB con 1.2 equivalentes de L-ascorbato de sodio, burbujeo de O₂ y 10 equivalentes de celobiosa.

Tabla 8.6. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma (el compuesto 2 corresponde a celobiosa).

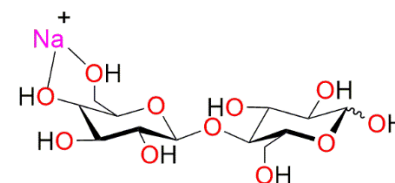
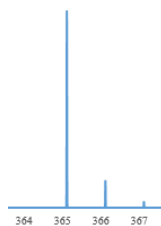
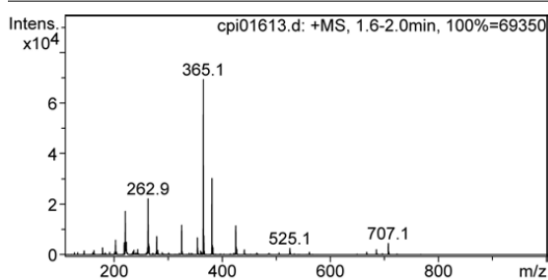
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	1.4	5497187	15.6
2	1.6	3217358	9.1
3	10.7	2840982	8.0
4	12.0	22415434	63.5
5	13.1	1338091	3.8

La identidad de los componentes mayoritarios fue asignada con base en la comparación de los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, como se muestra a continuación:

Cmpd 1, 1.4 min



Cmpd 2, 1.6 min



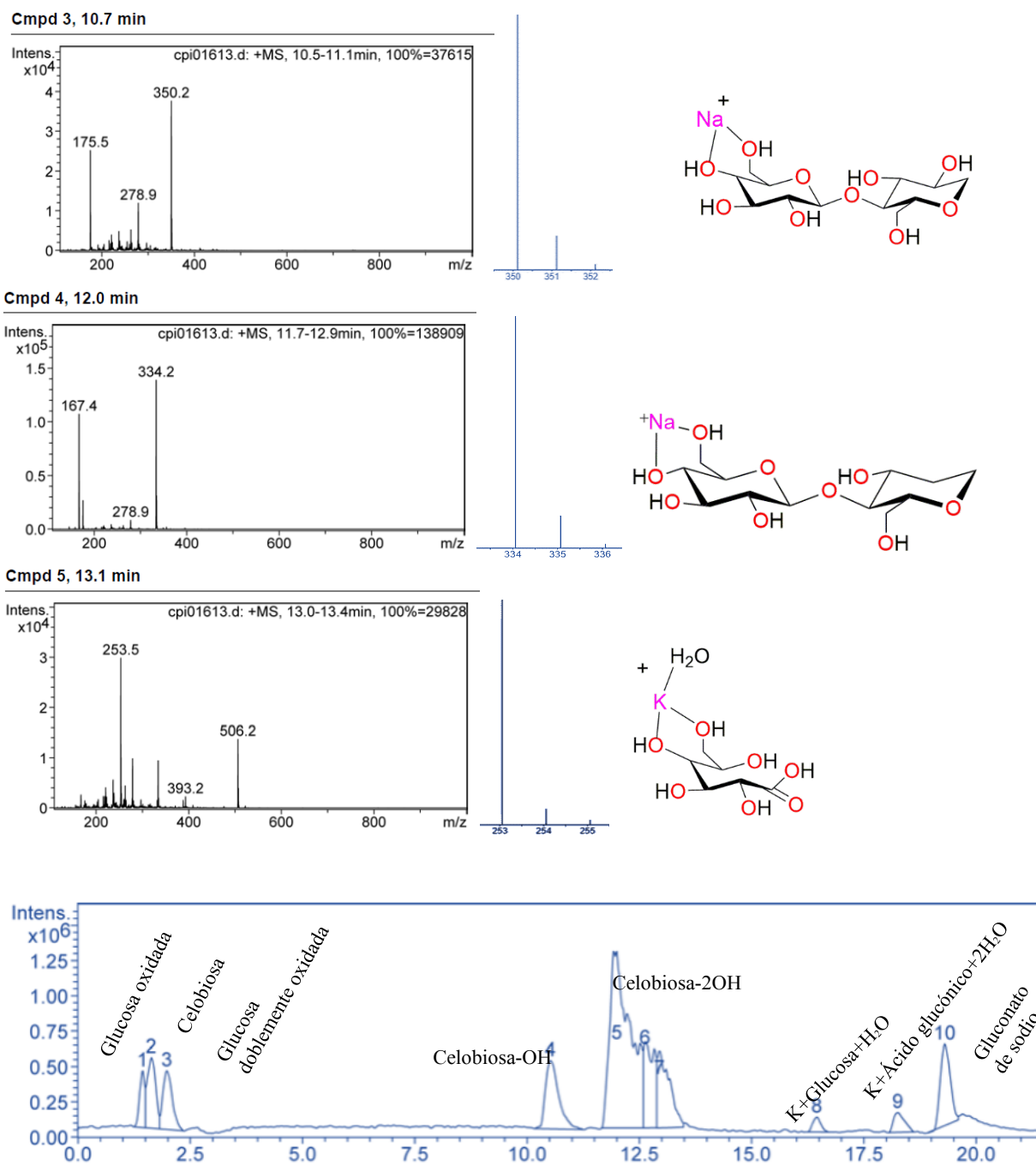


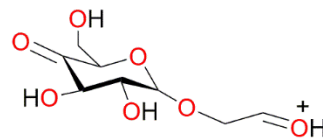
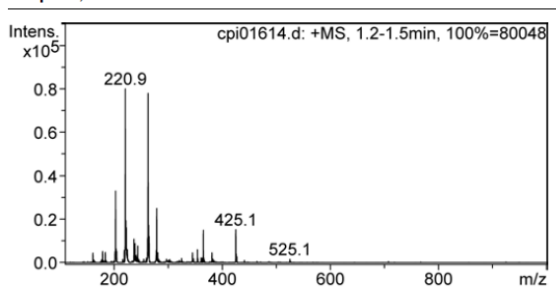
Figura 8.24. Cromatograma de la reacción de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ 0.3 mM en PB con 2.4 equivalentes de L-ascorbato de sodio, burbujeo de O_2 y 10 equivalentes de celobiosia.

Tabla 8.7. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma (el compuesto 2 corresponde a celobiosa).

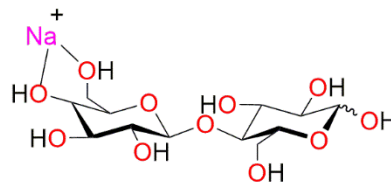
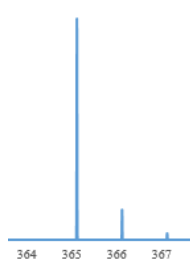
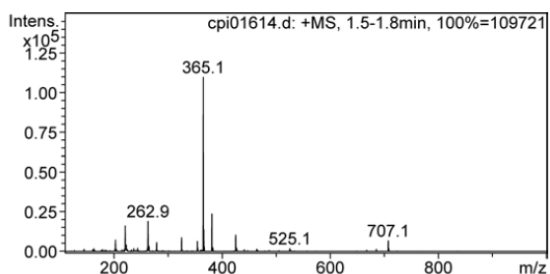
#	RT [min]	Area
1	1.4	3186288
2	1.6	6583126
3	2.0	6140861
4	10.5	9940663
5	12.0	39955026
6	12.6	9679944
7	12.9	10350344
8	16.5	1333275
9	18.3	2413679
10	19.3	8857078

La identidad de los componentes mayoritarios fue asignada con base en la comparación de los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, como se muestra a continuación:

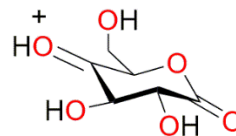
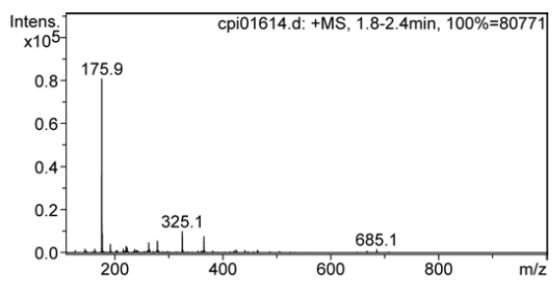
Cmpd 1, 1.4 min



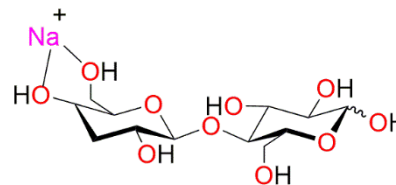
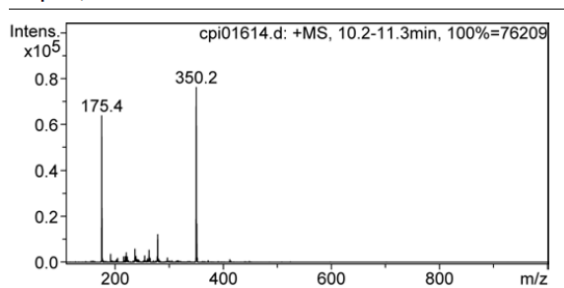
Cmpd 2, 1.6 min



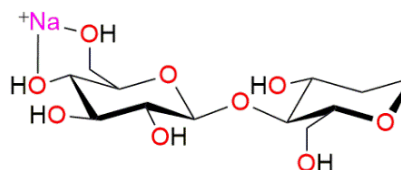
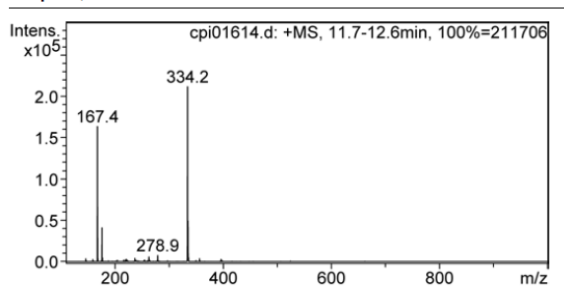
Cmpd 3, 2.0 min



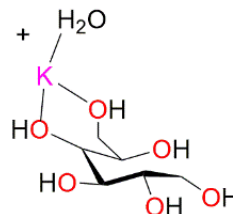
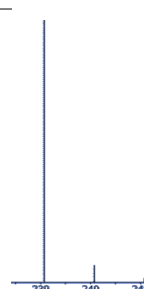
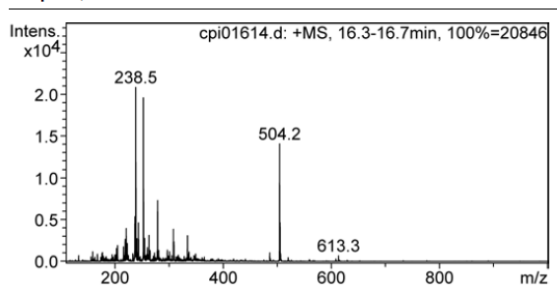
Cmpd 4, 10.5 min



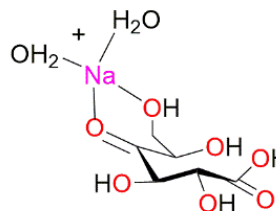
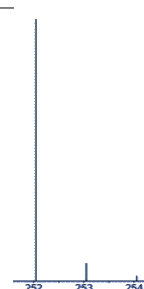
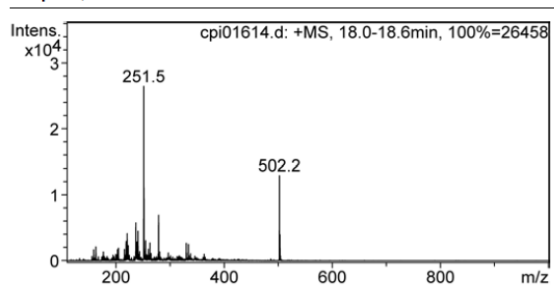
Cmpd 5, 12.0 min



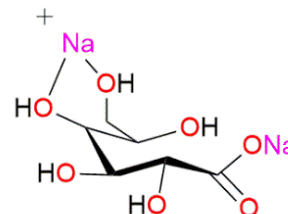
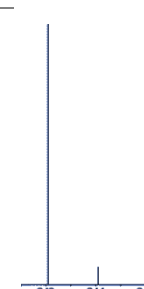
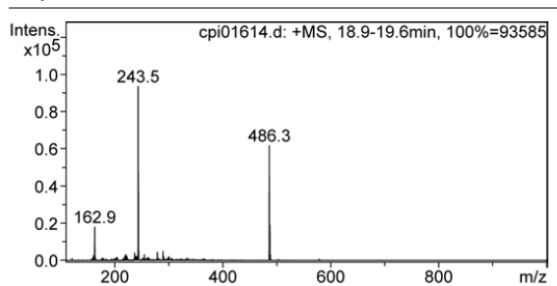
Cmpd 8, 16.5 min



Cmpd 9, 18.3 min



Cmpd 10, 19.3 min



Comparación de la degradación de celobiosa y de glucosa con [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ y H₂O₂/Et₃N en PB

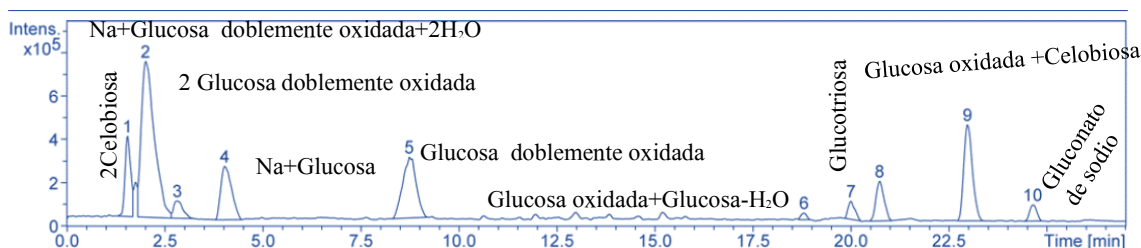


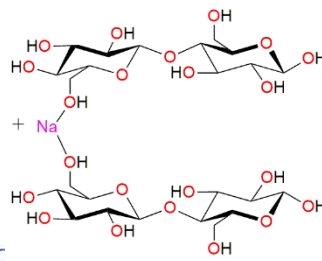
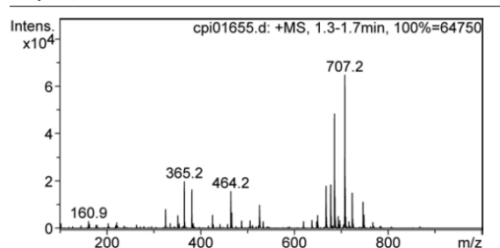
Figura 8.25. Cromatograma de la reacción en disolución 0.3 mM de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ en PB con 10 equivalentes. de H₂O₂/Et₃N y 10 equivalentes de celobiosa.

Tabla 8.8. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma.

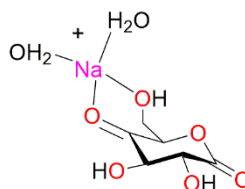
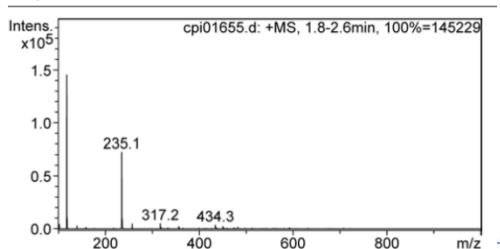
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	1.5	3651617	8.1
2	2.0	16740112	37.2
3	2.8	1342188	3.0
4	4.0	4770872	10.6
5	8.7	6774658	15.0
6	18.8	311073	0.7
7	20.0	1003111	2.2
8	20.7	2655224	5.9
9	23.0	6837851	15.2
10	24.6	950975	2.1

La identidad de los componentes mayoritarios fue asignada con base en la comparación de los patrones isotópicos experimentales vs. calculados, como se muestra a continuación:

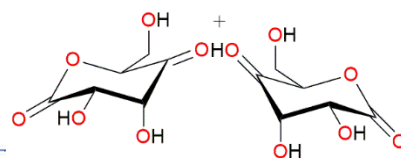
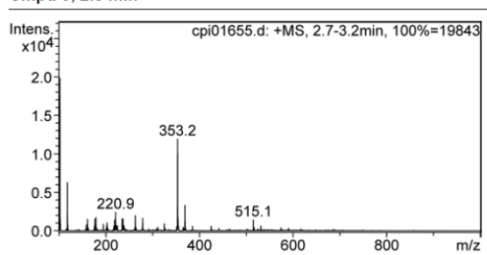
Cmpd 1, 1.5 min



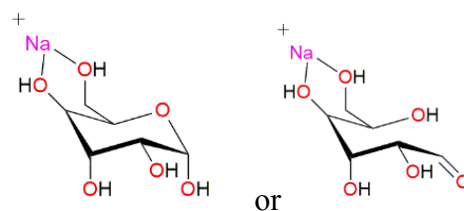
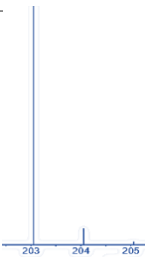
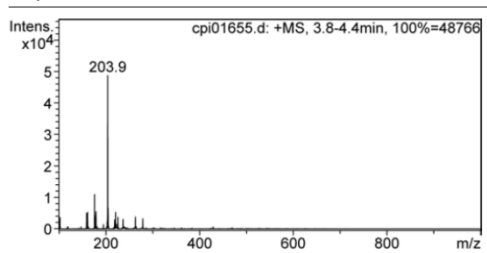
Cmpd 2, 2.0 min



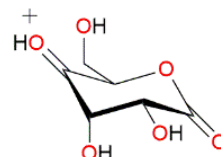
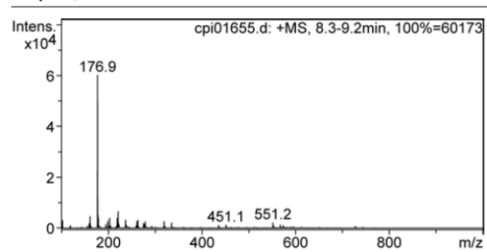
Cmpd 3, 2.8 min



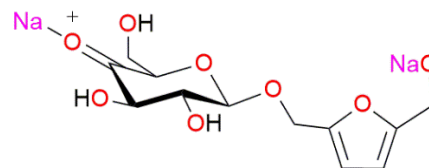
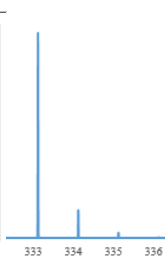
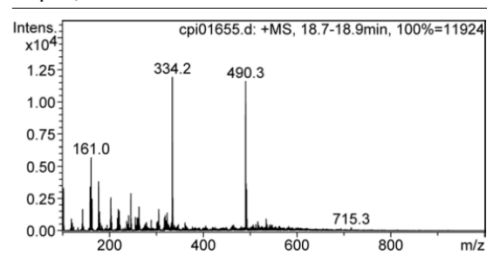
Cmpd 4, 4.0 min



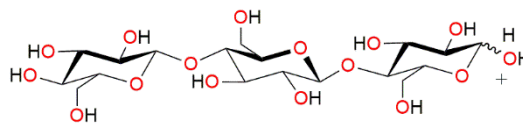
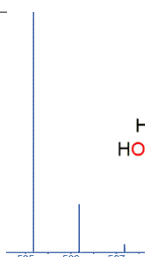
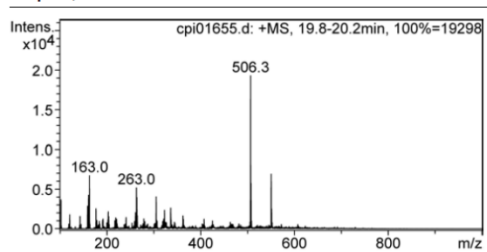
Cmpd 5, 8.7 min



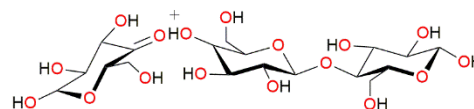
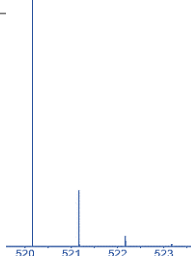
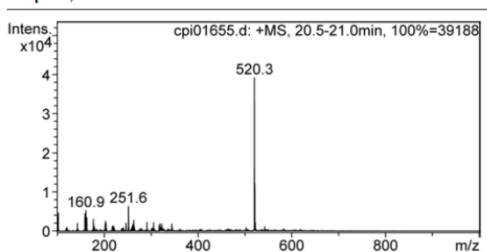
Cmpd 6, 18.8 min



Cmpd 7, 20.0 min



Cmpd 8, 20.7 min



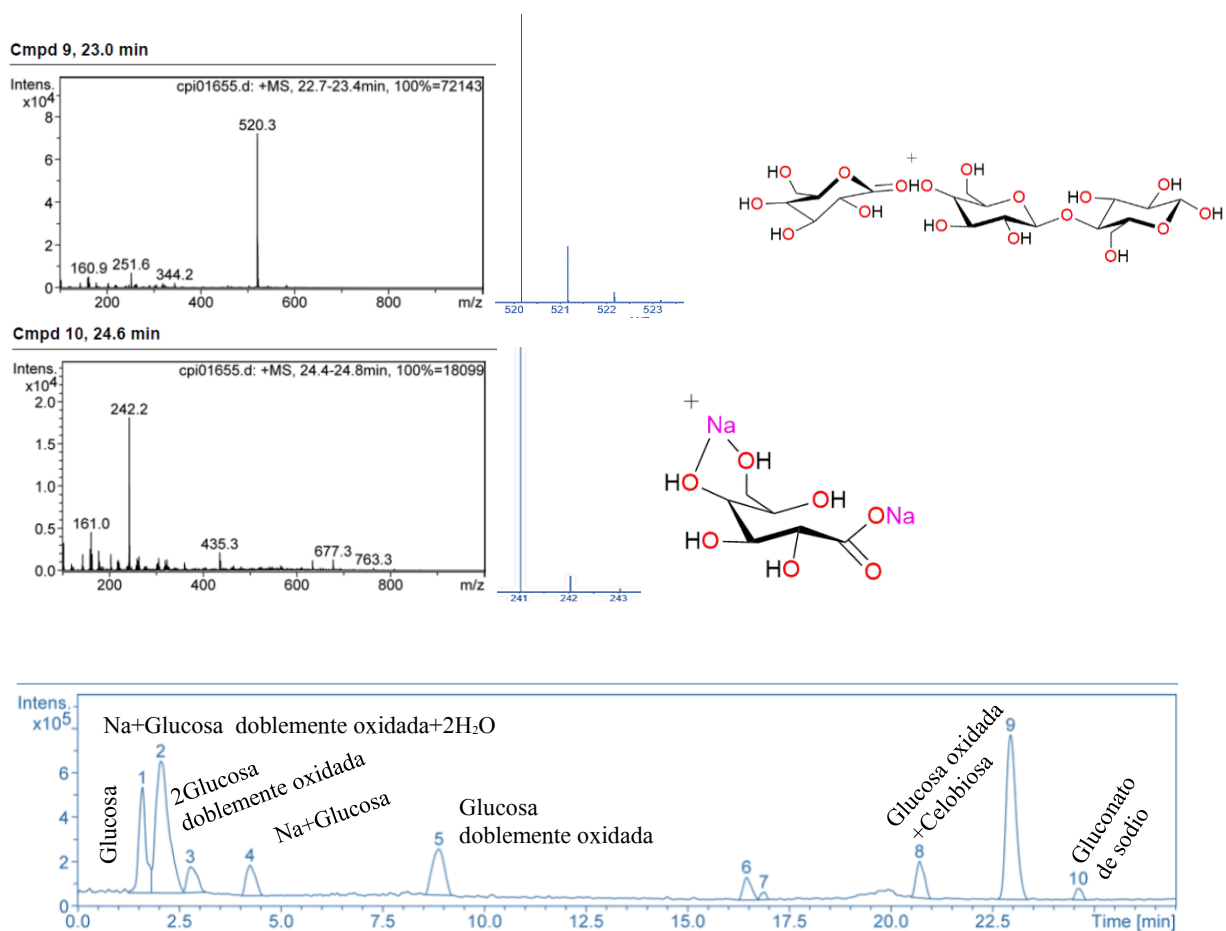
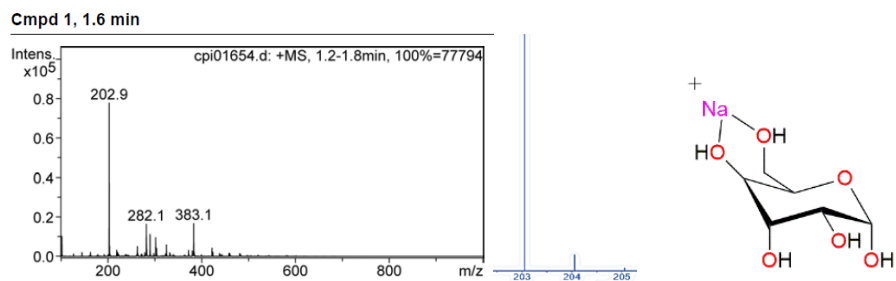


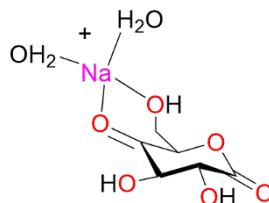
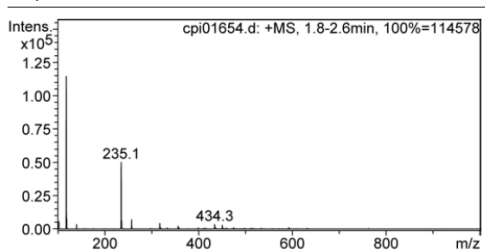
Figura 8.26. Cromatograma de disolución 0.3 mM de $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ en PB, 10 equivalentes de H_2O_2/Et_3N y 10 equivalentes de glucosa.

Tabla 8.9. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma.

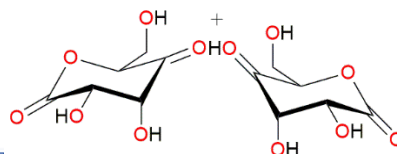
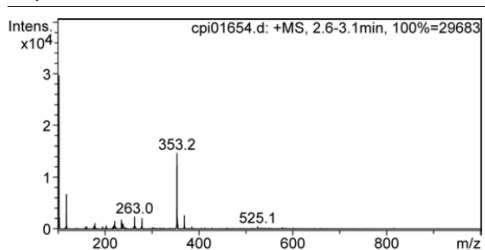
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	1.6	5867740	13.1
2	2.0	13242096	29.5
3	2.8	2030015	4.5
4	4.2	2215344	4.9
5	8.9	4353964	9.7
6	16.4	1455380	3.2
7	16.9	327292	0.7
8	20.7	2350518	5.2
9	22.9	12499623	27.8
10	24.6	601557	1.3



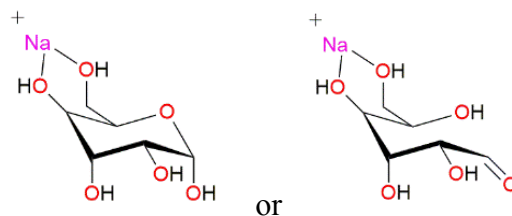
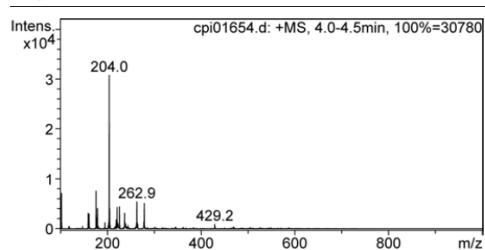
Cmpd 2, 2.0 min



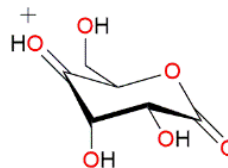
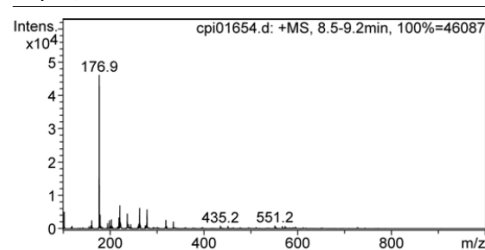
Cmpd 3, 2.8 min



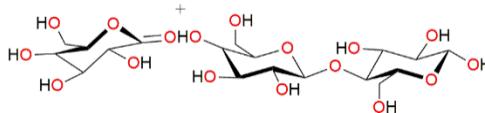
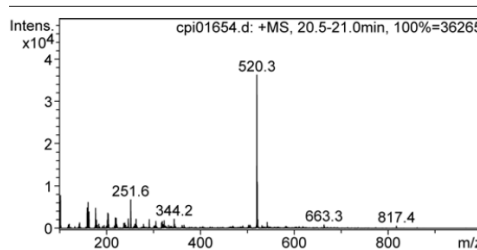
Cmpd 4, 4.2 min



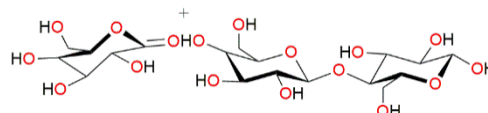
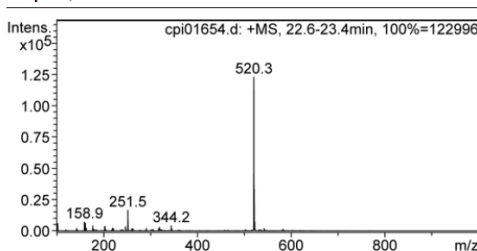
Cmpd 5, 8.9 min



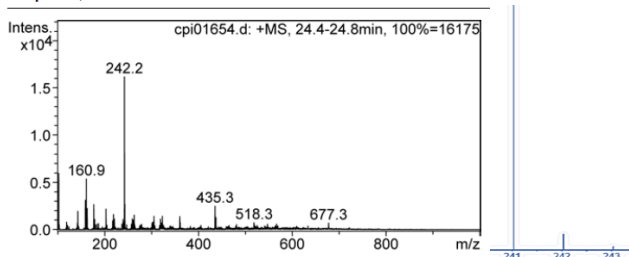
Cmpd 8, 20.7 min



Cmpd 9, 22.9 min



Cmpd 10, 24.6 min



Degradación de celobiossa con [(2BB)Cu]⁺ *in situ* y KO₂ en PB

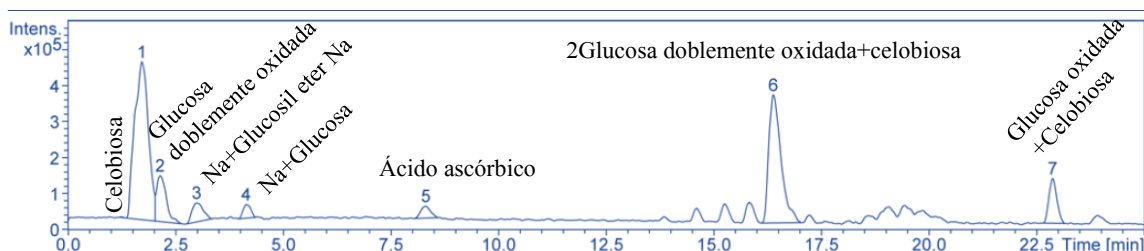
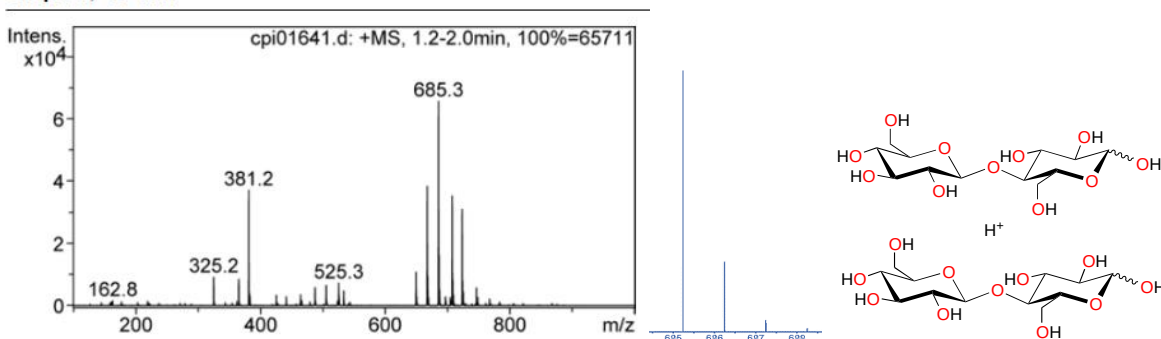


Figura 8.27. Cromatograma de la reacción de [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ 0.3 mM en disolución de PB, 1.2 equivalentes de L- (+)-ascorbato de sodio, 1.2 equivalentes de KO₂ y 10 equivalentes de celobiossa

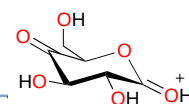
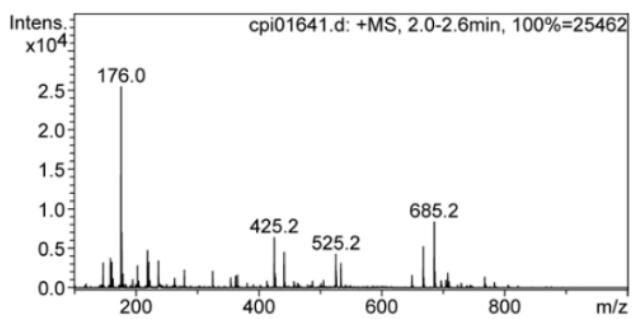
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	1.7	9777763	43.8
2	2.1	1943086	8.7
3	3.0	957583	4.3
4	4.1	473070	2.1
5	8.3	527410	2.4
6	16.4	7050054	31.6
7	22.9	1613074	7.2

Tabla 8.10. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma.

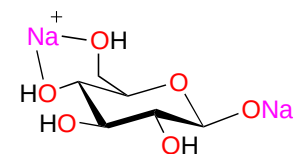
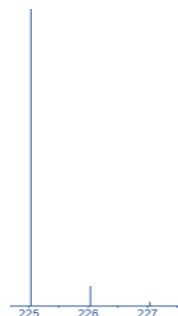
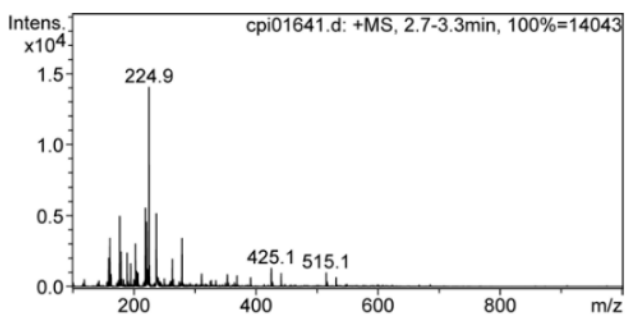
Cmpd 1, 1.7 min



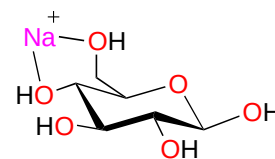
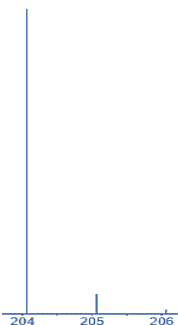
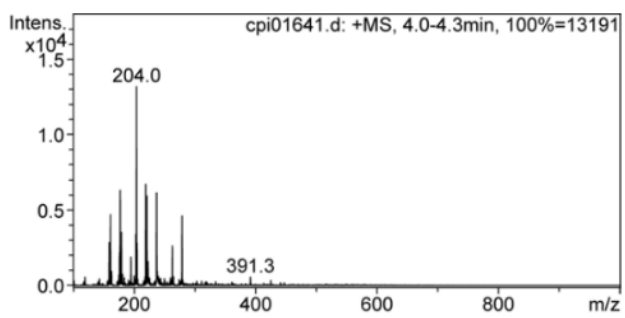
Cmpd 2, 2.1 min



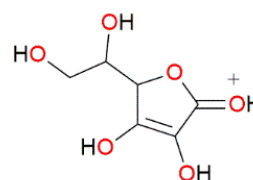
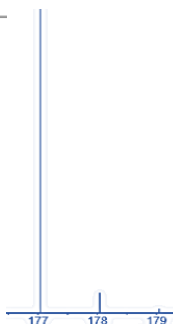
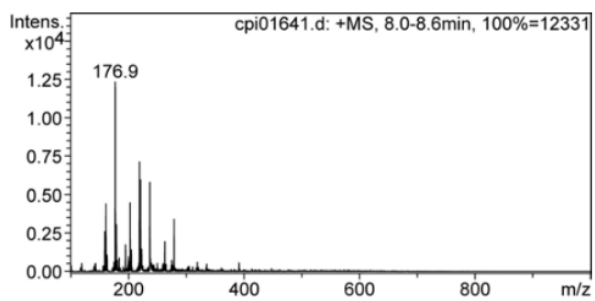
Cmpd 3, 3.0 min



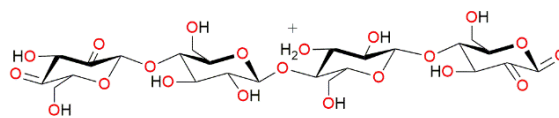
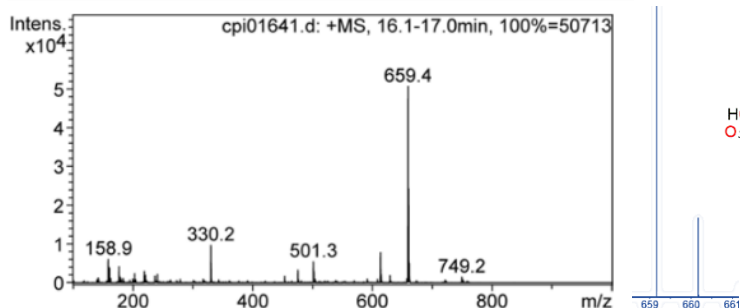
Cmpd 4, 4.1 min



Cmpd 5, 8.3 min



Cmpd 6, 16.4 min



Cmpd 7, 22.9 min

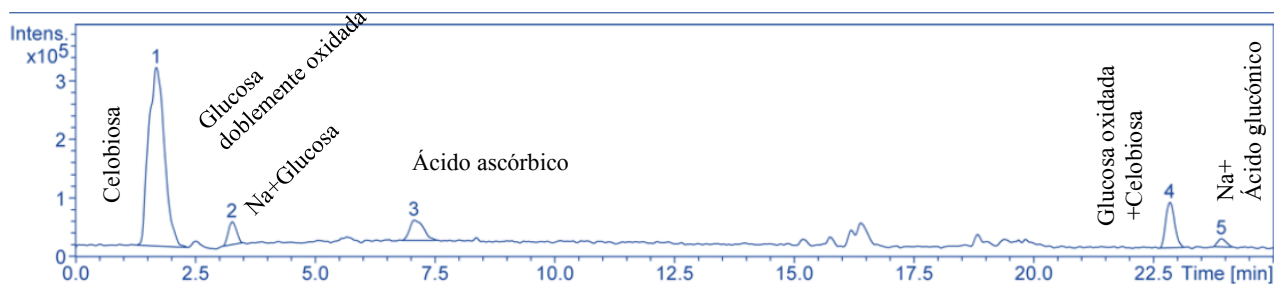
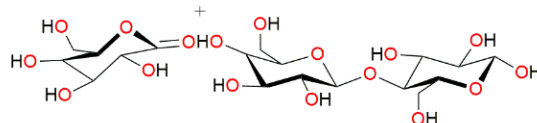
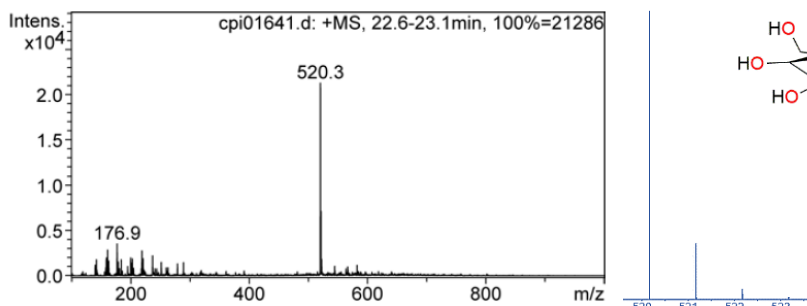
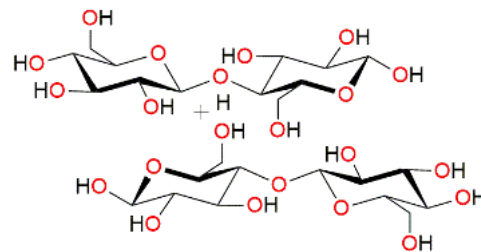
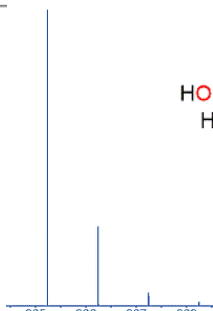
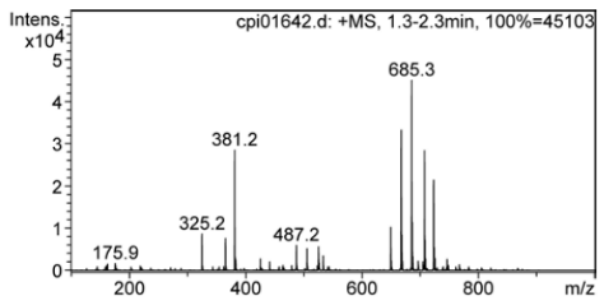


Figura 8.28. Cromatograma de la reacción de $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ 0.3 mM en disolución de PB, 2.4 equivalentes de L- (+)-ascorbato de sodio, 1.2 equivalentes de KO_2 y 10 equivalentes de celobiosa.

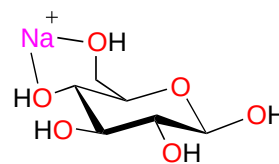
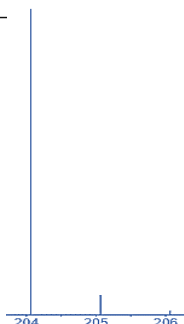
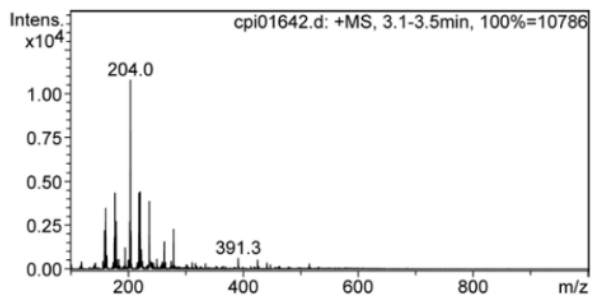
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	1.7	7051566	75.0
2	3.3	460389	4.9
3	7.1	695020	7.4
4	22.8	1017588	10.8
5	23.9	173463	1.8

Tabla 8.11. Áreas relativas de los compuestos en el cromatograma.

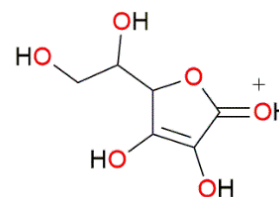
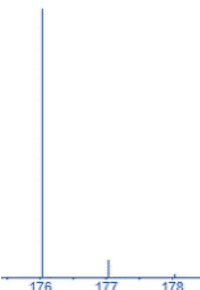
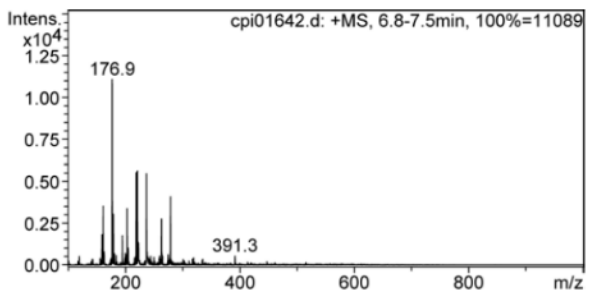
Cmpd 1, 1.7 min



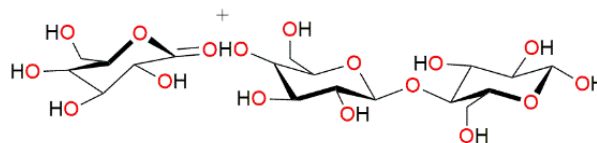
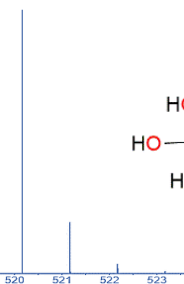
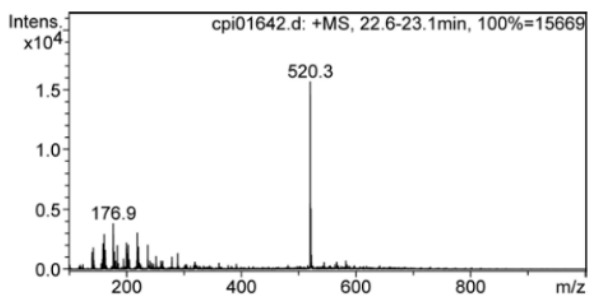
Cmpd 2, 3.3 min



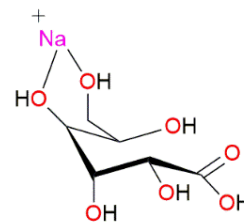
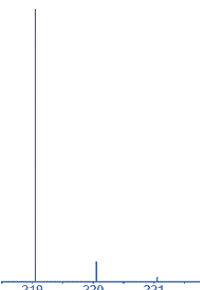
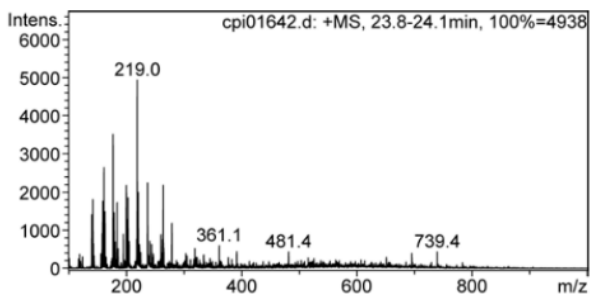
Cmpd 3, 7.1 min



Cmpd 4, 22.8 min



Cmpd 5, 23.9 min



Reacciones de control para estudios de degradación de celobiosa a escala preparativa

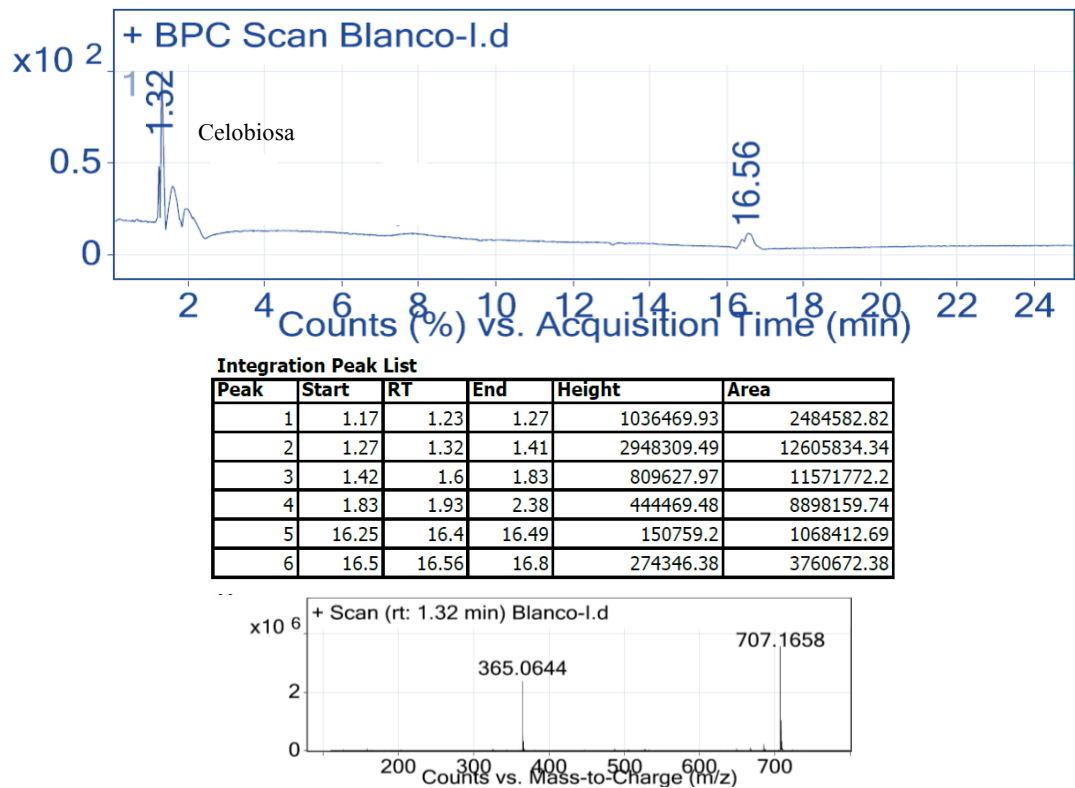


Figura 8.29. Cromatograma de 10 equivalentes de celobiosa (30mg) en disolución acuosa.

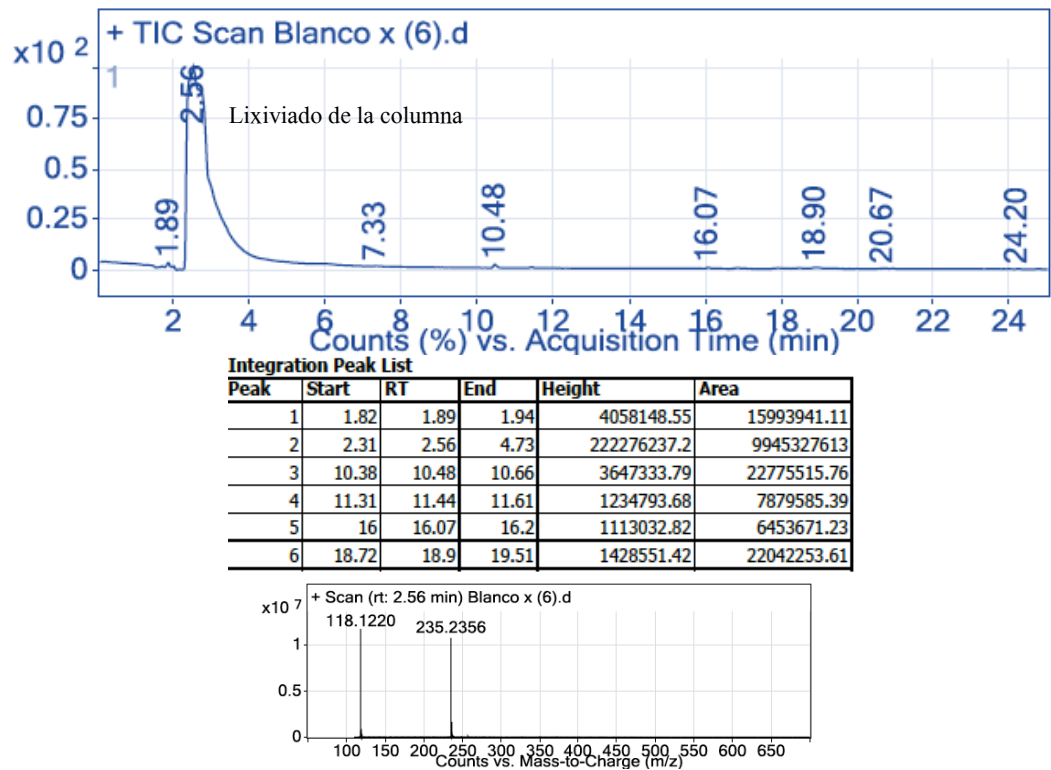


Figura 8.30. Cromatograma de 10 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en disolución acuosa.

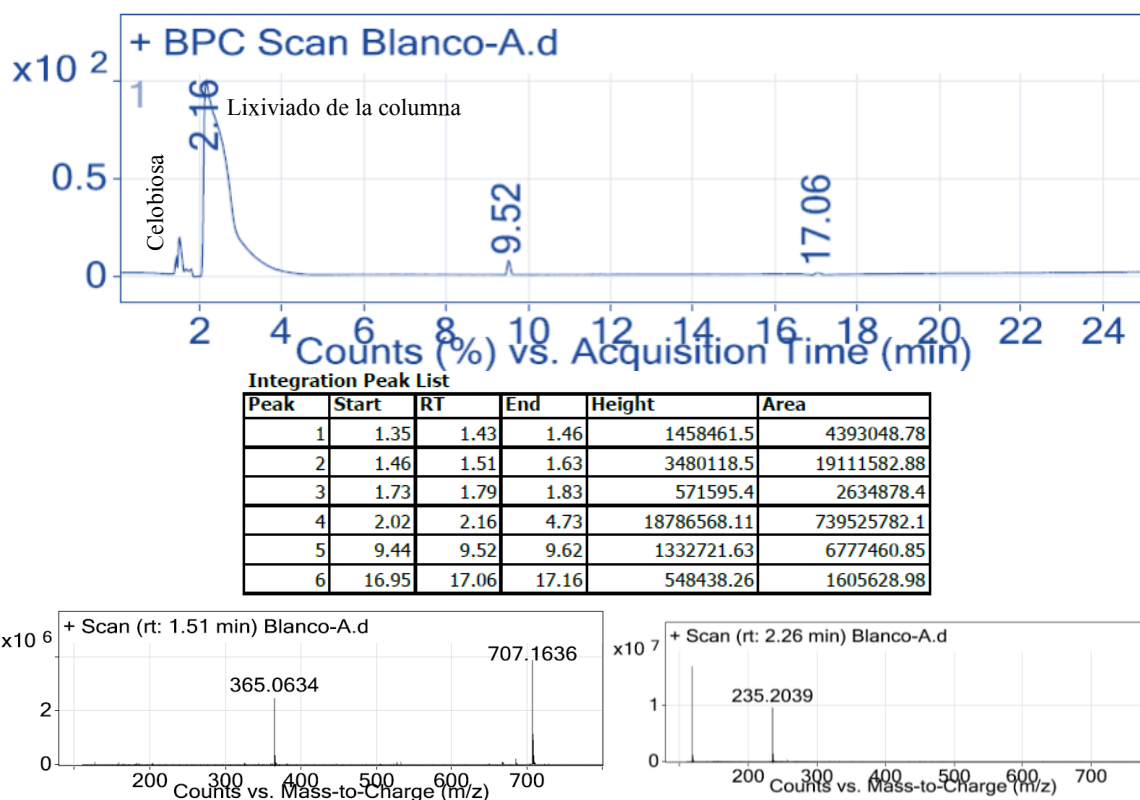


Figura 8.31. Cromatograma reacción 10 equivalentes de celobiosa con 10 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en disolución acuosa.

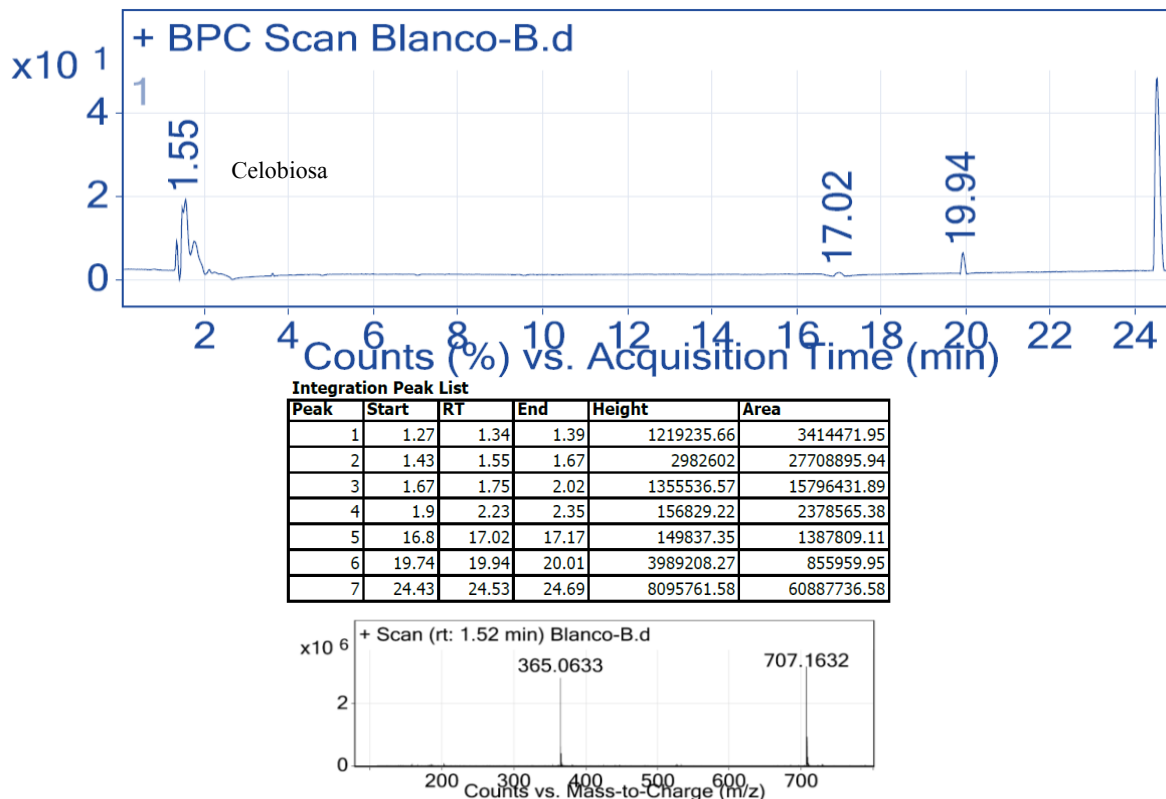


Figura 8.32. Cromatograma reacción 10 equivalentes de celobiosa con 1 equivalente de CuSO_4 en disolución acuosa.

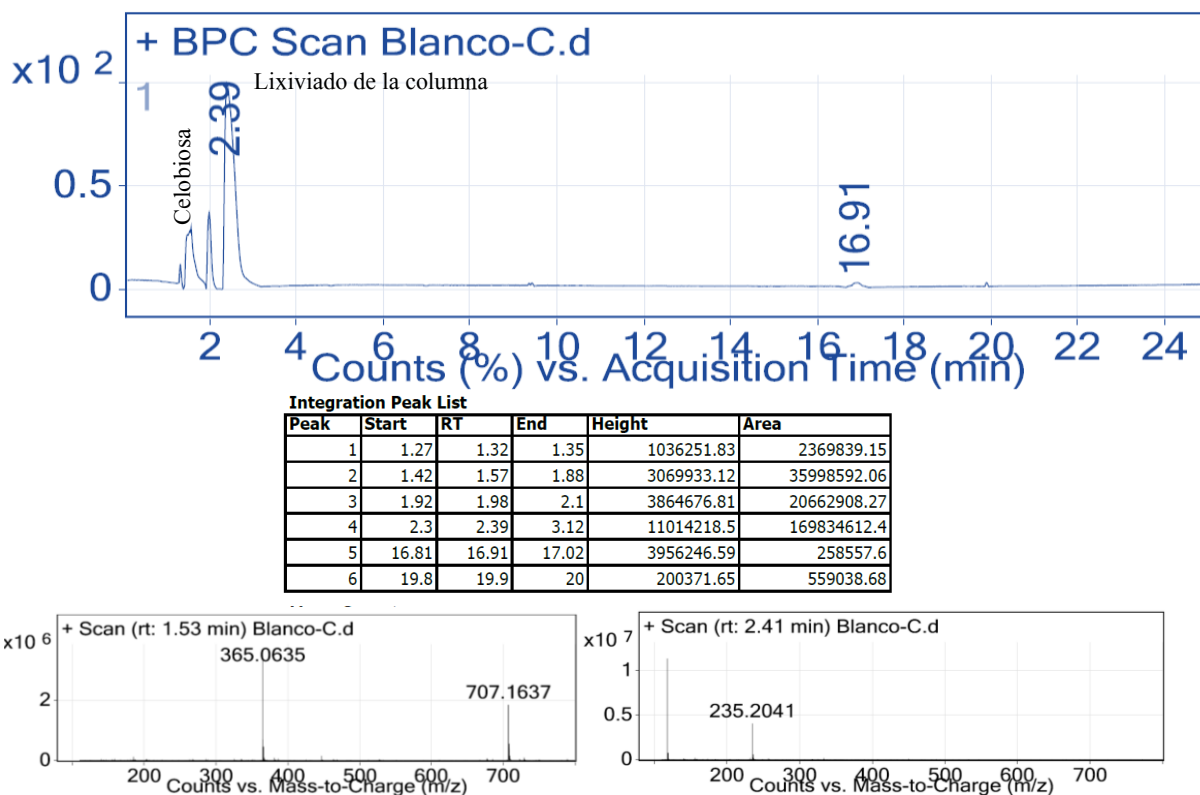


Figura 8.33. Cromatograma reacción 10 equivalentes de celobiosa con 10 equivalentes de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ y 1 equivalente de CuSO_4 en disolución acuosa.

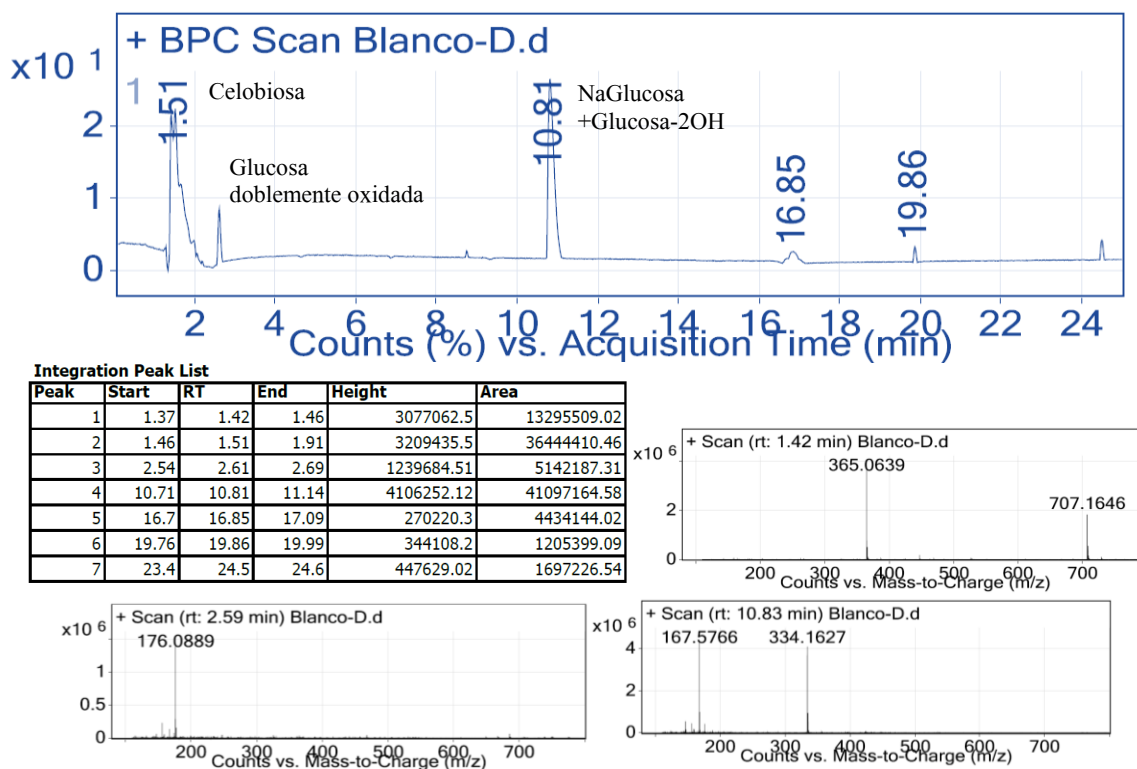


Figura 8.34. Cromatograma reacción 10 equivalentes de celobiosa con 1 equivalente de $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ en disolución acuosa.

Estudios computacionales

Tabla 8.12. Distancias de enlace seleccionadas (Å) y ángulos de enlace (°) para los complejos calculados.

	$[(2\text{BB})_2\text{Cu}_2(\mu_2\text{-}\eta^1\text{-O}_2)]^{2+}$ A	$[(2\text{BB})_2\text{Cu}_2(\mu_2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$ B	$[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})(\mu_2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)]^+ \text{C}$	$[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})(\mu_2\text{-}\eta^1\text{-O}_2)]^+ \text{D}$	$[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})(\mu_2\text{-}\eta^1\text{-O}_2)]^+ \text{E}$
Cu1-N1	2.033	1.992	2.043	2.116	2.102
Cu1-N4	2.024	2.038	2.067	2.141	2.222
Cu1-N3	2.215	2.280	4.503	2.190	2.311
Cu1-O1	1.984	1.996	2.028	1.941	1.932
Cu1-O2	2.778	1.982	2.018	2.614	2.503
Cu1-O3	---	---	2.167	2.326	2.311
O1-O2	1.308	1.405	1.377	1.314	1.341
NH...O1	3.776	3.153	---	---	2.489
RCOO..H	---	---	2.257	1.869, 2.390, 2.529	1.961, 2.331, 2.241
N1-Cu-N4	132.4	107.8	108.6	114.9	103.2
N3-Cu-N4	94.8	91.1	63.0	89.8	85.5
O2-Cu1-N4	89.0	102.6	99.4	85.7	130.7
O2-Cu1-N3	117.7	99.6	143.2	139.04	78.1
O1-Cu1-N4	105.9	140.6	135.7	99.6	99.7
O1-Cu1-N3	132.8	107.5	157.5	162.2	80.1
Cu1-O1-O2	113.4	68.7	69.7	105.1	98.1
O1-Cu1-O3	---	---	96.0	90.6	89.9

Tabla 8.13. Energía libre de compuestos diméricos a partir de $[(2\text{BB})\text{Cu}]^+$ con una molécula de O_2 o CH_3COO^- en gas y CH_3CN como PCM.

Reactions	ΔG (gas)	ΔG (CH_3CN)
$2[(2\text{BB})\text{Cu}]^+ + \text{O}_2 \rightarrow [(2\text{BB})_2\text{Cu}_2(\mu_2\text{-}\eta^1\text{-O}_2)]^{2+}$	33.7	-17.2
$2[(2\text{BB})\text{Cu}]^+ + \text{O}_2 \rightarrow [(2\text{BB})_2\text{Cu}_2(\mu_2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)]^{2+}$	24.8	-30.8
$2[(2\text{BB})\text{Cu}]^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{O}_2 \rightarrow [(2\text{BB})\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})(\mu_2\text{-}\eta^1\text{-O}_2)]^+$	-116.2	-51.2
$2[(2\text{BB})\text{Cu}]^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{O}_2 \rightarrow [(2\text{BB})\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})(\mu_2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)]^+$	-109.8	-44.8

Capítulo IX. Publicaciones

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.



Cite This: ACS Omega 2019, 4, 10729–10740

http://pubs.acs.org/journal/acsodf



Article

Oxidative Cleavage of Cellobiose by Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO)-Inspired Copper Complexes

Andrea. C. Neira,[†] Paulina R. Martínez-Alanis,[§] Gabriel Aullón,[§] Marcos Flores-Alamo,[‡] Paulino Zerón,[‡] Anna Company,^{||} Juan Chen,[⊥] Johann B. Kasper,[⊥] Wesley R. Browne,[⊥] Ebbe Nordlander,[#] and Ivan Castillo^{*,†}

[†]Instituto de Química and [‡]Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, CU, 04510 Ciudad de México, México

[§]Departament de Química Inorgànica i Orgànica and Institut de Química Teòrica i Computacional, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

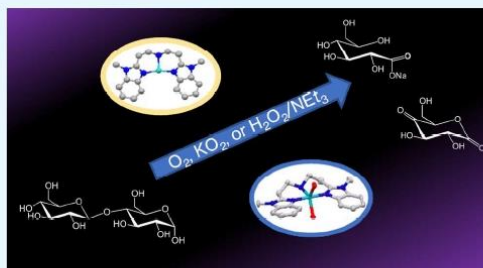
^{||}Institut de Química Computacional i Catalisi (IQCC), Departament de Química, Universitat de Girona, C/ M. Aurèlia Capmany 69, 17003 Girona, Catalonia, Spain

[⊥]Molecular Inorganic Chemistry, Stratingh Institute for Chemistry, Faculty of Science and Health, University of Groningen, Nijenborgh 4, 9747AG Groningen, The Netherlands

[#]Chemical Physics, Department of Chemistry, Lund University, Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden

Supporting Information

ABSTRACT: The potentially tridentate ligand bis[(1-methyl-2-benzimidazolyl)ethyl]amine (2BB) was employed to prepare copper complexes [(2BB)Cu^IOTf] and [(2BB)-Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ as bioinspired models of lytic polysaccharide copper-dependent monooxygenase (LPMO) enzymes. Solid-state characterization of [(2BB)Cu^IOTf] revealed a Cu(I) center with a T-shaped coordination environment and metric parameters in the range of those observed in reduced LPMOs. Solution characterization of [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ indicates that [(2BB)-Cu^{II}(H₂O)₂]²⁺ is the main species from pH 4 to 7.5; above pH 7.5, the hydroxo-bridged species [(2BB)Cu^{II}(H₂O)_x]₂(μ-OH)₂²⁺ is also present, on the basis of cyclic voltammetry and mass spectrometry. These observations imply that deprotonation of the central amine of Cu(II)-coordinated 2BB is precluded, and by extension, amine deprotonation in the histidine brace of LPMOs appears unlikely at neutral pH. The complexes [(2BB)Cu^IOTf] and [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ act as precursors for the oxidative degradation of cellobiose as a cellulose model substrate. Spectroscopic and reactivity studies indicate that a dicopper(II) side-on peroxide complex generated from [(2BB)Cu^IOTf]/O₂ or [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂/H₂O₂/NEt₃ oxidizes cellobiose both in acetonitrile and aqueous phosphate buffer solutions, as evidenced from product analysis by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. The mixture of [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂/H₂O₂/NEt₃ results in more extensive cellobiose degradation. Likewise, the use of both [(2BB)Cu^IOTf] and [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ with KO₂ afforded cellobiose oxidation products. In all cases, a common Cu(II) complex formulated as [(2BB)Cu^{II}(OH)(H₂O)]⁺ was detected by mass spectrometry as the final form of the complex.



INTRODUCTION

The recently reported lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs),¹ also known as the auxiliary activity (AA) family of copper-dependent enzymes,² feature a conserved type 2 copper binding site with a N₃ donor set defined by two imidazoles and a backbone nitrogen from one of the histidine residues, in a structural motif described as the “histidine brace” (Chart 1).^{2a,3} These enzymes oxidatively cleave the polymeric chains of recalcitrant polysaccharides to assist hydrolytic enzymes and have potential applications in biomass conversion to renewable biofuels. Recent studies have established some of the aspects that govern substrate binding, such as H-bonding to the

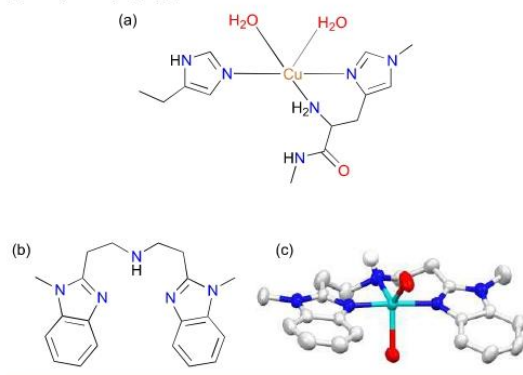
primary amine of the histidine brace,⁴ as well as the potential involvement of dioxygen⁵ or hydrogen peroxide⁶ as oxidants. However, details of the mechanism, potential intermediates in the key C–H activation step, and subsequent polysaccharide hydroxylation remain to be determined. Although cupric-superoxo and oxyl complexes have been suggested as the reactive intermediates, a mechanistic insight may be obtained from synthetic models. In this regard, few biomimetic LPMO-

Received: March 21, 2019

Accepted: June 6, 2019

Published: June 20, 2019

Chart 1. (a) Schematic Representation of the Active Site of LPMO, (b) 2BB, and (c) Mercury Diagram of the Dication $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2]^{2+15}$



inspired copper complexes have been reported to date,⁷ despite the numerous reports on biologically inspired copper–oxygen systems.⁸

Due to the ubiquitous presence of coordinated histidine residues in metalloenzyme active sites, most bioinspired complexes employ amines and nitrogen-containing heterocycles as histidine models. This approach has relied heavily on amine-, pyrazole-, and pyridine-based ligands. In contrast, reports on ligands that incorporate the more electronically relevant imidazolyl and/or benzimidazolyl donor substituents remain relatively scarce,⁹ with the notable exception of the binucleating scaffolds developed by the groups of Casella.¹⁰ We have recently exploited 2-substituted benzimidazoles to assemble chelating ligands for mononuclear $Cu^{II/I}$ complexes; these ligands offer versatility as good σ -donors and reasonable π -acceptors toward copper ions, as well as varying degrees of steric protection.¹¹ Exploration of their reactivity has revealed the formation of free superoxide anions, presumably released by solvent displacement from the putative Cu^{II} -superoxide species obtained from the corresponding cuprous complexes and O_2 .^{11d} These steps have been suggested to occur in LPMOs on the basis of DFT calculations⁵ and recently reported structural data,^{6,12} in a rapid inner-sphere reductive activation of O_2 .⁵

In this context, we recently reported the use of bis[1-methyl-2-benzimidazolyl]ethylamine (2BB,^{13,10b} Chart 1) as a simple structural model of the ligand environment in mononuclear active sites of LPMO.^{14,15} Our interest was spurred by the presence of a methylated nitrogen atom in one of the histidinic imidazoles of fungal LPMO^{2a} and the presence of a central secondary amine available for potential H-bonding with substrates. Additionally, the 2BB/ Cu^{II} system afforded complexes with bonding parameters in the range of those of LPMO active sites (Cu–N distances of ~ 1.98 Å, N–Cu–N angles of ~ 97 and $\sim 165^\circ$). In continuation of these preliminary studies, we herein report detailed spectroscopic studies of $[(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+}$ complexes, their interaction with O_2 , H_2O_2 , and KO_2 , as well as their oxidative reactivity toward cellobiose as a cellulose model substrate.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of Cu^+ Complex. Previous attempts to isolate cuprous 2BB complexes required for O_2 binding and

subsequent reactivity studies were hampered by the low solubility of the tetrafluoroborate or hexafluorophosphate complexes in dichloromethane.^{13,14} However, the use of trifluoromethanesulfonate anions (triflate, OTf) resulted in species soluble in acetonitrile amenable for solution characterization and reactivity studies. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) revealed the presence of a peak at m/z 396 assigned to the monomeric $[(2BB)Cu^I]^+$ [Figure S1 in the Supporting Information]. Further characterization by 1H NMR and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy confirmed the identity of $[(2BB)Cu^I]OTf$; its 1H NMR spectrum in CD_3CN shows relatively broad aromatic signals for the benzimidazole groups at δ 7.64, 7.24, and 7.06 ppm, the resonance for the *N*-methyl groups was observed at δ 3.42, whereas the methylene protons gave rise to resonances at δ 3.21 ($-CH_2-N$) and 3.01 ppm ($-CH_2-C$). FTIR spectroscopy displayed notable bands at 3273 (w) cm^{-1} assigned to the central amine N–H stretch, 1027 and 1257 (s) assigned to S–O stretching bands of the triflate anion, as well as a pair of strong bands at 1147 and 1227 cm^{-1} assigned to C–F stretching vibrations; a band at 1614 cm^{-1} was assigned to the benzimidazole-based C=N stretching mode. The main differences with the previously reported cupric complex $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ include the frequencies of the N–H stretch at 3241 (w) cm^{-1} , the slightly higher intensity of the C=N stretching mode previously observed at 1617 cm^{-1} , and the shoulder at 3356 cm^{-1} that was assigned to O–H stretching modes in the cupric complex.

Solid-State Structure of $[(2BB)Cu^I]OTf$. $[(2BB)Cu^I]OTf$ was dissolved in a minimum amount of anhydrous CH_3CN , and after slow evaporation, colorless X-ray quality crystals of $[(2BB)Cu^I]OTf$ were obtained. The metric parameters around the Cu(I) center in the $[(2BB)Cu^I]^+$ cation are in the range of those reported for the enzymes, displaying the characteristic T-shape of the reduced form of the active sites of LPMOs, as shown in Figure 1 and Tables S1–S3. The N1–Cu1–N4 open



Figure 1. Mercury diagram of $[(2BB)Cu^I]^+$ at the 50% probability level. H atoms, except for H3 on the central amine, and the triflate counter ion are omitted for clarity; color code: C, grey; N, blue; Cu, turquoise.

angle of 165° in $[(2BB)Cu^I]^+$ is identical to the corresponding one in the AA9–AA11 active sites,¹⁶ whereas the two closed angles, N3–Cu1–N4 and N1–Cu1–N3 of 98.01 and 96.82° , respectively, for $[(2BB)Cu^I]^+$, are equivalent to that of 97° in LPMO. A comparison of the bond distances is presented in Table 1, showing a larger Cu–N distance to the central nitrogen donor than that to the benzimidazole N atoms.

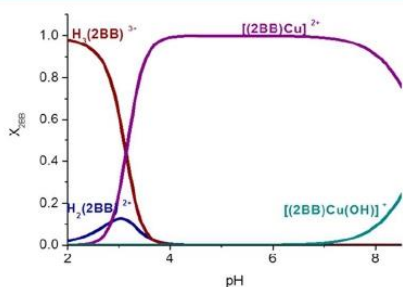
Table 1. Bond Distances and Angles in [(2BB)Cu^I]OTf and Comparison with the Corresponding Parameters in Reduced LsAA9A¹⁶

parameter	[(2BB)Cu ^I]OTf	parameter	Cu(I)LsAA9A
Cu1–N4	1.901 Å	Cu–Nσ (His1)	1.9 Å
Cu1–N1	1.908 Å	Cu–Nε (His78)	2.0 Å
Cu1–N3	2.173 Å	Cu–NH ₂ (His1)	2.2 Å
N4–Cu1–N1	164.54°	Nσ–Cu–Nε	165°
N4–Cu1–N3	98.01°	Nσ–Cu–NH ₂	97°
N1–Cu1–N3	96.82°	Nε–Cu–NH ₂	97°

Interestingly, the triflate anion interacts with [(2BB)Cu^I]⁺ via hydrogen bonding with the central amine N–H, defined by an O2...N3 distance of 3.363(3) Å and an O2...H3–N3 angle of 149(2)°.

Solution Studies of [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂. Insight into the nature of the cupric complex in an aqueous solution was gained through equilibrium studies to determine its speciation. Potentiometric titration of 2BB afforded pK_a values of 3.68, 4.86, and 7.84 for the protonated forms of the two benzimidazolic and amine sites, respectively. The values for the benzimidazolic sites are lower (in water at 25 °C) than those of benzimidazole at 5.58,^{17a} 1-methylbenzimidazole, 1-ethylbenzimidazole at 4.88, and even 1-methyl-5-chlorobenzimidazole at 3.88.^{17b} Subsequently, the stability constant for [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂]²⁺ was determined at log K = 12.44 after refinement of the potentiometric data with Hyperquad software,¹⁸ considering temperature, volumes, and concentrations of analytes (HNO₃, NaOH, potassium biphthalate, 2BB, and its cupric complex, see Figure S2). This log K value is high compared to that of Cu(II) with bidentate 2-hydroxymethylbenzimidazole and 1-methyl-2-hydroxymethylbenzimidazole at 9.30 and 9.66, respectively.^{17a}

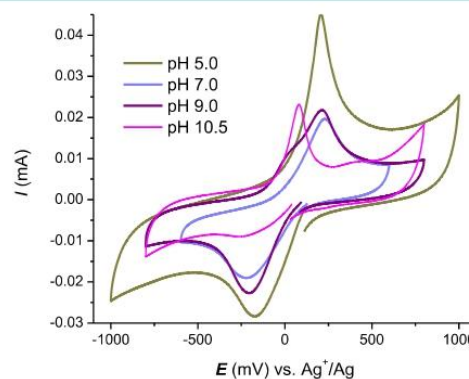
The species distribution was determined with MEDUSA software¹⁹ (ionic strength 0.1 M NaNO₃), where the dicationic species [(2BB)Cu^{II}]²⁺ clearly predominates in the pH range of 4–8; see Figure 2. One or two molecules of water are likely

**Figure 2.** Speciation diagram for [(2BB)Cu^{II}]²⁺.

coordinated to the cupric ion in solution to form [(2BB)Cu^{II}(H₂O)_n]²⁺ (*n* = 1, 2), as observed in the solid state.¹⁵ Interestingly, a monodeprotonated species is predicted to be present around pH 7.5 and above, which was assigned to a cupric–hydroxo complex [(2BB)Cu^{II}(OH)(H₂O)_{n-1}]⁺, likely in the form of a bridged dimer [{(2BB)Cu^{II}(H₂O)_{n-1}}₂(μ-OH)₂]²⁺, with log K = 15.88. This type of species would be favored over a complex with a deprotonated central amine, on the basis of the additional experimental evidence for a hydroxo-bridged dicopper complex (vide infra). Further

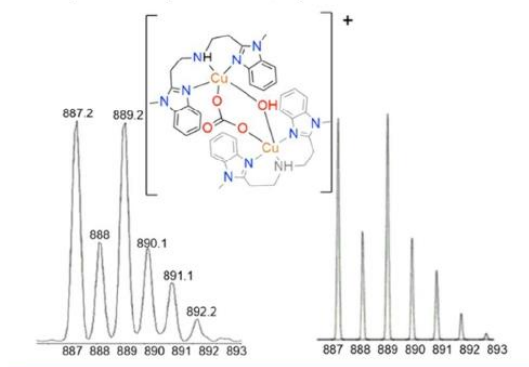
support for deprotonation of a coordinated water molecule over an amine donor is provided by studies on the effect of metal coordination on the pK_a values of biologically relevant ligands, with transition-metal ions increasing the acidity by 1–3 log units.²⁰ These observations suggest that the potential involvement of a deprotonated amine during the catalytic cycle may be ruled out in our system and plausibly in the active site of LPMO as well. In the enzymatic system, the proposed deprotonation of the terminal amine of the histidine brace¹² seems unlikely near neutral pH,^{4–6} particularly considering determinations of the pK_a values of terminal amino groups in related ATCUN peptide complexes.²¹ Quantum refinement of X-ray and neutron diffraction data also argues against –NH₂ deprotonation.²²

Electrochemical Studies. The species distribution is supported by electrochemical results obtained at pH 5.0, 7.0, 9.0, and 10.5 of aqueous solutions of [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂. The system behaves quasireversibly, with one redox wave assigned to the Cu^{II/I} couple at E_{1/2} = 226 mV vs standard hydrogen electrode (SHE) at pH 5.0–7.0, which is in the range of the redox potentials reported for LPMOs (150–370 mV vs SHE). Differences were observed at pH 9.0–10.5; in the former case, a shoulder at a slightly more negative potential indicates the presence of an additional species. This is confirmed at pH 10.5, where the shoulder becomes the only wave observed (Figure 3). In CH₃CN, electrochemical analysis of [(2BB)Cu^I]OTf shows a quasireversible behavior, with E_{1/2} = 76 mV vs SHE (–272 mV vs ferrocenium/ferrocene, Figure S3).

**Figure 3.** Cyclic voltammograms of 1 mM [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ solutions in phosphate buffer (PB) at pH 5.0, 7.0, and 9.0, and in carbonate buffer at pH 10.5, acquired at 1 V s^{–1} with a glassy carbon electrode (at pH 10.5, the system is heterogeneous).

Insight into the identity of the additional species formed at pH 9.0–10.5 was obtained through ESI-MS analysis of a solution of [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂. A signal was detected at *m/z* 887, which was assigned to the mixed hydroxo/carbonato-bridged dicopper complex shown in Scheme 1 on the basis of its mass and isotope distribution. The complex detected may be formed upon aerobic CO₂ insertion into an initially formed dihydroxo-bridged dimeric complex [{(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂}₂(μ-OH)₂]²⁺.²³ UV–vis spectroscopic evidence of the formation of the putative [(2BB)Cu^{II}(H₂O)_x}₂(μ-OH)₂]²⁺ was obtained by addition of NEt₃ to an acetonitrile solution of [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ at room temperature.

Scheme 1. Proposed Hydroxo/Carbonato-Bridged Dicopper Complex Formed from $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ in Water at pH 9.0 with Experimental (Left) and Simulated Isotopic Mass Spectrometry Patterns (Right)



A new band was observed at 330 nm ($\epsilon \sim 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), which can be assigned as a hydroxo to Cu(II) ligand-to-metal charge-transfer (LMCT) transition; see Figure S4.

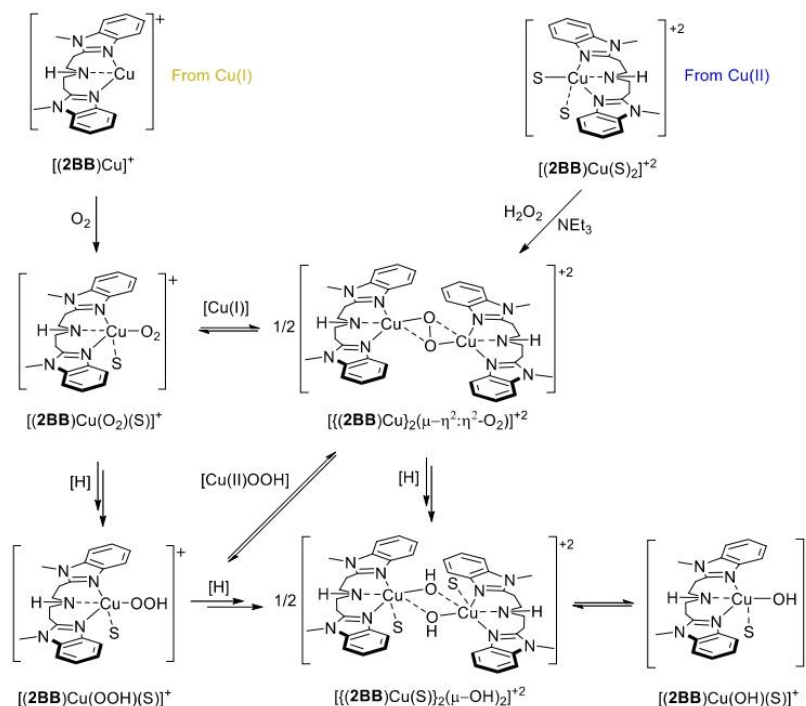
These observations confirm that deprotonation of a coordinated water molecule is more facile than that of the amine in our system. This deprotonation occurs at a higher pH value (7.5) than that used in the study suggesting terminal amine deprotonation (i.e., pH 7.0),¹² further emphasizing that the amine is likely to remain protonated at enzymatic pH.

Moreover, the optimum pH value for enzymatic activity is slightly acidic,^{4,5} rendering the deprotonation of the terminal amine even less likely.

Reactivity of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ with O_2 . The reactivity of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ with dioxygen was explored initially by UV-vis spectroscopy at low temperature in an acetonitrile solution. Gentle bubbling of O_2 through 0.3 mM solutions of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ at 243 K resulted in the appearance of a broad band at 360 nm, assigned to ligand-to-metal charge transfer (LMCT) of a copper-oxygen species, accompanied by d-d transition at 680 nm; a similar behavior was observed in acetone at 193 K. The species was stable for at least an hour, although decay was observed when the temperature was raised; see Figure S5. These changes were not observed under similar conditions or at lower temperature in tetrahydrofuran (THF) solutions, and reactivity studies in this solvent were not pursued. In aqueous phosphate buffer (PB) at 273 K, no significant changes were observed by UV-vis spectroscopy upon bubbling O_2 through in situ-reduced (with 1.2–1.5 equiv of sodium ascorbate) $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$. In both acetonitrile and PB solutions, the products generated at low temperature were characterized by ESI-MS, revealing the presence of an intense signal at m/z 396 assigned to $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$; see Figure S1.

The mixture was characterized by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, revealing that although $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ reacts slowly with dioxygen in acetonitrile at 243 K, a signal characteristic of a cupric complex in an axial coordination environment appears after ca. 10 min [$g_{\parallel} = 2.250$,

Scheme 2. Proposed Reaction Manifolds and Putative Copper Complexes Generated from $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+/\text{O}_2$ (Top Left) or $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{S})_2]^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NEt}_3$ (Top Right)



10732

DOI: 10.1021/acsomega.9b00785
ACS Omega 2019, 4, 10729–10740

$g_{\parallel} = 2.082$, $A_{\parallel} = 423$ MHz (151 G), integration 21% relative to Cu(II) external standard]. A reasonable explanation would imply initial formation of an EPR silent cupric-superoxo complex $[(2BB)Cu^{II}(O_2)]^+$, likely in equilibrium with a side-on peroxo-bridged dicopper(II) complex $[(2BB)Cu^{II}]_2(\mu-\eta^2:\eta^2-O_2)]^{2+}$ (on the basis of UV-vis spectroscopy and H_2O_2 reactivity section below). H-abstraction from solvent or cellobiose may result in the EPR-active cupric hydroperoxo $[(2BB)Cu^{II}(OOH)(S)]^+$ and/or the further downstream hydroxo complex $[(2BB)Cu^{II}(OH)(S)]^+$ ($S = H_2O$, CH_3CN). These species may give rise to the shoulder at 330 nm by UV-vis absorption spectroscopy (Figure S5). Cu(I) oxygenation leading to a Cu(II)-hydroperoxo complex through H-abstraction has been previously observed.²⁴ Finally, both Cu(II)-hydroperoxo and dicopper(II)-peroxo may further react to generate the final product $[(2BB)Cu^{II}(OH)(S)]^+$, in equilibrium with the dimeric form $[(2BB)Cu^{II}(S)_x](\mu-OH)_2]^{2+}$ (Scheme 2).

In PB/glycerol at pH 7.0 and 273 K, $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ reduced in situ with 1.2 equiv of sodium ascorbate produced no changes after bubbling of O_2 , changes were not observed. However, addition of cellobiose to the oxygenated PB solution resulted in an axial signal with $g_{\parallel} = 2.275$ and $g_{\perp} = 2.054$ and $A_{\parallel} = 502$ MHz (179 G) and $A_{\perp} = 70$ MHz (25 G); see Figure 4; the spectrum was simulated as containing one or

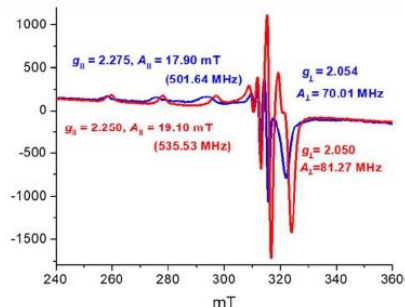


Figure 4. EPR spectra of in situ-generated $[(2BB)Cu^I]^+$ with 1.5 equiv of sodium ascorbate after bubbling O_2 and adding 10 equiv of cellobiose (3 mM in PB, blue trace), and mixture of $[(2BB)Cu^I]OTf$, 1.2 equiv of KO_2 , and 10 equiv of cellobiose (3 mM in CH_3CN , red trace).

two Cu(II) species, with only the former case resulting in a good fit. Examples of mononuclear copper-hydroperoxo complexes featuring tripodal pyridylamine and pyridylamine-thioether ligands have been characterized by EPR spectroscopy and assigned to trigonal bipyramidal [$g_{\parallel} = 2.004$, $g_{\perp} = 2.207$, $A_{\parallel} = 305$ MHz (109 G), $A_{\perp} = 210$ MHz (75 G)]²⁵ or square pyramidal geometries [$g_{\parallel} = 2.24$, $g_{\perp} = 2.06$, $A_{\parallel} = 471$ MHz (168 G), $g_{\perp} = 2.25$, $g_{\perp} = 2.04$, $A_{\parallel} = 504$ MHz (180 G)].²⁶ A similar situation has been observed with monomeric cupric-hydroxo complexes: EPR spectroscopic data for tripodal complexes have been observed to give rise to “inverse” signals, whereas axial signals with some degree of rhombicity have been observed in the few cases of tetragonal Cu(II)-OH complexes [$g_x = 2.032$, $g_y = 2.055$, $g_z = 2.185$, $A_{Cu} = 588$ MHz (189 G), $A_N = 40$ –53 MHz (14–19 G)].²⁷ Resemblance of the parameters to those of the tetragonal species suggests a square pyramidal coordination environment for the putative Cu(II)-hydroperoxo^{7c,26} or hydroxo complexes, likely with

weak donors in the axial positions $[(2BB)Cu^{II}(OOH)(S)]^+$ or $[(2BB)Cu^{II}(OH)(S)]^+$ ($S = \text{solvent}$, see Scheme 2).

Reactivity of $[(2BB)Cu^I]OTf$ and $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ with KO_2 . The reactivity of the copper complexes with a one-electron reduced form of dioxygen was explored with KO_2 ; this may be important to establish the oxidant in LPMOs, since H_2O_2 has been suggested instead of the originally proposed O_2 .⁶ Thus, addition of KO_2 to solutions of $[(2BB)Cu^I]OTf$ was monitored by UV-vis absorption spectroscopy to identify potential copper-oxygen species, both in acetonitrile and PB solution at pH 7.0. In acetonitrile, the main spectral change consisted of a shoulder at 365 nm, which intensified slightly after addition of cellobiose. Analysis of the reaction mixture by ESI-MS revealed the presence of a peak at m/z 431 assigned to $[(2BB)Cu^{II}(OH)(H_2O)]^+$, along with peaks at m/z 396 and 545 characteristic of $[(2BB)Cu^I]^+$ and $[(2BB)Cu^{II}(OTf)]^+$ (Figure S6). When cellobiose was added, ESI-MS evidenced the presence of oxidative degradation products (vide infra). An analogous behavior was observed in PB by UV-vis, although the shoulder was observed at 345 nm. Three relevant peaks were detected by ESI-MS: the one at m/z 412 is consistent with a monooxygenation product $[(2BB)Cu^{II}(O)]^+$, which could correspond to ligand hydroxylation, although such a product was not detected after demetallation with excess aqueous ammonia; a cupryl species cannot be firmly supported without further evidence. A peak at m/z 428 was assigned to the putative cupric-superoxo $[(2BB)Cu^{II}(O_2)]^+$ and the one at m/z 602 was tentatively assigned to $[(2BB)Cu^{II}(O)(OTf)(CH_3CN)]^+$ (Figure S7); the aforementioned species at m/z 396 and 545 were also detected. These observations imply that highly reactive copper-oxygen species are formed in the Cu(I)/ KO_2 system, allowing detection of the relatively stable downstream product $[(2BB)Cu^{II}(OH)(H_2O)]^+$.

EPR spectra recorded from flash frozen samples over the course of the reaction reveal that after addition of KO_2 to $[(2BB)Cu^I]OTf$ in acetonitrile, a signal characteristic of a cupric complex in an axial environment appears, with $g_{\parallel} = 2.250$ and $g_{\perp} = 2.050$ and $A_{\parallel} = 536$ MHz (191 G) and $A_{\perp} = 81$ MHz (29 G), Figure 4. The signal becomes more intense upon addition of cellobiose, possibly due to generation of the proposed $[(2BB)Cu^{II}(OH)(H_2O)]^+$ after H-abstraction,²⁷ which was detected by ESI-MS. The analogous reaction of $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ in either CH_3CN or PB solutions with KO_2 did not show considerable changes in its UV-vis absorption spectra, even after addition of cellobiose. No evidence for copper-oxygen species was obtained by ESI-MS or EPR spectroscopy in the reactions of the Cu(II) complex with KO_2 . Thus, a cupric-superoxo complex cannot be detected under these conditions.

Reactivity of $[(2BB)Cu^I]OTf$ and $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ with H_2O_2 . The reaction of $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ with H_2O_2 was monitored by UV-vis spectroscopy to determine whether different species are formed relative to the reaction of the Cu(I) complex with O_2 , both in acetonitrile and PB (pH 7.0). In acetonitrile, no changes with respect to the original spectrum were observed, even after addition of cellobiose; an analogous behavior was observed in PB. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis indicated that cellobiose did not undergo degradation. In contrast, reaction of $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ with 1:1 mixtures of H_2O_2/Et_3N in acetonitrile resulted in spectral changes characterized mainly by an absorbance maximum

around 365 nm (see Figures S8 and S9) and a d–d transition at 670 nm. Another copper complex appears to be present, on the basis of the shoulder observed at ca. 330 nm. A mixture of the proposed dimeric $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$ and monomeric $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OOH})(\text{S})]^+$ and/or $[(2\text{BB})\text{-Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{S})]^+$ complexes (cf. Scheme 2) may be responsible for the optical features described, with ample precedent for $\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-peroxo dicopper(II)}$ complexes with intense absorption bands around 360 nm.^{10,28} The few examples reported of monomeric, tetragonal cupric hydroperoxo, and hydroxo complexes feature LMCT bands that are blue-shifted relative to the dimeric peroxo-bridged species,^{25–27} which is consistent with our observations. The similarity with the UV–vis absorption spectrum of the reaction mixture with $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ and dioxygen (see Figure S10) further suggests the formation of peroxo dicopper(II) species in the reaction of Cu(I) with O_2 described above. $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$ may form by rapid capture of an initially formed cupric–superoxo $[(2\text{BB})\text{-Cu}^{\text{II}}(\text{O}_2)]^+$ by a second equivalent of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$. The reaction of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ with H_2O_2 was also analyzed by UV–vis absorption and EPR techniques, resulting in spectra with poorly defined features.

The presence of dicopper species in acetonitrile solution was confirmed by cryospray ionization mass spectrometry (CSI-MS) under conditions that are similar to those employed for UV–vis absorption spectroscopy. As soon as 3 equiv of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ were added to $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ in acetonitrile, the sample was injected at 243 K, identifying $[(2\text{BB})_2\text{Cu}_2^{\text{II}}(\mu\text{-CO}_3)(\text{OTf})]^+$, $[(2\text{BB})_2\text{Cu}_2^{\text{II}}(\mu\text{-O}_2)]^{2+}$, and $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$. Spectral comparison with the injected sample acquired at 293 K (once the band at 365 nm decayed) shows that similar species are formed, but the bimetallic species are favored at higher temperature, on the basis of their intensities (Table S4 and Figure S11).

Analysis of the reaction mixture by EPR spectroscopy reveals that after reaction of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ with 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ in acetonitrile, the signal characteristic of a cupric complex in an axial coordination environment becomes weak after ca. 10 min, likely due to formation of the antiferromagnetically coupled $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$; this species is stable for at least 2 h at 243 K, on the basis of UV–vis and EPR measurements.

Addition of the potentially chelating acetate anion (OAc^- , 3 equiv in methanol/acetonitrile) to 0.3 mM $[(2\text{BB})\text{-Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ in acetonitrile was tested to interrogate the nature of the dimeric species formed upon addition of 30 equiv of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$.^{29,30} The reaction was monitored by UV–vis absorption spectroscopy at 243 K, showing the generation of the band at 365 nm, attributed to $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$, along with new bands at 414 and 440 nm; see Figure 5.

The band at 365 nm decays over a period of 75 min at 243 K, with concomitant increase in the intensity of the bands at 414 and 440 nm; this transformation occurs almost instantaneously by increasing the temperature to 293 K. Similar results were observed upon addition of O_2 , KO_2 , or H_2O_2 to cuprous and cupric complexes in the presence of OAc^- . CSI-MS analysis of the final products at 243 K revealed the presence of $[(2\text{BB})_2\text{Cu}_2^{\text{II}}(\mu\text{-}\eta^2\text{-OAc})_2(\text{OTf})]^+$ and $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$ (Table S5), with their intensities increasing upon warming up the mixture to 293 K; see Figure S12. EPR spectroscopy reveals that once $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ is added, the signal characteristic of the cupric complex in an axial coordination environment becomes weak after ca. 10 min

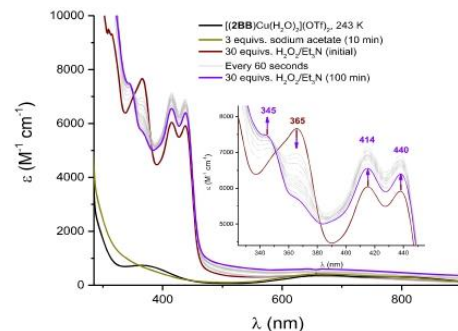


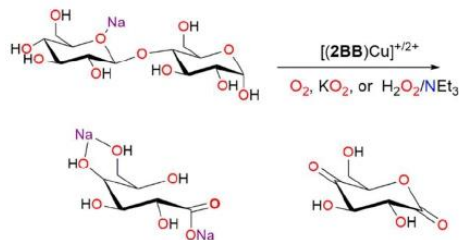
Figure 5. UV–vis absorption spectrum of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ (0.3 mM in CH_3CN , 3 equiv of NaOAc in 60 μL of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$, black trace) after addition of 3 equiv of 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ (green), and 30 equiv of the same (brown); follow-up of the reaction and the final spectrum after 100 min (purple trace).

due to formation of the antiferromagnetically coupled $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$ (Figure S13).

Resonance Raman Spectroscopy. Further characterization of the proposed dimer $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$ and the associated complex formed upon addition of NaOAc was attempted by resonance Raman spectroscopy. Since these species give rise to the bands observed by UV–vis absorption spectroscopy at 365 nm and 414 and 440 nm, respectively, measurements were carried out with mixtures of $[(2\text{BB})\text{-Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ and 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, with and without added sodium acetate, and excitation at 355 and 457 nm. Raman spectra recorded with excitation at 355 nm was employed at 243 K to favor detection of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$, whereas excitation at 457 nm was employed at 293 K to favor detection of the unidentified species that gives absorption maxima at 414 and 440 nm (Figures S14 and S15). Although strong signals are present, no isotope-sensitive bands are clearly discernible ($\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ vs $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$), as the spectra appear to be dominated by ligand-based vibrations. In the case of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2)^{2+}$, the main absorption band in the UV–vis spectrum is associated to a 2BB-based transition (see the theoretical section and Figures S21 and S22).

Preparative Scale Oxidations of Cellobiose with $[(2\text{BB})\text{Cu}]\text{OTf}$ and $[(2\text{BB})\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$. Oxidations of cellobiose using 0.3 mM acetonitrile solutions of $[(2\text{BB})\text{-Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$, 10 equiv of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$, and 10 equiv of cellobiose at 243 K were undertaken (cf. Figure S16 and Table S6). Similarly, a comparative reaction was performed by generating the Cu(I) complex in situ from the reduction of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ with 10 equiv of sodium ascorbate and subsequent bubbling of O_2 , followed by addition of 10 equiv of cellobiose (Figure S17 and Table S7). As a common product of these reactions, sodium gluconate was detected by HPLC-MS (Scheme 3 and Table 2), demonstrating that the $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}]^{2+/+}$ system has biomimetic activity for oxidative cellobiose degradation in the presence of the appropriate oxidizing agent. It should be noted that the reaction that employed in situ-generated $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+$ in PB with O_2 as oxidant is slightly more selective toward gluconate formation, since it was detected in higher yield by HPLC-MS. In PB with $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ as oxidant, the doubly oxidized glucose in Scheme 3 is the main product (Figure S18). The H_2O_2 reaction shows a greater degree of cellobiose degradation, but more products

Scheme 3. Cellobiose Degradation by [(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+} and Several Oxidants, with Main Products Detected by HPLC-MS



are observed (i.e., H₂O₂ is a more active but less selective oxidant, Figures S16–S18, Tables S6–S8). Reactions were also performed using in situ-reduced cupric complex (with 1.2 and 2.4 equiv ascorbate) and KO₂ as an oxidizing agent, with similar degradation products detected, along with unreacted cellobiose (Table 2). Control experiments with [(2BB)-Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂, CuSO₄, H₂O₂/NEt₃, and CuSO₄/H₂O₂/NEt₃ show no oxidative degradation of cellobiose, although a previously observed dehydration product was detected at *m/z* 334 in the first case. Care must be exercised in the interpretation of chromatograms, since all samples containing H₂O₂ have a leaching product from the HPLC column (Figure S19).

Glucose oxidation was tested in PB with 0.3 mM [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂ and 10 equiv of H₂O₂/NEt₃ (Figure S20 and Table S9), resulting in mono-oxidation as the major product relative to double oxidation (33 vs 14%). In addition to unreacted glucose, sodium gluconate and glucose aldehyde were detected in small quantities (Table 2). The only precedent of related inorganic systems capable of cleaving glucose derivatives features 4-nitrophenolate as the leaving group.^{7b,c}

Computational Studies. The thermodynamic feasibility of the copper–oxygen species that may be formed in the presence of the oxidants tested (O₂, KO₂, and H₂O₂) was evaluated by density functional studies. Reactions of [(2BB)-Cu^I]⁺, [(2BB)Cu^{II}]²⁺, [(2BB)Cu^I(S)]⁺, and [(2BB)Cu^{II}(S)]²⁺ (S = H₂O, CH₃CN) with dioxygen, potassium superoxide, or hydrogen peroxide were evaluated as they appear to generate the dimeric [(2BB)Cu^{II}]₂(μ-η²:η²-O₂)²⁺ and potentially [(2BB)Cu^{III}]₂(μ-O)₂²⁺. The optimized structures were validated by comparison of the bonding parameters obtained

with those observed for the structurally characterized complexes.

Initial Complexes. [(2BB)Cu^I]⁺ and [(2BB)Cu^{II}]²⁺ were considered with either a molecule of water or CH₃CN coordinated, since those solvents were employed for physical measurements and reactivity tests. For both solvents, the coordination of one molecule is energetically favorable, with values between 3 and 30 kcal mol^{−1} (Table 3). The Gibbs free energies for the solvent-coordinated cuprous complexes notwithstanding, calculated for [(2BB)Cu^I(H₂O)]⁺ and [(2BB)Cu^I(NCCH₃)]⁺ at −3 and −5 kcal mol^{−1}, are rather low compared with the binding constants calculated for their cupric counterparts. This is consistent with the lack of experimental evidence for coordinated solvent molecules in the solid state or in solution by ESI-MS, which can be attributed to the high lability of the Cu(I) centers. The geometries of [(2BB)Cu^I]⁺ and the related solvent-coordinated [(2BB)Cu^I(H₂O)]⁺ were optimized, and their main geometrical parameters are shown in Table S11. Initial optimization was probed with [(2BB)Cu^I]⁺ and subsequently tested with one H₂O ligand, revealing that the nitrogen atoms are maintained in a planar configuration. In the resulting [(2BB)Cu^I(H₂O)]⁺, the cuprous center should be defined as four-coordinate but the calculated distance of the nitrogen atom from the central amine to the Cu⁺ ion is considerably longer than in the absence of a bound H₂O (2.407 vs 2.940 Å).

Redox Properties. The redox potentials for [(2BB)-Cu^{II/I}]^{2+/+}, [(2BB)Cu(CH₃CN)^{II/I}]^{2+/+}, and [(2BB)-Cu(H₂O)^{II/I}]^{2+/+} couples were estimated by simulating the oxidation process in an acetonitrile solution and referenced to the ferrocenium/ferrocene couple.³¹ The calculated potential for trigonal [(2BB)Cu^{II/I}]^{2+/+} was 219 mV, which differs significantly from that calculated with one coordinated molecule of acetonitrile (−135 mV) or water (−305 mV). Since the latter values with solvent coordinated to the copper centers are reasonably close to the experimentally determined data in acetonitrile solution (*E*_{1/2} = −272 mV), solvent coordination seems to be plausible. In all cases, redox pairs involve a metal-centered process, i.e., the Cu^{II/I} couple.

Dimeric Species. During our attempts to detect copper–oxygen species that may be responsible for the oxidation of cellobiose, the main candidates are the dicopper(II) species [(2BB)Cu^{II}]₂(μ-η²:η²-O₂)²⁺ and derivatives having acetate co-ligands. Since several geometries for Cu₂O₂ cores have been described in the literature,^{10,28–30} different conformations of the ligands were considered in the molecular optimization of

Table 2. Product Distribution in Cellobiose Degradation Reactions (% Yield by HPLC Integration Relative to Cellobiose)

conditions	assignment			
	cellobiose degradation		glucose degradation	
	O ₂ + Cu(I) + 10 equiv sodium ascorbate (H ₂ O)	H ₂ O ₂ /Et ₃ N + Cu(II) (CH ₃ CN)	H ₂ O ₂ /Et ₃ N + Cu(II) (PB)	H ₂ O ₂ /Et ₃ N + Cu(II) (PB)
% [Na + cellobiose] ⁺	65	8		
% [Na + cellobiose-2OH] ⁺	28	70		
% [Na + glucose] ⁺				13
% [2Na + gluconate] ⁺	5	3	2	1
X% [doubly oxidized glucose + H] ⁺			18	14
% [oxidized glucose + cellobiose + H] ⁺			15	33
% [Na + doubly oxidized glucose + 2H ₂ O] ⁺			37	
% [Na + glucose aldehyde] ⁺			10	5

Table 3. Free Energies of Formation of [(2BB)Cu^I(S)]⁺ and [(2BB)Cu^{II}(S)]²⁺ with S = H₂O or CH₃CN

reactions	ΔG (gas phase)	ΔG (CH ₃ CN)
[(2BB)Cu] ⁺ + CH ₃ CN → [(2BB)Cu(CH ₃ CN)] ⁺	−11.2	−4.8
[(2BB)Cu] ²⁺ + CH ₃ CN → [(2BB)Cu(CH ₃ CN)] ²⁺	−30.9	−16.8
[(2BB)Cu] ⁺ + H ₂ O → [(2BB)Cu(H ₂ O)] ⁺	−8.9	−3.1
[(2BB)Cu] ²⁺ + H ₂ O → [(2BB)Cu(H ₂ O)] ²⁺	−26.6	−19.0

dicopper species (Figure S21). Their relative energies in acetonitrile were calculated (Table S12) and, as expected, the bimetallic complexes were found to be more stable than the mononuclear T-shape Cu(I) complex by more than 20 kcal mol^{−1} in CH₃CN. Nevertheless, the presence of acetate modifies the dioxygen coordination around the metal centers, predicting the additional species [(2BB)Cu^{II}]₂(μ-η¹:η¹-O₂)(μ-AcO)]⁺.

UV–vis spectra were calculated for complexes with and without acetate as co-ligand (Figure S22). Apparently, coordination of a bridging acetate does not alter the main electronic transitions in the bimetallic complexes. For [(2BB)Cu^{II}]₂(μ-η²:η²-O₂)²⁺, an intense band around 330 nm with a 2BB to dioxygen charge-transfer character was calculated, together with a weaker one at 420 nm having an MLCT character; the first band is consistent with the experimentally observed absorption at 365 nm. For optimized [(2BB)Cu^{II}]₂(μ-η¹:η¹-O₂)(μ-AcO)]⁺ in Figure S21 (species D), a medium intensity band is predicted at 420 nm, although the one predicted at around 650 nm is not observed experimentally (Figures S22 and S23); assignment of [(2BB)Cu^{II}]₂(μ-η¹:η¹-O₂)(μ-AcO)]⁺ is only tentative without experimental verification.

CONCLUSIONS

[(2BB)Cu^I]⁺ acts as a structural and electronic model of the reduced site of LPMO enzymes. Speciation studies at different pH values, together with electrochemical and mass spectrometry measurements at pH 9.0–10.5, allow us to establish that the pK_a of water molecules bound to 2BB-coordinated cupric centers is lower than that of the ligand-based amine moiety; this observation is relevant to the enzymatic system, where the proposed deprotonation of the amine of the histidine brace appears to be precluded.

Oxidative cleavage of cellobiose, which was employed as a model polysaccharide substrate, could be effected in the presence of [(2BB)Cu^I]⁺ or [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂]²⁺ under appropriate conditions. Clear identification of a copper–oxygen species responsible for the C–H activation that leads to the oxidative cleavage of cellobiose was not possible via low-temperature UV–vis absorption, MS, Raman, or EPR spectroscopic methods in CH₃CN or PB. However, the detection of potential reactive intermediates by ESI-MS, as well as [(2BB)Cu^{II}(OH)(H₂O)]⁺ as the common end product, provides some clues regarding the mechanistic possibilities outlined in Scheme 2.

Moreover, when a more reduced source of the oxidizing agent is provided in our system (i.e., H₂O₂ vs O₂), more degradation of cellobiose was observed by HPLC-MS on a preparative scale, at a cost of lower selectivity. This is consistent with the tentative mechanisms that have been proposed for LPMOs, which imply Cu(I)/H₂O₂ as the most competent combination³² and H₂O₂ as the natural oxidant for polysaccharide degradation.⁶ Nonetheless, identification of the reactive copper–oxygen species involved in the key C–H

activations remains a major challenge in copper bioinorganic chemistry.

EXPERIMENTAL SECTION

All synthetic procedures were performed under a dry dinitrogen atmosphere in a glovebox or by conventional Schlenk techniques. THF and diethyl ether were obtained by oxygen- and water-free distilling from sodium benzophenone under a N₂ atmosphere; acetonitrile was distilled from CaH₂. Reagents were purchased from commercial suppliers and used as received; 2BB^{10b,13} and [(2BB)Cu^{II}(H₂O)₂](OTf)₂^{14,15} were synthesized according to literature procedures. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a JEOL Eclipse 300 or a Bruker Avance DRX spectrometer at 300 and 75 MHz or 500 and 125 MHz, respectively, using the residual protiated solvent signal or TMS as internal references (TMS δ = 0.00, CHCl₃ δ = 7.26 ppm). Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) experiments were performed with a JEOL JMS-AXS05SHA spectrometer. Positive-ion FAB⁺ mass spectra were acquired using a JEOL JMS-SX-102A mass spectrometer operated at an accelerating voltage of 10 kV from a nitrobenzyl alcohol matrix by using xenon atoms at 6 keV. Cryospray ionization mass spectra were recorded on a Bruker MicrOTOF-Q II instrument at Serveis Tècnics of the University of Girona. Samples were introduced into the mass spectrometer ion source by direct infusion using a syringe pump and were externally calibrated using sodium formate. A cryospray attachment was used. Temperature of the nebulizing and drying gases was set at −30 °C. The instrument was operated in both positive- and negative-ion modes.

X-ray Crystallography. A single crystal of [(2BB)Cu^I]-OTf mounted on a glass fiber was studied with an Oxford Diffraction Gemini “A” diffractometer and a CCD area detector (λ_{MoKα} = 0.71073 Å, monochromator: graphite) source equipped with a sealed tube X-ray source at 130 K. Unit cell constants were determined with a set of 15/3 narrow frame/run (1° in ω) scans. A data set consisted of 235 frames of intensity data collected and a crystal-to-detector distance of 55.00 mm. The double pass method of scanning was used to exclude any noise. The collected frames were integrated by using an orientation matrix determined from the narrow frame scans. CrysAlisPro and CrysAlis RED software packages were used for data collection and data integration.³³ Analysis of the integrated data did not reveal any decay. Final cell constants were determined by a global refinement of 12 733 reflections (θ < 29.51°). Collected data were corrected for absorption by using analytical numeric absorption correction using a multifaceted crystal model based on expressions upon the Laue symmetry using equivalent reflections.³⁴ Structure solution and refinement were carried out with SHELXS-2014^{35a} and SHELXL-2014;^{35b} WinGX v2014.1 software³⁶ was used to prepare material for publication. Full-matrix least-squares refinement was carried out by minimizing (F_o² − F_c²)². All nonhydrogen atoms were refined anisotropically. The H atom of the amine group (H–N) was located in the difference

map and refined isotropically with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2$ for H–N. H atoms attached to C atoms were placed in geometrically idealized positions and refined as riding on their parent atoms, with C–H = 0.95–0.99 Å and with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$ for aromatic and methylene groups and $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{eq}}(\text{C})$ for methyl groups. A summary of crystallographic data is presented in Tables S1–S3, Supporting Information. Crystallographic data have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre CCDC 1821707.

Computational Details. Unrestricted calculations were carried out using the Gaussian 09 package.³⁷ The hybrid density functional method known as B3LYP was applied.³⁸ Effective core potentials were used to represent the innermost electrons of the transition-metal atoms and the valence double- ζ quality basis set LANL2DZ associated with the pseudopotentials.³⁹ The basis set used for the main group elements was 6-31G*.⁴⁰ Solvent effects were taken into account through PCM calculations (acetonitrile, $\epsilon = 36.64$ and water, $\epsilon = 78.3553$)⁴¹ by using the geometries optimized for the gas phase (single-point calculations). Gibbs free energies in solution were calculated from a thermodynamic cycle of the chemical process by adding solvent effects. Redox potentials were estimated from these solvent calculations by using as reference a value of 5.08 V for the absolute standard hydrogen electrode (SHE) in acetonitrile.⁴² The geometrical parameters were analyzed using the SHAPE program.⁴³

Vertical excitation energies were obtained from TD-DFT, as implemented in Gaussian 09 in the presence of solvent (acetonitrile). Calculations were performed at the same computational level as singlet states for the dimeric species, using the broken-symmetry approach. Closed-shell singlet and triplet states were also calculated, with small differences.

Electrochemistry. Cyclic voltammetry measurements were made under N_2 in anhydrous CH_3CN , carbonate buffer solution at pH 10.5, or phosphate buffer solutions at pH = 5.0, 7.0, and 9.0, with a CH Instruments potentiostat–galvanostat equipped with a glassy carbon working electrode and a platinum wire auxiliary electrode. Potentials were recorded versus a pseudoreference electrode of $\text{AgBr}(\text{s})/\text{Ag}(\text{wire})$ immersed in 0.1 M NBu_4Br acetonitrile or distilled water solutions. All voltammograms were started from the current null potential ($E_i = 0$) and were scanned in both directions, positive and negative, and obtained at scan rates of 0.10 and 0.20 V s^{-1} . In agreement with IUPAC convention, the voltammogram of the ferrocenium-ferrocene (Fc^+/Fc) system³¹ was obtained to establish the values of half wave potentials ($E_{1/2}$) from the expression $E_{1/2} = (E_a + E_c)/2$. To obtain the normalized current for each complex, the measured current was divided by the exact molar concentration of the electroactive species.

Solution Studies. For potentiometric titrations, the electrode was calibrated in water, using standard buffers at 25 °C. Commercial 0.1 M NaOH standard solutions were employed, after determination of carbonates present using the Gran Method, ensuring that their concentration was below 5%. The solution of HNO_3 at 8 mM concentration was prepared directly from concentrated acid. Potassium biphthalate was used as an internal standard (oven vacuum-drying 24 h prior to use).

The analytes **2BB** and of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ were acidified in a 1:8 ratio with respect to HNO_3 to ensure complete protonation, maintaining in each case a concentration of $1.21 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. The solutions were maintained

in a special cell at 25 °C, stirred under a nitrogen atmosphere, controlling the ionic strength at 0.1 M with NaNO_3 under homogeneous conditions. Potentiometric data were obtained in triplicate for acid, base, internal standard, and analytes using a 702SM Titrimo automatic titrator and TIAMO1.3 software; for each triplicate, the standard deviation was determined and the final values were averaged. Hyperquad¹⁸ was employed to simulate the data obtained, so that the constants adjusted the model with χ^2 lower than 12.6 with 95% confidence and the species distribution was determined with MEDUSA.¹⁹

Synthesis of $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$. In an inert atmosphere glovebox, **2BB** (100 mg, 0.30 mmol) and $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{NCCH}_3)_4]\text{OTf}$ (113 mg, 0.30 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous CH_3CN ; after 3 h, volatiles were evaporated under reduced pressure and the solid obtained was washed with 10 mL of anhydrous diethyl ether to afford colorless microcrystalline $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ (39 mg): Yield: 24%; mp 150–152 °C; ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 7.64 (s, 5H, Ar), δ 7.24 (s, 1H, Ar), δ 7.06 (p, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 5H, Ar), δ 4.97 (dd, $J = 13.4, 3.3 \text{ Hz}$, 1H, NH), δ 3.42 (m, 7H, *N*-methyl), δ 3.21 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}-$), δ 3.01 (dt, $J = 40.4, 20.2 \text{ Hz}$, 4H, $\text{CH}_2\text{C}-$); ESI-MS m/z : $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]^+ = 396$, $[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}(\text{OTf})]^+ = 545$; UV–vis (CH_3CN): 264 (1744), 270 (1577), 282 (7044); IR (KBr): 3273, 2957, 2906, 2852, 1614, 1503, 1481, 1452, 1410, 1327, 1257, 1227, 1147, 1067, 1027, 974, 936, 850, 825, 750, 656, 633, 570, 515, 455, 434; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{CuF}_3\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: C, 46.28; H, 4.07; N, 12.85; found: C, 46.71; H, 4.15; N, 12.75.

Reactivity Studies. The reactivity studies that were carried out with the **2BB**-copper complexes were monitored by UV–vis, ESI-MS, and EPR:

For UV–vis, a 0.3 mM concentration solution of the complex under study was prepared, 2.5 mL was transferred to a 1 cm optical path cell (Schlenk type in the case of cuprous complex, which was sealed with a rubber septum). The cell was transferred to a precooled cryostat and chilled to 243 or 273 K, depending on the solvent used (CH_3CN , PB pH 7.0), with 10 min allowed for equilibration prior to reaction. Oxygenation of the cuprous complex was achieved by gently bubbling dioxygen through the solution using a long needle for 50 s; addition of KO_2 , H_2O_2 35%, or $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ dissolved in CH_3CN , H_2O , or a $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ mixture (2:3) was performed with 1 equiv of the oxidizing agent in 2 μL of solvent. The stability of the formed species was monitored every 5 min over a period of an hour by measuring the absorbance. Reversibility of each generated system was also determined by bubbling Ar through the solution for 50 s using a long needle. Once the copper–oxygen species was formed, 10 equiv of cellobiose as a substrate was added while stirring in 20 μL of water or a 2:3 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ mixture; the samples were monitored every 5 min over a period of 40 min by measuring the absorbance. The same samples were injected in ESI-MS spectrometers under appropriate conditions.

Characterization by X-band electron spin resonance (EPR) spectroscopy was undertaken in frozen acetonitrile or PB pH 7.0/glycerol. Two hundred microliters of a 3 mM stock solution of the cuprous or cupric complex in CH_3CN or PB/glycerol were placed in quartz EPR tubes ($[(2\text{BB})\text{Cu}^{\text{I}}]\text{OTf}$ was prepared in a dinitrogen-filled glovebox) and were sealed with rubber septa. Samples were frozen in liquid nitrogen before acquisition at 77 K for CH_3CN and PB/glycerol. The tubes were warmed in ice (273 for PB solution) or ice/acetone (243 K for CH_3CN solution) baths until the samples became

fluid. Oxygenation of cuprous complexes was achieved by bubbling O_2 through the solutions using a long needle for 50 s. The oxidizing agents used were as follows: KO_2 in 1:1 methanol/acetonitrile or H_2O ; H_2O_2 , or H_2O_2/Et_3N , maintaining 1 equiv of the oxidizing agent in 2 μL of solution. After addition, spectra were acquired again at 77 or 133 K, respectively. After formation of copper–oxygen species, 10 equiv of cellobiose dissolved in 20 μL of water or a 2:3 MeOH/ CH_3CN mixture was added and the spectra were acquired again at 77 K. In situ generation of the Cu(I) complex from $[(2BB)Cu^{II}(H_2O)_2](OTf)_2$ was achieved by adding 1.2 equiv of sodium ascorbate in 20 μL of distilled water or a 2:3 MeOH/ CH_3CN mixture.

Raman spectra at 355 and 405 nm were recorded at $-30^\circ C$ (QNW temperature control cell holder) and room temperature. Raman spectra recorded at 355 (10 mW Cobalt lasers) and 457 (50 mW Cobalt lasers) nm used a home-built system in which the laser was focused on the sample in a 180° backscattering arrangement and Raman scattering was collected, collimated, and subsequently refocused via a pair of 2.5 cm diameter planoconvex lens ($f = 15$ and 10 cm, respectively). The collected light was filtered by an appropriate long pass edge filter (Semrock) and dispersed by a Shamrock500i spectrograph (slit width 80 μm , Andor Technology) with a 2400 L/mm grating blazed at 300 nm and a Shamrock300i spectrograph (slit width 80 μm , Andor Technology) with a 1200 L/mm grating blazed at 500 nm, respectively. Data were recorded using Andor Solis (Andor Technology) with spectral calibration performed using the Raman spectrum of acetonitrile/toluene 50:50 (v/v).⁴⁴ Samples were held in quartz 1 cm path length cuvettes. Spectra analysis and processing was performed using the program Spectragryph 1.2.11.⁴⁵

Preparative Scale Cellobiose and Glucose Degradation. Studies were carried out with 3 mL of 2BB–Cu complexes and 10 equiv of oxidizing agent or 1 atmosphere of O_2 at 273 K (PB) or 243 K (CH_3CN) and 10 equiv of cellobiose or glucose in 1 mL of distilled water. The mixtures were stirred for 2 h prior to characterization by HPLC-MS with an Agilent 1200 infinity Q-ToF spectrometer equipped with a Poroshell 120 column.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsomega.9b00785.

Materials, spectroscopic data, and methods; electrospray mass spectrum; summary of crystallographic data; bond lengths; cyclic voltammograms; UV–vis spectrum; general procedure for sample preparations in reactivity studies (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: joseivan@unam.mx.

ORCID

Gabriel Aullón: 0000-0001-7519-4522

Anna Company: 0000-0003-4845-4418

Wesley R. Browne: 0000-0001-5063-6961

Ivan Castillo: 0000-0002-4876-4339

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Carmen Márquez and Lucero Ríos for mass spectrometry, María de la Paz Orta for combustion analysis, Rocío Patiño for IR, and Virginia Gómez-Vidales for EPR determinations; G.A. and P.R.M.A. acknowledge IQTC-UB for computational resources; AC MINECO Spain CTQ2016-77989-P; A.C.N., E.N., and I.C., the Swedish Research Council (2014-0429); J.C., the Chinese Scholarship Council; J.B.K. and W.R.B., the Netherlands Ministry of Education, Culture and Science (Gravity Program 024.001.035); A.C.N. and I.C., DGAPA-PAPIIT (IN210214 and IN203317), CONACyT (Beca 293842), and CONACyT-ANUIES (ECOS 291247) for financial support.

■ REFERENCES

- (1) (a) Phillips, C. M.; Beeson, W. T., IV; Cate, J. H.; Marletta, M. A. Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1399. (b) Beeson, W. T.; Phillips, C. M.; Cate, J. H. D.; Marletta, M. A. Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 890.
- (2) (a) Quinlan, R. J.; Sweeney, M. D.; Lo Leggio, L.; Otten, H.; Poulsen, J.-C. N.; Johansen, K. S.; Krogh, K. B. R. M.; Jorgensen, C. I.; Tovborg, M.; Anthonen, A.; Tryfona, T.; Walter, C. P.; Dupree, P.; Xu, F.; Davies, G. J.; Walton, P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 15079. (b) Hemsworth, G. R.; Taylor, E. J.; Kim, R. Q.; Gregory, R. C.; Lewis, S. J.; Turkenburg, J. P.; Parkin, A.; Davies, G. J.; Walton, P. H. The Copper Active Site of CBM33 Polysaccharide Oxygenses. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6069. (c) Hemsworth, G. R.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Walton, P. H. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 122.
- (3) (a) Lieberman, R. L.; Rosenzweig, A. C. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **2005**, *434*, 177. (b) Balasubramanian, R.; Smith, S. M.; Rawat, S.; Yatsunyk, L. A.; Stemmler, T. L.; Rosenzweig, A. C. Oxidation of methane by a biological dicopper centre. *Nature* **2010**, *465*, 115.
- (4) Frandsen, K. E. H.; Simmons, T. J.; Dupree, P.; Poulsen, J.-C. N.; Hemsworth, G. R.; Ciano, L.; Johnston, E. M.; Tovborg, M.; Johansen, K. S.; von Freiesleben, P.; Marmuse, L.; Fort, S.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Henrissat, B.; Lenfant, N.; Tuna, F.; Baldansuren, A.; Davies, G. J.; Lo Leggio, L.; Walton, P. H. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 298.
- (5) Kjaergaard, C. H.; Qayyum, M. F.; Wong, S. D.; Xu, F.; Hemsworth, G. R.; Walton, D. J.; Young, N. A.; Davies, G. J.; Walton, P. H.; Johansen, K. S.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I. Spectroscopic and computational insight into the activation of O_2 by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 8797.
- (6) Bissaro, B.; Rohr, A. K.; Muller, G.; Chylenski, P.; Skaugen, M.; Forsberg, Z.; Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V. G. H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H_2O_2 . *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 1123.

- (7) (a) Neisen, B. D.; Gagnon, N. L.; Dhar, D.; Spaeth, A. D.; Tolman, W. B. Formally Copper(III)–Alkylperoxo Complexes as Models of Possible Intermediates in Monooxygenase Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10220. (b) Concia, A. L.; Beccia, M. R.; Orio, M.; Ferre, F. T.; Scarpellini, M.; Biaso, F.; Guigliarelli, B.; Réglier, M.; Simaan, A. J. Copper Complexes as Bioinspired Models for Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 1023. (c) Muthuramalingam, S.; Maheshwaran, D.; Velusamy, M.; Mayilmurugan, R. Regioselective oxidative carbon-oxygen bond cleavage catalysed by copper(II) complexes: A relevant model study for lytic polysaccharides monooxygenases activity. *J. Catal.* **2019**, *372*, 352.
- (8) (a) Itoh, S. Developing Mononuclear Copper–Active-Oxygen Complexes Relevant to Reactive Intermediates of Biological Oxidation Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2066. (b) Quist, D. A.; Díaz, D. E.; Liu, J. J.; Karlin, K. D. Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 253.
- (9) (a) Thompson, L. K.; Ramaswamy, B. S.; Dawe, R. D. Nickel(II) and copper(II) complexes of the ‘tripod’ ligand tris(2-benzimidazolymethyl)amine. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1311. (b) Addison, A. W.; Hendriks, H. M. J.; Reedijk, J.; Thompson, L. K. Copper complexes of the “tripod” ligand tris(2-benzimidazolymethyl)amine: five- and six-coordinate copper(II) derivatives and some copper(I) derivatives. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 103. (c) Balamurugan, R.; Palaniandavar, M.; Gopalan, R. S. Trigonal planar copper(I) complex: synthesis, structure, and spectra of a redox pair of novel copper(II/I) complexes of tridentate bis(benzimidazol-2'-yl) ligand framework as models for electron-transfer copper proteins. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2246. (d) Vaidyanathan, M.; Balamurugan, R.; Sivaganesan, U.; Palaniandavar, M. Synthesis, structure, spectra and redox of Cu(II) complexes of chelating bis(benzimidazole)—thioether ligands as models for electron transfer blue copper proteins. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 3498. (e) Seo, M. S.; Kim, N. H.; Cho, K.-B.; So, J. E.; Park, S. K.; Clémancey, M.; Garcia-Serres, R.; Latour, J.-M.; Shaik, S.; Nam, W. A mononuclear nonheme iron(IV)=oxo complex which is more reactive than cytochrome P450 model compound I. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1039.
- (10) (a) Casella, L.; Gullotti, M.; Radaelli, R.; Di Gennaro, P. A tyrosinase model system. Phenol ortho-hydroxylation by a binuclear three-coordinate copper(I) complex and dioxygen. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1611. (b) Casella, L.; Monzani, E.; Gullotti, M.; Gliubich, F.; De Gioia, L. Cytochrome c oxidase models: synthesis and reactivity of iron(III)–copper(II) complexes of deuterohaemin–polybenzimidazole dinucleating ligands. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 3203. (c) Casella, L.; Monzani, E.; Gullotti, M.; Cavnagnino, D.; Cerina, G.; Santagostini, L.; Ugo, R. Functional Modeling of Tyrosinase. Mechanism of Phenol ortho-Hydroxylation by Dinuclear Copper Complexes. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7516. (d) Garcia-Bosch, I.; Company, A.; Frisch, J. R.; Torrent-Sucarrat, M.; Cardellach, M.; Gamba, I.; Güell, M.; Casella, L.; Que, L., Jr.; Ribas, X.; Luis, J. M.; Costas, M. O₂ Activation and Selective Phenolate ortho Hydroxylation by an Unsymmetric Dicopper μ - η : η :1-Peroxo Complex. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2406.
- (11) (a) Rodríguez Solano, L. A.; Aguiñiga, I.; López-Ortiz, M.; Tiburcio, R.; Luviano, A.; Regla, I.; Santiago-Osorio, E.; Ugalde-Saldivar, V. M.; Toscano, R. A.; Castillo, I. Bis(2-methylbenzimidazolyl)amine-Derived Copper Complexes and Their Antineoplastic Activity. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 3454. (b) Castillo, I.; Ugalde-Saldivar, V. M.; Rodríguez Solano, L. A.; Sánchez Eguía, B. N.; Zeglio, E.; Nordlander, E. Structural, spectroscopic, and electrochemical properties of tri- and tetradentate N₃ and N₃S copper complexes with mixed benzimidazole/thioether donors. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 9394. (c) Martínez-Alanis, P. R.; Sánchez-Eguía, B. N.; Ugalde-Saldivar, V. M.; Regla, I.; Demare, P.; Aullón, G.; Castillo, I. Copper Versus Thioether-Centered Oxidation: Mechanistic Insights into the Non-Innocent Redox Behavior of Tripodal Benzimidazolylaminothioether Ligands. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 6067. (d) Sánchez-Eguía, B. N.; Flores-Alamo, M.; Orio, M.; Castillo, I. Side-on cupric-superoxo triplet complexes as competent agents for H-abstraction relevant to the active site of PHM. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11134.
- (12) Bacik, J.-P.; Mekasha, S.; Forsberg, Z.; Kovalevsky, A. Y.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijssink, V. G. H.; Nix, J. C.; Coates, L.; Cuneo, M. J.; Unkefer, C. J.; Chen, J. C. Neutron and Atomic Resolution X-ray Structures of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Reveal Copper-Mediated Dioxygen Binding and Evidence for N-Terminal Deprotonation. *Biochemistry* **2017**, *56*, 2529.
- (13) Sorrell, T. N.; Vankai, V. A.; Garrity, M. L. Synthesis and reactivity of dinuclear copper complexes having a m-xylyl spacer between coordination units. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 207.
- (14) Casella, L.; Carugo, O.; Gullotti, M.; Doldi, S.; Frassoni, M. Synthesis, Structure, and Reactivity of model complexes of copper nitrite reductase. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1101.
- (15) Castillo, I.; Neira, A. C.; Nordlander, E.; Zeglio, E. Bis(benzimidazolyl)amine copper complexes with a synthetic ‘histidine brace’ structural motif relevant to polysaccharide monooxygenases. *Inorg. Chim. Acta.* **2014**, *422*, 152.
- (16) Frandsen, K. E. H.; Poulsen, J.-C. N.; Tandrup, T.; Lo Leggio, L. Unliganded and substrate bound structures of the cellobiosaccharide active lytic polysaccharide monooxygenase LsAA9A at low pH. *Carbohydrate Res.* **2017**, *448*, 187.
- (17) (a) Lane, T. J.; Quinlan, R. Metal binding of the benzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2994. (b) Davies, M. T.; Mamalis, P.; Petrow, V.; Sturgeon, B. J. The preparation and spectrographic properties of some benzimidazole-cobalt coordination compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* **1951**, *3*, 420.
- (18) 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.
- (19) Puigdomenech, I. *MEDUSA: Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms*; KTH, Stockholm, 2009.
- (20) Martin, R. B. Pyrrole hydrogen ionization of imidazole derivatives in metal ion complexes and carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 4346.
- (21) (a) Miyamoto, T.; Kamino, S.; Odani, A.; Hiromura, M.; Enomoto, S. Basicity of N-Terminal amine in ATCUN peptide regulates stability constant of albumin-like Cu²⁺ complex. *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 1099. (b) Kandemir, B.; Kubie, L.; Guo, Y.; Sheldon, B.; Bren, K. L. Hydrogen evolution from water under aerobic conditions catalyzed by a cobalt ATCUN Metallopeptide. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 1355.
- (22) Caldararu, O.; Oksanen, E.; Ryde, U.; Hedegard, E. D. Mechanism of hydrogen peroxide formation by lytic polysaccharide monooxygenase. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 576.
- (23) (a) Mukherjee, J.; Balamurugan, V.; Hundal, M. S.; Mukherjee, R. Fixation of CO₂ in air: synthesis and crystal structure of a μ -CO₃²⁻ bridged tricopper(II) compound. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117*, 111. (b) Das, B.; Bhadhbade, M.; Thapper, A.; Ling, C. D.; Colbran, S. B. A new tri-nuclear Cu-carbonate cluster utilizing CO₂ as a C1-building block – reactive intermediates, a probable mechanism, and EPR and magnetic studies. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 3576.
- (24) Fujii, T.; Yamaguchi, S.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Tosha, T.; Kitagawa, T.; Masuda, H. Mononuclear copper(II)–hydroperoxo complex derived from reaction of copper(I) complex with dioxygen as a model of D β M and PHM. *Chem. Commun.* **2006**, 4428.
- (25) Wada, A.; Harata, M.; Hasegawa, K.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Mukai, M.; Kitagawa, T.; Einaga, H. Structural and Spectroscopic Characterization of a Mononuclear Hydroperoxo-Copper(II) Complex with Tripodal Pyridylamine Ligands. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 798.
- (26) (a) Koder, M.; Kita, T.; Miura, I.; Nakayama, N.; Kawata, T.; Kano, K.; Hirota, S. Hydroperoxo–Copper(II) Complex Stabilized by N₃S-Type Ligand Having a Phenyl Thioether. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7715. (b) Maiti, D.; Lucas, H. R.; Narducci Sarjeant, A. A.; Karlin, K. D. Aryl Hydroxylation from a Mononuclear Copper-Hydroperoxo Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6998.
- (27) Donoghue, P. J.; Tehranchi, J.; Cramer, C. J.; Sarangi, R.; Solomon, E. I.; Tolman, W. B. Rapid C–H Bond Activation by a

Monocopper(III)–Hydroxide Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17602.

(28) (a) Baldwin, M. J.; Root, D. E.; Pate, J. E.; Fujisawa, K.; Kitajima, N.; Solomon, E. I. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper(II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10421. (b) Pidcock, E.; Obias, H. V.; Abe, M.; Liang, H.-C.; Karlin, K. D.; Solomon, E. I. Spectroscopic and Theoretical Studies of Oxygenated Dicopper(I) Complexes Containing Hydrocarbon-Linked Bis[2-(2-pyridyl)ethyl]amine Units: Investigation of a Butterfly $[\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2)(\text{O}_2)]^{2+}$ Core. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1299.

(29) Ottenwaelde, X.; Rudd, D. J.; Corbett, M. C.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Stack, T. D. P. Reversible O–O bond cleavage in copper-dioxygen isomers: impact of anion basicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9268.

(30) Funahashi, Y.; Nishikawa, T.; Wasada-Tsutsui, Y.; Kajita, Y.; Yamaguchi, S.; Arai, H.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Tosha, T.; Hirota, S.; Kitagawa, T.; Masuda, H. Formation of a Bridged butterfly-type $\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2$ -peroxo dicopper core structure with a carboxylate group. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16444.

(31) Gagne, R. R.; Koval, C. A.; Lisensky, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2854.

(32) Walton, P. H.; Davies, G. J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monoxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *31*, 195.

(33) *CrysAlis PRO*; Agilent Technologies Ltd: Yarnton, Oxfordshire, England, 2013.

(34) Clark, R. C.; Reid, J. S. The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **1995**, *51*, 887.

(35) (a) Sheldrick, G. M. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Adv.* **2015**, *71*, 3. (b) Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.* **2015**, *71*, 3–8.

(36) Farrugia, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837.

(37) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, revision A.02; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2016.

(38) (a) Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648. (b) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.

(39) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299.

(40) (a) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta.* **1973**, *28*, 213. (b) Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Gordon, M. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A. Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row elements. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654.

(41) (a) Tomasi, J.; Persico, M. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027. (b) Amovilli, C.; Barone, V.; Cammi, R.; Cancès, E.; Cossi, M.; Mennucci, B.; Pomelli, C. S.; Tomasi, J. Recent advances in the description of solvent effects with the polarizable continuum model. *Adv. Quantum Chem.* **1998**, *32*, 227.

(42) (a) Trasatti, S. The absolute electrode potential: an explanatory note (Recommendations 1986). *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 955. (b) Persson, I. Solvation and complex formation in strongly solvating solvents. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 1153.

(43) Llunell, M.; Casanova, D.; Cirera, J.; Alemany, P.; Alvarez, S. *SHAPE*, version 2.0; Barcelona, 2010.

(44) McCreery, R. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; John Wiley & sons, Inc.: New York, 2000; Chapter 10.

(45) <https://www.effemm2.de/spectragraph/>.



Cite this: DOI: 10.1039/c9dt01726g

Ascorbyl and hydroxyl radical generation mediated by a copper complex adsorbed on gold†

Adolfo I. B. Romo, ^a Vitória S. Dibo, ^a Dieric S. Abreu, ^{a,b} Marta S. P. Carepo, ^{a,c} Andrea C. Neira, ^d Ivan Castillo, ^d Luis Lemus, ^e Otaciro R. Nascimento, ^f Paul V. Bernhardt, ^g Eduardo H. S. Sousa ^a and Izaura C. N. Diógenes ^{*a}

This work presents the results obtained for a thioether derivative of bipyridine, (*E,Z*)-1-(4'-methyl-[2,2'-bipyridine]-4-yl)-*N*-(4(methylthio)phenyl)methanimine (4-mbpy-Bz-SMe), and its copper complex [Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺. Electronic spectra acquired at 183 K of the cuprous complex [Cu^I(4-mbpy-Bz-SMe)₂]⁺ generated *in situ* indicated the formation of the peroxodicopper compound {[Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂](μ-O₂²⁻)]²⁺. A gold electrode modified with [Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ (Au/[Cu]) was fully characterized by SERS spectroscopy, electrochemistry and impedance spectroscopy thus showing adsorption occurs through the sulfur atom of the 4-mbpy-Bz-SMe moieties. DNA cleavage assays showed the copper complex, in solution and adsorbed on gold, degrades DNA if reducing conditions are maintained, *i.e.* ascorbic acid (H₂AA) in solution or applied potentials more negative than 0.12 V vs. Ag/AgCl (Cu^I form). The electron paramagnetic resonance (EPR) spectra obtained for the electrolyzed solution (*E*_{ap1} = −0.2 V, no H₂O₂) and for the solution containing [Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ and H₂O₂ showed hydroxyl radical, HO[•], generation had occurred. The cyclic voltammograms obtained with H₂AA in solution at Au/[Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ as the working electrode showed a one-electron reaction leading to the ascorbyl radical (HA[•]), which was detected by EPR. The current assigned to the electrode oxidation of HA[•] to AA decreased with the addition of catalase, a scavenger of H₂O₂, meaning peroxide is involved in the mechanism.

Received 24th April 2019,
Accepted 3rd September 2019
DOI: 10.1039/c9dt01726g
rsc.li/dalton

Introduction

As part of our daily life, exposure to noxious compounds (in pollutants, cigarette smoke, *etc.*) can lead to alterations in the homeostatic balance between antioxidant defense systems and the endogenous production of reactive oxygen species (ROS) such

as hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂), hydroxyl (HO[•]) and superoxide (O₂^{•−}) radicals. Such oxidative stress may induce diseases like cancer, arthrosclerosis, Alzheimer's and Parkinson's disease.^{1–3} A relevant source of ROS *in vivo* is from oxidative phosphorylation in mitochondria where DNA is not protected by histones making the DNA-associated proteins easy targets for oxidative damage.⁴ In fact, oxidative stress-induced damage of mitochondrial DNA has been associated with genetic diseases like cancer, which is one of the world's main causes of death.

On the beneficial side of ROS, *i.e.* the destruction of cancer cells, several research groups have been working on the development of new drugs and strategies that can either generate ROS or specifically inhibit the antioxidant defense system in cancer cells, increasing oxygen cytotoxicity and leading to selective cell death.^{5–9} Despite the absence of free transition metal ions in healthy biological systems, it is well-known that, under cellular acidosis or ischemic conditions, they are released. In these conditions, redox active metals such as Fe or Cu may catalyze the production of HO[•] through Fenton¹⁰ or Heber-Weiss¹¹ reactions in which H₂O₂ is converted into the highly reactive HO[•] resulting in the damage of nearby biomolecules.^{12,13} In an attempt to mimic this biological action, coordination compounds containing copper have been proposed^{14–17} as exogenous catalysts for the formation of ROS.

^aDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Cx. Postal 6021, Fortaleza, CE, Brasil, 60451-970. E-mail: izaura@dqoi.ufc.br

^bDepartamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Caixa Postal 6030, Fortaleza, CE, Brasil, 60455-970

^cLAQV, REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal

^dInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, Mexico

^eFacultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Alameda 3363, Estación Central, Santiago, Chile

^fDepartamento de Física Interdisciplinar, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

^gSchool of Chemistry and Molecular Biosciences, University of Queensland, Brisbane, 4072, Australia

†Electronic supplementary information (ESI) available: EPR spectrum, UV-Vis spectra at different temperatures, linear sweep voltammogram, cyclic voltammograms of the modified surface, impedance diagrams and data, emission spectra, DNA cleavage data, cyclic voltammograms in solution containing ascorbic acid, NMR spectra. See DOI: 10.1039/c9dt01726g

Ascorbic acid (H_2AA) has been recognized as a protective agent against oxidative damage in biological systems, although the mechanism is yet not fully understood *in vivo*.^{18,19} The action has been ascribed to the role H_2AA plays as a reducing agent by donating one or two electrons thus avoiding or reversing the oxidation of other species. *In vitro*, the mechanism is well-known²⁰ and involves two sequential steps: the loss of a first electron, yielding the ascorbyl radical ($HA^\bullet$), followed by the loss of a second electron and the production of dehydroascorbic acid (AA). In this work, we have used H_2AA as a redox probe to indirectly show the generation of ROS by a copper complex adsorbed on gold and its capability to cleave DNA. Initially, the discussion will focus on the study of the physicochemical properties of the synthetic copper complex including low-temperature UV-Vis spectra for detection of reactive copper transient species and the characterization of a gold electrode modified with the copper complex. After that, the results obtained from DNA cleavage assays by both the complex in solution and adsorbed on gold will be presented followed by electrochemical and electron paramagnetic resonance (EPR) studies aiming to shed light on the mechanism of ROS production.

Results and discussion

Synthesis and characterizations of $[Cu(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$

Reaction of the Schiff base (*E*)-1-(4'-methyl-[2,2'-bipyridine]-4-yl)-*N*-(4(methylthio)phenyl)methanimine (4-mbpy-Bz-SMe; 2 times in excess) with $Cu(NO_3)_2$ resulted in the complex $[Cu(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$, whose structure is shown in Fig. 1.

Several attempts using different crystallization methods resulted in small green tablet-shaped crystals which, unfortunately, were not suitable for diffraction. Nonetheless, we focus on elucidating the structure of the complex in solution by correlating the electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum with electrochemical, vibrational, and electronic spectroscopic data. The EPR spectrum of $[Cu(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ was measured as a dilute frozen DMF solution (1 mmol L^{-1} , 125 K). The spin Hamiltonian parameters were obtained by computer simulation of the experimental spectrum, which is illustrated in Fig. S1 of the ESI.† The *g* and *A* parameters are typical of a Cu(II) complex in a predominantly axially elongated five-coordinate geometry with additional rhombic distortion ($g_z \gg g_y \sim g_x$, $A_z \gg A_y \sim A_x$) and consistent with a $d_{x^2-y^2}$ electronic ground state. Hyperfine coupling with the Cu nucleus ($I = 3/2$) is resolved in the *z*-direction and the large A_z value (165 G) rules out a trigonal bipyramidal or tetrahedral coordination geometry. The *cis* isomer of the complex is shown in Fig. 1 but, in this case, both *cis* and *trans* isomers appear equally likely and we have no definitive evidence favouring one over the other. The EPR spectroscopy of Cu(II) bipyridine complexes has been thoroughly studied under a variety of conditions and the present spectrum is very similar to that of $[Cu(bipy)_2(ONO_2)](NO_3)$ measured in methanol.²¹ Accordingly, the copper complex presents a five-coordinate geometry whose fifth position is very likely occupied by either a solvent molecule or a coordinated anion as frequently observed in the coordination chemistry of copper.^{22–24} The five-coordinate geometry is reinforced by the conductance data ($\Lambda_M = 137.7\text{ ohm}^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ in CH_3CN at 25 °C), which is consistent with a 1:1 electrolyte composition and the suggested formulation $[Cu(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$.

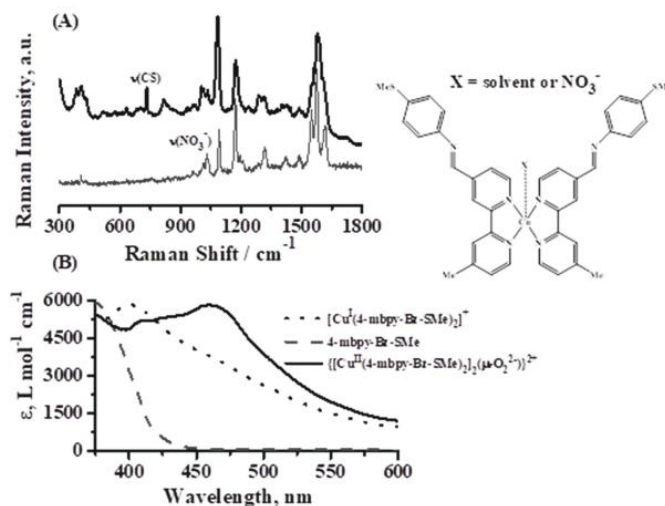


Fig. 1 (A) SERS (black) and normal Raman (dark gray) spectra of $[Cu(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ adsorbed on gold and in the solid state, respectively. $\lambda_0 = 785\text{ nm}$. (B) UV-Vis spectra of the ligand (dashed gray) and $[Cu(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^+$ before (dotted black) and after (solid black) oxygen addition in tetrahydrofuran (THF) solution at 183 K. Right: Proposed molecular structure of $[Cu^{II}(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2(X)]^{n+}$, where the weakly bound axial ligand X may be solvent or counter ion.

SMe)₂(NO₃)](NO₃). In addition, the Raman vibrational spectrum of the copper complex in the solid state, Fig. 1 (dark gray line), shows a band at 1035 cm⁻¹ ascribed²⁵ to the stretching vibrational mode of the NO₃⁻ fragment. From 950 to 1800 cm⁻¹, this spectrum is dominated by the vibrational modes associated to the pyridine rings.^{26,27} The axial coordination sites of square pyramidal Cu(II) complexes always show elongated coordinate bonds due to the Jahn Teller effect and these weakly bound ligands are readily exchanged. So, to avoid confusion throughout the text, in solution the ion complex will be hereafter called [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺.

Variations in the coordination sphere of copper complexes have also been detected by electrochemistry by changing the electrolyte salt.^{22–24} For [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺, the electrochemistry was found to be sensitive not only to the medium but also to the potential window (Fig. S2 of the ESI†). The half-wave potential ($E_{1/2}$) assigned to the Cu^{II/I} redox couple is observed at 0.12 V (all potentials in the text are referenced against Ag/AgCl) with characteristically reversible behavior. When the potential is scanned up to 0.8 V, a second process is observed centered at 0.51 V with a current that is dependent on the copper reduction, *i.e.* it increases upon the reduction of the copper complex. It is worth mentioning that similar behavior is observed for the curves obtained in an anaerobic glove-box (see Fig. S2 of the ESI†). Assuming that the reduction to Cu^I releases the NO₃⁻ ion to achieve a preferred N₄-tetraordinated environment, the anodic wave seen at 0.51 V is tentatively assigned to the Cu^{II/I} redox pair of an aqua- or peroxo-copper(II) complex generated at the interface. To demonstrate the viability of peroxide formation within the coordination sphere, electronic spectra were acquired at 183 K following the addition of oxygen to a solution containing [Cu^I(4-mbpy-Bz-SMe)₂]⁺. The cuprous complex was generated *in situ* in a glove-box under nitrogen atmosphere by adding [Cu(CH₃CN)₄]OTf, (OTf = trifluoromethanesulfonate) to a Schlenk tube containing two equivalents of 4-mbpy-Bz-SMe dissolved in tetrahydrofuran (THF). Fig. 1(B), dotted black curve, shows the UV-Vis spectrum after the formation of [Cu^I(4-mbpy-Bz-SMe)₂]⁺ where the metal-to-ligand charge-transfer (MLCT) transition, Cu^I(dπ) → (4-mbpy-Bz-SMe)(π*), is observed at 400 nm. Upon oxygen addition, solid black curve, the intensity of the absorption at 400 nm decreases while a new peak is observed at 460 nm with a shoulder at 411 nm. Successive spectra acquired while increasing the temperature (Fig. S3 of the ESI†) show the hypsochromic shift of the band at 460 nm to 411 nm. These absorptions are assigned to the ligand-to-metal charge-transfer (LMCT) transition, (O₂²⁻)σ* → Cu^{II}(dσ) of a putative {[Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]₂(μ-O₂²⁻)}²⁺ complex. Indeed, similar behavior has been reported for tripodal peroxodicopper complexes at low temperatures (<195 K).^{28,29} For the complex studied in this work, the N₄ coordination environment provided by the two bipyridine donors must differ significantly from that enforced by tripodal ligands, resulting in the difference in energy for the LMCT band detected at 460 nm. Alternative formulations such as cupric-superoxo or side-on peroxodicopper complexes are not viable, based on the energy of the LMCT band.

Gold surface modified with [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺

It is well-established that thiols and thioethers strongly adsorb on gold surfaces due to the high affinity between gold and sulfur.^{30–35} In this work, polycrystalline gold substrates were spontaneously modified by immersing in ethanolic solutions containing 10.0 μmol L⁻¹ of [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ thus forming the covalently modified Au/[Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ (Au/[Cu]). The SERS spectrum presented in Fig. 1 (A, black line) shows a strong band at 733 cm⁻¹ assigned^{36–38} to the stretching vibrational mode of the CS bond of the 4-mbpy-Bz-SMe moieties; this band is barely perceptible in the normal Raman spectrum of the complex in the solid state (dark gray line). This result indicates adsorption occurs through the sulfur atoms, as commonly reported for the adsorption of sulfur containing molecules.^{22,31,34,39–45} Moreover, the relative enhancement in the SERS spectrum of the CS mode at 733 cm⁻¹ in relation to the vibrational modes associated to the pyridine rings, suggests a non-flat conformation in which the molecules of the complexes are likely tilted in relation to the surface normal.⁴⁶

The reductive desorption of sulfur containing molecules from gold in alkaline medium usually results in an electrode reaction generically described as [Au-SR + e⁻ → Au + [RS]⁻] whose potential (E_{rd}) reflects the strength of the Au-S bond.^{47–49} In addition, integration of the area under the reductive wave (to give the total charge Q_{rd}) allows the calculation of the amount of adsorbed molecules (Γ) according to $\Gamma = (Q_{rd})/(nFA)$, where n is the number of electrons involved in the electrode reaction, F is the Faraday constant and A is the active electrode area. For the gold electrode modified with [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ after 1 h of immersion (Au/[Cu]), the linear sweep voltammetry curve (Fig. S4(A) of the ESI†) presented one wave at -1.0 V from which the Γ value was calculated as 5.3×10^{-10} mol cm⁻². The packing density of the SAM formed with [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ was evaluated by cyclic voltammetry and electrochemical impedance in KF solution containing [Fe(CN)₆]^{3-/4-} as a redox probe species and the results are shown in Fig. S4(B) and (C) and Table S1.† The impedimetric results reflect the difficulty of the probe to access the underlying gold surface with increased immersion time of the electrode in an ethanolic solution of [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺. Based on the values of the electron transfer rate constant and the charge-transfer resistances for the bare and modified gold electrodes, however, saturation of the surface is achieved after 5 min of immersion presenting only about 78% of fractional coverage. The low saturation limit is assigned to lateral repulsion between adjacent complex molecules. Therefore, the redox probe species [Fe(CN)₆]^{3-/4-} are able to diffuse through the pores of the SAM to the underlying gold surface where the electron transfer reaction takes place.

DNA cleavage assays

Copper complexes are well-known inducing agents of DNA nuclease activity through oxidative pathways that include radical production *via* Fenton-like reactions.^{22,50–52} As

observed for other copper complexes containing phenanthroline derivatives, the $[\text{Cu}(\text{4-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ complex indeed was able to affect DNA as can be seen by the relaxing process of supercoiled pBR322 to its nicked form in Fig. 2(A) in presence of ascorbic acid (H_2AA) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Catalase, D-mannitol and superoxide dismutase (SOD) were used as scavengers to protect DNA from H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$, respectively. As can be ascertained from Fig. 2, supercoiled DNA is fully degraded upon the addition of the reducing agent H_2AA to the solution containing the copper complex (Panel A, lane 3). Lanes 5 and 6 present the same profile suggesting that both $\text{OH}^\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ are not involved in the DNA cleavage mechanism since D-mannitol and SOD scavengers were not able to protect DNA. In lane 4, where catalase is present, full degradation is not observed although the plasmid is largely relaxed to Form II evidencing the presence of H_2O_2 in the cleavage mechanism. As expected, lane 7 shows no change in the presence of H_2O_2 but without Cu complex. However, when the copper complex is added to the mixture containing DNA and H_2O_2 (lane 8), without H_2AA , the plasmid is slightly converted to Form II. Similar behavior was observed for $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})]^{2+}$, where 2CP-Bz-SMe = 1,3-bis(1',10'-phenanthroline-2'-yloxy)-N-(4-(methylthio)benzylidene)propan-2-amine, under the same experimental conditions.²² As discussed in that work, and in other papers,^{53–55} the swift reaction of $\text{OH}^\cdot$ combined with the ability of phenanthroline like ligands to intercalate into the minor groove of double stranded DNA makes the lack of protection of D-mannitol and SOD inconclusive towards the production of $\text{OH}^\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals. In other words, hydrogen abstraction from the sugar moieties or nucleobases in DNA occurs before the radical can be trapped by D-mannitol.⁵⁶

Panel (B) of Fig. 2 shows the electrophoresis images following the behavior of supercoiled pBR322 incubated with a gold electrode modified with $[\text{Cu}(\text{4-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ at applied potentials (E_{ap}) of +0.5 V and –0.2 V where the copper complex is fully oxidized (Cu^{II}) and reduced (Cu^{I}), respectively. As can be seen, no DNA cleavage activity is detected in lanes 1 and 2 where the potentials are applied at bare gold electrodes

(no Cu complex). Turning to the modified gold electrodes ($\text{Au}/[\text{Cu}]$) (lanes 3 and 4), DNA cleavage activity is only observed at –0.2 V, which is when the complex is reduced to its Cu^{I} form. Indeed, in aerated aqueous solution, it is well documented^{22,50–52,57} that reoxidation of the reduced copper complexes can generate $\text{HO}^\cdot$ and/or $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals which are able to degrade DNA. Assuming the DNA cleavage activity of copper complexes, in a general sense, is associated with the Fenton reaction (redox half reaction $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{HO}^\cdot$), the redox process of the adsorbed complex studied in this work must generate H_2O_2 *in situ* since no peroxide was added to the solution used to acquire the electrophoresis images shown in Fig. 2(B). In fact, as previously commented, the electrochemistry of the copper complex in solution (non-modified glassy carbon as working electrode, Fig. S2†) presents an oxidation wave at 0.51 V ascribed to the oxidation of a copper complex containing peroxide within the coordination sphere.

EPR spectroscopy was also used to investigate the nature of ROS species produced by the $[\text{Cu}(\text{4-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ complex in solution (Fig. 3, Panel A) and adsorbed on gold (Fig. 3, Panel C). DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide), which is known⁵⁸ to form a long-lived radical adduct in reaction with oxygen-centered radicals, was used as spin trapping reagent. The gold electrode modified with $[\text{Cu}(\text{4-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ was immersed in an electrochemical cell containing aerated KCl solution and DMPO and a potential of –0.2 V was applied to continuously reduce the complex to its Cu^{I} form. Then, aliquots of 150 μL were transferred to a quartz EPR cell after different times of electrolysis. The spectrum acquired for the solution after electrolysis using a non-modified electrode is also shown for comparative purposes. The hyperfine splittings observed at $A^{\text{N}} = 15.0$ and 15.2 G in the EPR spectra in solution containing $[\text{Cu}(\text{4-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ and H_2O_2 (Fig. 3, Panels A and B) exactly match the known spectrum of $\text{OH}^\cdot$ -DMPO. However, two other radical species were observed at $A^{\text{N}} = 16.0$ and 16.35 G with abundances of 24 and 20%, respectively. While the former hyperfine splitting is assigned to the analogous CH_3 -DMPO adduct, the one observed at 16.35 G was not identified. We hypothesize the $^\cdot\text{CH}_3$ radical is produced as a

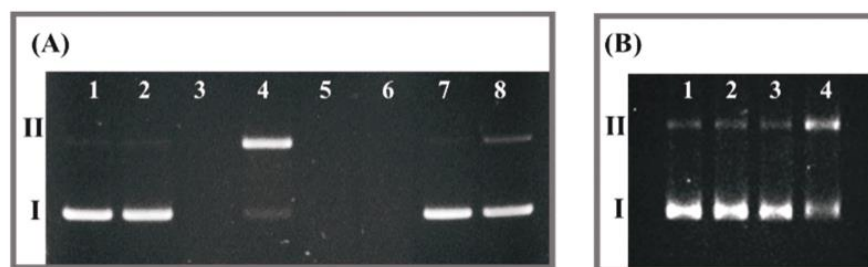


Fig. 2 DNA cleavage assays of $[\text{Cu}(\text{4-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ (Cu^*) in solution and adsorbed on gold ($\text{Au}/[\text{Cu}]$) towards supercoiling DNA (Form I, 8 ng μL^{-1}). Panel (A): 1. DNA (control); 2. DNA + Cu^* ; 3. DNA + Cu^* + H_2AA ; 4. DNA + Cu^* + H_2AA + catalase; 5. DNA + Cu^* + H_2AA + D-mannitol; 6. DNA + Cu^* + H_2AA + SOD; 7. DNA + H_2O_2 ; 8. DNA + H_2O_2 + Cu^* . Panel (B): Au and Au/[Cu] at different applied potentials (E_{ap}). 1. DNA + Au ($E_{\text{ap}} = 0.5$ V); 2. DNA + Au ($E_{\text{ap}} = -0.2$ V); 3. DNA + Au/[Cu] ($E_{\text{ap}} = 0.5$ V); 4. DNA + Au/[Cu] ($E_{\text{ap}} = -0.2$ V). Form II – nicked form. $[\text{H}_2\text{AA}] = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Concentrations of SOD and catalase = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. [D-Mannitol] = 50 mmol L^{-1} ; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3 \text{ mmol L}^{-1}$. All potentials were applied for 10 min.

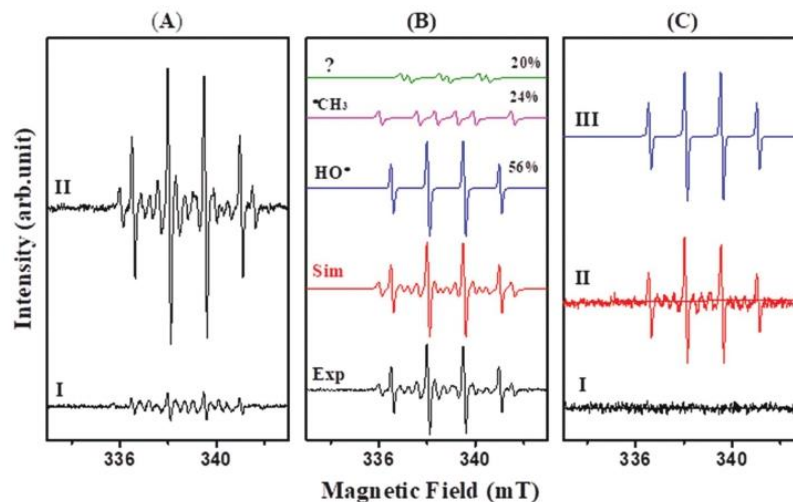
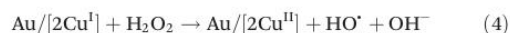
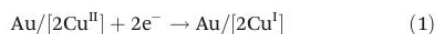


Fig. 3 Panel (A): EPR spectra in aerated aqueous solution containing DMPO and $[\text{Cu}(\text{4-mbipy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ before (I) and after 1 min (II) of H_2O_2 addition. Panel (B): Spectral simulations of spectrum (II) of panel (A). Panel (C): EPR spectra of an aerated aqueous solution containing DMPO after electrolysis at -0.2 V by using bare gold(I), Au/[Cu] (II) and simulated (III). The EPR parameters used for the spectral simulations shown in Panels (B) and (C) were: $g = 2.0060$, $A^N = 15.0$ G, $A^H = 15.2$ G and $L_W = 1.28$ G, identified as OH-DMPO adduct; $g = 2.0060$, $A^N = 16.0$ G, $A^H = 23.4$ G and $L_W = 1.24$ G, identified as CH_3 -DMPO adduct; $g = 2.0064$, $A^N = 16.35$, $A^H = 2.9$ and $L_W = 2.34$ non-identified.

consequence of the reaction of the $\text{HO}^\bullet$ radical with the SCH_3 fragments of the 4-mbpy-Bz-SMe moieties thus breaking the C-S bond. For the electrolyzed solution (Fig. 3, Panel C), the OH-DMPO radical is only observed when the modified gold electrode is used, spectrum II. It is worth mentioning that no signal was observed that could be assigned to the H_3C -DMPO adduct in this case suggesting the $-\text{SCH}_3$ group is protected by the gold surface from demethylation. Another possibility that cannot be ruled out is the configuration of the complex on the surface. That is, after adsorption, the $-\text{SCH}_3$ fragments of the 4-mbpy-Bz-SMe moieties occupy regions remote from the region where $\text{HO}^\bullet$ radical generation occurs.

In the EPR spectra shown in Panel C of Fig. 3, no H_2O_2 was added to the medium meaning it is produced when the putative dimeric copper compound formed on the surface ($\text{Au}/[\text{Cu}^{\text{I}}-\text{O}-\text{Cu}^{\text{I}}]$) breaks down to H_2O_2 and $\text{Au}/[2\text{Cu}^{\text{I}}]$. Under reductive electrolysis, the copper(II) complex is again reduced to Cu^{I} and reacts with H_2O_2 previously produced at the interface thus recovering the starting $\text{Cu}(\text{II})$ complex in a catalytic mechanism, as proposed in eqn (1)–(4).



The complex $[\text{Cu}(\text{4-mbipy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ is able to produce hydroxyl radicals both in solution and adsorbed on a gold elec-

trode, but a quantitative comparison between the two is difficult due to the huge differences in concentration, *i.e.* 5.3×10^{-10} mol cm^{-2} on the electrode surface *versus* $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ in solution. Moreover, in solution the complex has a distinct advantage in its capability to interact and bind DNA. This property is relevant since the diffusion of the hydroxyl radical is extremely reduced due to its high reactivity (range of action *ca.* 50 Å), and its oxidant ability is effective when it is generated in proximity to DNA.⁵⁹ Taking into account the restrictions of the complex confined to the electrode surface, it is notable that we could detect nicked-DNA by electrophoresis when a reductive potential was applied to the modified electrode, as shown in Fig. 2b.

For the complex in solution, emission and absorption spectroscopic measurements were performed in an attempt to quantify the production of $\text{HO}^\bullet$ by using rhodamine⁶⁰ and terephthalic acid^{61,62} probes. Both probes, however, seem to interact with the reduced copper complex (generated *in situ* upon reacting with ascorbic acid) as can be seen in Fig. S5,† making the methodology not applicable to this system. In spite of this and considering that identification of damaged plasmidial DNA (nicked, linear or degraded DNA) is a well-accepted method to evaluate the reactivity of a compound to produce such ROS, DNA cleavage data reported for a few copper complexes were summarized in Table S2 of the ESI.† While the copper complexes we have been working with lead to complete DNA (pBR322) degradation after 30 min of incubation ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ of $[\text{Cu}(\text{2CP-Bz-SMe})_2]^{2+}$ or $[\text{Cu}(\text{4-mbipy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ in presence of H_2AA), $[\text{Cu}(\text{py-phen})_2(\text{NO}_3)]^+$ (0.5 to $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) takes 240 min to give form II (pUC219) in pres-

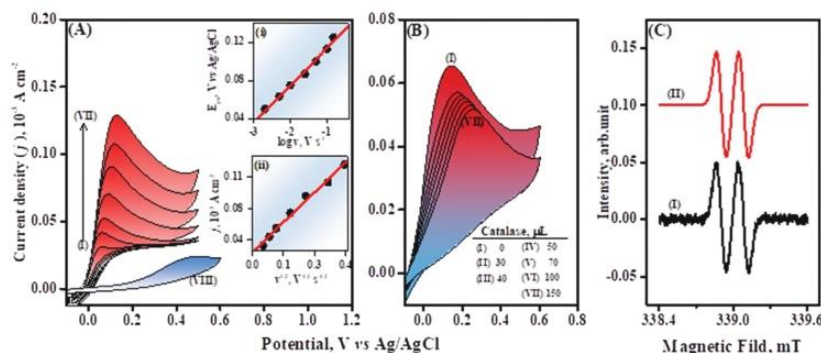


Fig. 4 (A) Cyclic voltammograms of bare gold electrode (VIII) at 25 mV s⁻¹ and Au/[Cu] in 0.1 mol L⁻¹ PBS containing 1.0 mmol L⁻¹ H₂AA at (I) 2, (II) 5, (III) 10, (IV) 25, (V) 50, (VI) 100 and (VII) 150 mV s⁻¹. Insets: Plots of (i) anodic peak potential (E_p) as function of logarithmic sweep rate ($\log v$) and (ii) current density (j) as function of square root of scan rate ($v^{1/2}$). (B) Cyclic voltammograms of Au/[Cu] at 25 mV s⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ PBS containing 1.0 mmol L⁻¹ H₂AA after addition of catalase (aliquots from a stock solution of 6 mg mL⁻¹). (C) EPR spectra of an aerated aqueous solution containing 1.0 mmol L⁻¹ H₂AA after electrolysis at -0.2 V by using Au/[Cu] (I) and simulated (II). The EPR parameters used for the simulated spectrum were: $g = 2.0052$, $A^H = 1.803$ G, $L_W = 0.807$ G characteristic of the ascorbyl radical.

ence of H₂O₂.⁶³ Although several factors influence the cleavage activity, the higher efficiency observed for [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ and [Cu(4-mbipy-Bz-SMe)]²⁺ seems to be related to how close these complexes approach DNA. Indeed, [Cu(4-mbipy-Bz-SMe)]²⁺ and [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ adsorbed on gold electrode²² or magnetic nanoparticles⁶⁴ lead to form II whereas these complexes in solution are able to completely degrade DNA. Considering the previous comments on the restrictions of the complexes confined on a solid surface (being electrode or nanoparticles), it is reasonable to associate the relative cleavage efficiencies of [Cu(4-mbipy-Bz-SMe)]²⁺ and [Cu(2CP-Bz-SMe)]²⁺ with their ability to approach DNA.

Electrochemical studies were performed in solution containing ascorbic acid as a redox probe aiming to indirectly detect ROS produced in eqn (4). Fig. 4 shows the cyclic voltammograms obtained for the modified gold electrode in solution containing H₂AA under different conditions. The EPR spectrum obtained for the solution after electrolysis is shown as well.

From Fig. 4(A), the potential assigned to the oxidation reaction of H₂AA is observed from 0.1 to 0.2 V (depending on the sweep rate) at the Au/[Cu] electrode (curves I to VII) which gives peak-shaped voltammograms while the bare Au electrode gives a broad anodic peak at 0.44 V (curve VIII). The Tafel-like relation ($dE_p/d\log v$), inset (i) in Fig. 4(A), as well as the linear current response for H₂AA addition (Fig. S6 of the ESI†) clearly indicate that this is a mediated electrochemical oxidation of H₂AA. In addition, the plot of current density versus the square root of the scan rate (j vs. $v^{1/2}$, inset (ii) in Fig. 4(A) indicates a one-electron reaction leading to the ascorbyl radical (HA[•]). The cyclic voltammograms obtained in H₂AA solution containing catalase (Fig. 4B), which is a scavenger for H₂O₂, presents a current decrease with the increase of catalase concentration meaning hydrogen peroxide is involved in the ascorbic acid oxidation reaction. Further addition of catalase (Fig. S7 of the

ESI†) leads to a voltammogram similar to that obtained for the bare gold electrode thus reinforcing the implication of H₂O₂ in the mechanism. Such behavior is observed both in the presence and absence of oxygen.

Interestingly the EPR spectrum (Fig. 4C) of an electrolyzed solution poised at -0.2 V (Cu^I form) containing H₂AA shows hyperfine splitting at $A^H = 1.803$ G ascribed⁶⁵ to the ascorbyl radical. In this case Cu^{II} cannot be responsible for H₂AA oxidation and based on the earlier results that showed hydroxyl radicals may be formed under reducing conditions (eqn (1)–(4)) an alternative pathway emerges for HA[•] formation that, in turn, is electrochemically oxidized, as suggested in eqn (5) and (6).



It is known that HA[•] has a half-life of milliseconds in water⁶⁶ so its observation as a transient prior to decomposition is fortunate.

Conclusions

The thioether derivative of bipyridine, 4-mbpy-Bz-SMe, and the copper complex resulting from its reaction with Cu(NO₃)₂, [Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺, were successfully synthesized and characterized by electrochemistry, NMR, vibrational, electronic and EPR spectroscopies. Electronic spectra of the cuprous complex [Cu^I(4-mbpy-Bz-SMe)]⁺ at 183 K indicated the formation of the peroxodicopper compound {[Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂](μ-O₂²⁻)]²⁺ upon addition of dioxygen. The gold electrode modified with [Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ was fully characterized by SERS spectroscopy, electrochemistry and impedance spectroscopy thus showing the adsorption occurs through the

sulfur atom of the 4-mbpy-Bz-SMe moieties and that pores are present within the monolayer.

DNA cleavage assays were performed using the copper complex in solution and adsorbed on gold and showed DNA degradation occurs if reducing conditions are maintained, *i.e.* ascorbic acid (H_2AA) in solution and an applied potential (E_{apl}) sufficiently negative to maintain the adsorbed complex in its Cu^{I} form. EPR spectra were obtained in presence of DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) for the electrolyzed solution ($E_{\text{apl}} = -0.2$ V, Cu^{I} form) free of H_2O_2 and for the solution containing $[\text{Cu}^{\text{II}}(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ and H_2O_2 . The obtained spectra showed hyperfine splittings typically assigned to the OH-DMPO adduct indicating H_2O_2 is converted to $\text{HO}^\bullet$ in a Fenton-like reaction. This conclusion is reinforced by electrochemical studies of the oxidation reaction of H_2AA using a gold electrode modified with $[\text{Cu}^{\text{II}}(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$. Besides the electrocatalytic effect in comparison to the bare gold electrode, the cyclic voltammograms showed a one-electron reaction leading to the ascorbyl radical ($\text{HA}^\bullet$), which was fortunately detected by EPR. The current assigned to the electrode reaction of $\text{HA}^\bullet$ to dehydroascorbic acid (AA) decreased with the addition of catalase, a scavenger of H_2O_2 , meaning peroxide is indeed involved in the mechanism.

Experimental section

Apparatus

Hewlett Packard, UV-Vis photo-diode-array, model 8453, and Analytik Jena Specord S-100 spectrophotometers were used to acquire the UV-Vis electronic spectra of the synthesized compounds. Low temperature UV-Vis experiments were carried out on an Agilent spectrophotometer model 8453 equipped with a liquid nitrogen chilled Unisoku USP-203-A cryostat using a 1 cm optical path modified Schlenk cuvette. Conductivity measurements were performed at controlled temperature with Hanna Instruments EC-215 and a DDS-12DW (ICT, SL – Instrumentación Científica Técnica) devices. Melting points were determined using a Coasin Instrument Control SMP 2 (ICT, SL). NMR spectra were performed on a Bruker Avance-400 instrument operating at 400.13 MHz for ^1H nuclei equipped with a 5 mm multinuclear broad-band dual probehead (^{109}Ag – ^{31}P), incorporating a Z-gradient coil. NMR spectra were calibrated with respect to CDCl_3 or $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$ and corrected relative to TMS.

Most of the electrochemical experiments were performed with an AUTOLAB potentiostat model 308N coupled with FRA2 impedance module using the Nova 1.11.2 software (Ecochemie, Netherlands). The electrochemical cell used was a standard three electrode configuration, composed of a glassy carbon or gold substrate (geometric area of 0.07 cm^2 – Bioanalytical Systems, BASi), lab-made silver/silver chloride (3.5 mol L^{-1} KCl), and a platinum mesh as working, reference and auxiliary electrodes, respectively. For the acquisition of the Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) spectra, a gold electrode of geometric area of 0.5 cm^2 was used. This substrate

was also used to electrolyze the copper complex solution for electron paramagnetic resonance (EPR) spectra. For the experiments acquired in the glovebox, a model 910 PSTAT potentiostat (Metrohm Autolab) was used. Electrochemical measurements were acquired at 25 ± 0.2 °C. All potentials, unless otherwise specified, are referenced against a Ag/AgCl electrode. The impedimetric measurements were performed in 0.1 mol L^{-1} KF containing 5.0 mmol L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and with a sinusoidal AC potential of 10 mV superimposed on the applied potential (half-wave potential of the redox probe, $E_{1/2} = 0.23$ V vs. Ag/AgCl). The impedance responses were measured over the frequency range 0.1 Hz to 30 kHz. All impedimetric responses were analyzed using circuit equivalent fitting with the EIS Spectrum Analyzer software.⁶⁷

Fourier Transform Raman (FT-Raman) spectra of solid samples were acquired at room temperature on a RFS 100/S FT-Raman Bruker spectrometer using a Nd:YAG laser (1064 nm), applying 500 scans accumulation at 300 mW. The Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) measurements were performed using a Renishaw Raman InVia equipped with a CCD detector and coupled to a Leica microscope (DM2500M) with excitation radiation at 785 nm (diode laser, 500 mW). The laser beam was focused on the sample by a $\times 63$ water immersion objective.

An X-band (9.44947 GHz) electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum of $[\text{Cu}(4\text{-mbpy-Bz-SMe})_2]^{2+}$ was measured as a dilute (1 mmol L^{-1}) frozen dimethylformamide (DMF) solution on a Bruker Elexsys E580 CW/pulsed EPR spectrometer fitted with a super high Q resonator. A microwave power of 5.0 mW was used, the modulation amplitude was 2 G and the modulation frequency was 100 kHz. A flow-through cryostat in conjunction with a Eurotherm (B-VT-2000) variable temperature controller held the temperature at 125 K within the cavity. The spectrum was simulated with EPR50F.⁶⁸ The spectra in solution were acquired at 298 K on a Varian E-109 X-band instrument with a standard rectangular cavity and a Wilmad Glass quartz flat cell. 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) was used as spin trapping reagent for detection of $\text{HO}^\bullet$ and $\text{CH}_3^\bullet$ radicals. Measurement conditions: center field 339 mT, sweep field 10 mT, sweep time 60 s, MW power 20 mW, gain 2.0×10^3 , modulation amplitude 0.05 mT, modulation frequency 100 kHz, time constant: 0.064 s, MW frequency: 9.50390 GHz. Spectral simulations were made using EasySpin program.⁶⁹

Chemicals

Ultrahigh purity water from a Millipore system was used in all experiments. H_2SO_4 (99.99%) KOH (98%), KBr (99%), KCl (99%), KF (99%), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (99%) and $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (98%), SeO_2 , active neutral alumina (70–290 mesh), 1,4-dioxane, deuterated tetrachloroethane ($\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$) and chloroform (CDCl_3), all from Sigma-Aldrich, and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, from Merck, were used without further purification. KH_2PO_4 ($\geq 99\%$) and K_2HPO_4 ($\geq 98\%$), from Sigma-Aldrich, were used to prepare the phosphate buffer solution (PBS) in a pH range adjusted with NaOH (98%, Fisher Scientific) and HCl (99%, Tedia). Ascorbic acid (H_2AA), from Sigma-Aldrich, was used as

reducing agent in DNA cleavage assays and electrocatalysis experiments. 4,4'-Dimethylbipyridine and 4-methylthioaniline, from Sigma-Aldrich, were used as received in the syntheses of the organic compounds. Methanol and dimethylformamide were dried over 4 Å molecular sieves for 72 h prior to use. Acetonitrile (chromatographic grade, from Mallinckrodt) was dried by refluxing over P_2O_5 . Plasmid pBR322 was purchased from New England BioLabs and used as received. Catalase, D-mannitol and superoxide dismutase, from Sigma-Aldrich, were used as received in the DNA cleavage assays which were acquired in 10 mmol L⁻¹ PBS, pH 7.2. For the electrochemical measurements in presence of catalase, the aliquots added to the electrochemical cell (initial volume of 3 mL of PBS) were withdrawn from a stock solution prepared by dissolving 30 mg of catalase in 5 mL of 0.1 mol L⁻¹ PBS solution. All other chemicals were of chromatographic grade and used as received.

4'-Methyl-[2,2'-bipyridine]-4-carbaldehyde (4-mbpy-COH)

The synthesis of the starting compound 4-mbpy-COH followed the procedure described in the literature.⁷⁰ Yield: 80%.

(E,Z)-1-(4'-Methyl-[2,2'-bipyridine]-4-yl)-N-(4(methylthio)phenyl) methanimine (4-mbpy-Bz-SMe)

0.66 g (4.7 mmol) of 4-methylthioaniline were added to an anhydrous methanolic solution (with molecular sieve) containing 1.0 g (4.7 mmol) of 4-mbpy-COH and kept under reflux for 4 h resulting in a yellow solid that was filtered to remove molecular sieves, centrifuged and concentrated by rotary evaporation (30 °C). After that, the crude product was chromatographically purified on silica (MeOH/CH₂Cl₂; 1:99 v/v). Yield: 80%; m.p.: 121.5 °C. ¹H NMR and ¹H-COSY spectra are shown in Fig. S8 and S9 of the ESI† along with the structure numbering. ¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz) δ (ppm) = 8.79 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H2), 8.76 (s, 1H, H5), 8.58 (s, 1H, H6), 8.57 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H9), 8.27 (s, 1H, H1), 7.86 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H3), 7.32 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Hc), 7.24 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Hb), 7.18 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H8), 2.52 (s, 3H, Hd), 2.46 (s, 3H, Ha). ¹³C-NMR (C₂D₂Cl₄, 100.63 MHz): δ (ppm) = 150.1 (C2), 149.5 (C9), 148.6 (C6), 127.7 (Cc), 125.6 (C8), 122.6 (Cb), 122.0 (Ci), 121.6 (C5), 121.3 (C3), 20.8 (Ca), 17.0 (Cd).

[Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂(NO₃)](NO₃)

0.328 g (1.57 mmol) of Cu(NO₃)₂·3H₂O dissolved in MeCN was added dropwise to a deaerated MeCN solution of 1.0 g (3.13 mmol) 4-mbpy-Bz-SMe and stirring was continued at 25 °C for 2 h. The mixture was evaporated to dryness, washed with water and with diethyl ether (3 times). Yield: 80%. Λ_m (mean value of three measurements in MeCN at 25 °C): 137.7 ohm⁻¹ cm² mol⁻¹, which is consistent with a 1:1 electrolyte composition and the suggested formulation [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂(NO₃)](NO₃). Anal. Calc. for C₃₈H₃₄CuN₈O₆S₂(CH₃CN)(H₂O)₂ (MW: 902.53): C, 53.18; H, 4.54; N, 13.96. Found: C, 53.40; H, 4.27; N, 13.69.

[Cu^I(4-mbpy-Bz-SMe)₂]⁺

2.25 mg (0.6 mmol) of [Cu(CH₃CN)₄]OTf, (OTf = trifluoromethanesulfonate) was added to a Schlenk containing 3.82 mg (1.2 mmol) of 4-mbpy-Bz-SMe dissolved in 10 mL of tetrahydrofuran (THF). The procedure was performed in a glovebox under nitrogen atmosphere and the compound was not isolated.

{[Cu^{II}(4-mbpy-Bz-SMe)₂](μ-O₂²⁻)²⁺}

The dimeric peroxo complex was generated *in situ* by transferring 3 mL of [Cu^I(4-mbpy-Bz-SMe)₂]⁺ in THF into a 1 cm Schlenk cuvette, which was sealed with a rubber septum. The cuvette was transferred to the pre-cooled cryostat and chilled at 183 K with 10 minutes allowed for equilibration prior to oxygenation. Dioxygen was gently bubbled through the solution using a long needle for 50 seconds.

DNA cleavage assays

The assays with supercoiled plasmid pBR322 followed the protocol previously described by our group.²² In brief: the reactions were performed in 20 μL of 10 mmol L⁻¹ PBS (pH 7.2), the concentrations of DNA and [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ being kept constant at 5 ng mL⁻¹ (5 ng L⁻¹ in base pair) and 10 μmol L⁻¹, respectively. Catalase (100 μg mL⁻¹), D-mannitol (50 mmol L⁻¹) and superoxide dismutase (SOD, 100 μg mL⁻¹) were used as scavengers for the identification of the reactive oxygen species (ROS). After the incubation time (30 min), 4 μL of 6× DNA loading dye (Biolabs) were added to the mixtures and the samples were immediately loaded on a 0.8% agarose gel in TEA buffer pH 8.0 (40 mmol L⁻¹ 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol, 20 mmol L⁻¹ acetic acid, 1 mmol L⁻¹ EDTA) and electrophoresed in a horizontal electrophoresis system (Bio-Rad) at 70 V. After electrophoresis, the gels were stained using GelRed™ (Biotium, Inc.) for 30 minutes and images acquired in a Gel Doc XR⁺ system (Bio-Rad) using the Quantity One 1-D analysis software. For the acquisition of the electrophoresis images of the electrolyzed solutions, supercoiled plasmid (8 ng μL⁻¹) prepared in an aerated 100 mM PBS (7.4) was added to an electrochemical cell in which the gold working electrode (bare and modified with the copper complex) was inserted from below a drilled Teflon cell. After potential applications (10 min of electrolysis), aliquots of 20 μL were incubated and electrophoresed following the same procedure as described above.

Gold modification

Prior to each modification, the gold surfaces were mechanically polished with alumina pastes of different grades to a mirror-like finish. Then, the electrodes were submitted to successive oxidation–reduction-cycles (ORC) in 0.5 mol L⁻¹ H₂SO₄ to achieve both the cleanness and the determination of the active surface area (A). The cyclic voltammograms of the surfaces thus obtained were compared with the well-established curve for a clean gold surface in 0.5 mol L⁻¹ H₂SO₄.⁷¹ For the acquisition of SERS spectra, the gold substrates were electro-

chemically roughened by applying ORCs in 0.1 mol L⁻¹ KCl in the range -0.3 to +1.3 V vs. Ag/AgCl at a scan rate of 0.1 V s⁻¹. The gold surfaces were modified by immersion in a 10.0 μmol L⁻¹ ethanolic solution of [Cu(4-mbpy-Bz-SMe)₂]²⁺ for 1 h.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We are thankful to CAPES (PROEX 23038.000936/2018-46 and PRINT 88887.311905/2018-00), CNPq (E. H. S. Sousa 312030/2015-0, I. C. N. Diógenes 307078/2017-5), FUNCAP (PRONEX PR2 0101-00030.01.00/15 SPU No.: 3265612/2015) Intercambio Académico UNAM (I. Castillo 348-2018; A. C. Neira 293842) and CONICYT (A. I. B. Romo # 72170429) for financial support.

References

- 1 A. Umeno, V. Biju and Y. Yoshida, *Free Radical Res.*, 2017, **51**, 413–427.
- 2 F. Tao, B. Gonzalez-Flecha and L. Kobzik, *Free Radical Biol. Med.*, 2003, **35**, 327–340.
- 3 B. Poljšak and R. Fink, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2014, **2014**, 22.
- 4 G. Manda, G. Isvoranu, M. V. Comanescu, A. Manea, B. D. Butuner and K. S. Korkmaz, *Redox Biol.*, 2015, **5**, 347–357.
- 5 Z. Yu, Q. Sun, W. Pan, N. Li and B. Tang, *ACS Nano*, 2015, **9**, 11064–11074.
- 6 P. Hu, T. Wu, W. Fan, L. Chen, Y. Liu, D. Ni, W. Bu and J. Shi, *Biomaterials*, 2017, **141**, 86–95.
- 7 C. Yizhe and Q. Yan, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2017, **17**, 1046–1069.
- 8 K. Joanna and Y. A.-E. Hassan, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2017, **17**, 904–919.
- 9 J. Ramesh, S. Rohit, K. Amanpreet and K. M. Tapan, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2016, **16**, 190–199.
- 10 H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.*, 1894, **65**, 899–910.
- 11 F. Haber and J. Weiss, *Naturwissenschaften*, 1932, **20**, 948–950.
- 12 K. Raedschelders, D. M. Ansley and D. D. Y. Chen, *Pharmacol. Ther.*, 2012, **133**, 230–255.
- 13 F. Bagheri, V. Khor, A. M. Alizadeh, S. Khalighfard, S. Khodayari and H. Khodayari, *Life Sci.*, 2016, **165**, 43–55.
- 14 T. K. Venkatachalam, P. V. Bernhardt, C. J. Noble, N. Fletcher, G. K. Pierens, K. J. Thurecht and D. C. Reutens, *J. Inorg. Biochem.*, 2016, **162**, 295–308.
- 15 M. Wehbe, A. W. Y. Leung, M. J. Abrams, C. Orvig and M. B. Bally, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 10758–10773.
- 16 N. R. Angel, R. M. Khatib, J. Jenkins, M. Smith, J. M. Rubalcava, B. K. Le, D. Lussier, Z. Chen, F. S. Tham, E. H. Wilson and J. F. Eichler, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **166**, 12–25.
- 17 Z. Molphy, C. Slator, C. Chatgililoglu and A. Kellett, *Front. Chem.*, 2015, **3**, 1–9.
- 18 S. J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta and M. Levine, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003, **22**, 18–35.
- 19 S. Kuss and R. G. Compton, *Electrochim. Acta*, 2017, **242**, 19–24.
- 20 D. E. Cabelli and B. H. J. Bielski, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 1809–1812.
- 21 E. Garribba, G. Micera, D. Sanna and L. Strinna-Erre, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, **299**, 253–261.
- 22 A. I. B. Romo, D. S. Abreu, T. F. Paulo, M. S. P. Carepo, E. H. S. Sousa, L. Lemus, C. Aliaga, A. A. Batista, O. R. Nascimento, H. D. Abruña and I. C. N. Diógenes, *Chem. – Eur. J.*, 2016, **22**, 10081–10089.
- 23 M. Pitié, B. Donnadieu and B. Meunier, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 3486–3489.
- 24 M. Pitié, C. Boldron, H. Gornitzka, C. Hemmert, B. Donnadieu and B. Meunier, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, **2003**, 528–540.
- 25 P. M. Castro and P. W. Jagodzinski, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1991, **47**, 1707–1720.
- 26 S. L. Howell and K. C. Gordon, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 2536–2544.
- 27 J. H. S. Green, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1968, **24**, 1627–1637.
- 28 D. Maiti, J. S. Woertink, A. A. Narducci Sarjeant, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 3787–3800.
- 29 A. Gomila, N. Le Poul, J.-M. Kerbaol, N. Cosquer, S. Triki, B. Douziech, F. Conan and Y. Le Mest, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 2238–2253.
- 30 H. Hakkinen, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 443–455.
- 31 H. Sellers, A. Ulman, Y. Shnidman and J. E. Eilers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9389–9401.
- 32 J. F. Kang, A. Ulman, S. Liao, R. Jordan, G. Yang and G.-y. Liu, *Langmuir*, 2001, **17**, 95–106.
- 33 A. Ulman, J. F. Kang, Y. Shnidman, S. Liao, R. Jordan, G.-Y. Choi, J. Zaccaro, A. S. Myerson, M. Rafailovich, J. Sokolov and C. Fleischer, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2000, **74**, 175–188.
- 34 A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, Boston, 1991.
- 35 A. Ulman, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 1533–1554.
- 36 C. A. Szafranski, W. Tanner, P. E. Laibinis and R. L. Garrell, *Langmuir*, 1998, **14**, 3570–3579.
- 37 G. A. Bowmaker and B. C. Dobson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1981, 267–270.
- 38 T. G. Lee, K. Kim and M. S. Kim, *J. Raman Spectrosc.*, 1991, **22**, 339–344.
- 39 D. S. Abreu, T. P. Sousa, C. B. Castro, M. N. V. Sousa, T. T. Silva, F. W. Q. Almeida-Neto, M. V. A. Queiros,

- B. S. F. Rodrigues, M. C. F. Oliveira, T. F. Paulo, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, M. L. A. Temperini and I. C. N. Diógenes, *Electrochim. Acta*, 2017, **241**, 116–123.
- 40 P. Lima-Neto, M. M. V. Parente, I. S. Moreira, I. C. N. Diógenes, O. R. Mattos, O. E. Barcia, R. P. Santos and V. N. Freire, *J. Electroanal. Chem.*, 2007, **603**, 21–26.
- 41 J. R. Sousa, I. C. N. Diógenes, M. L. A. Temperini, F. A. M. Sales, S. O. Pinheiro, R. N. Costa-Filho, J. S. Andrade Jr. and I. S. Moreira, *J. Organomet. Chem.*, 2007, **692**, 3691–3699.
- 42 I. C. N. Diógenes, I. M. M. Carvalho, E. Longhotti, L. G. F. Lopes, M. L. A. Temperini, G. F. S. Andrade and I. S. Moreira, *J. Electroanal. Chem.*, 2007, **605**, 1–7.
- 43 T. F. Paulo, S. O. Pinheiro, M. A. S. Silva, L. G. F. Lopes, L. S. Pinheiro, G. F. A. Aquino, M. L. A. Temperini, P. Lima-Neto and I. C. N. Diógenes, *Electroanalysis*, 2009, **21**, 1081–1089.
- 44 T. F. Paulo, H. D. Abruña and I. C. N. Diógenes, *Langmuir*, 2012, **28**, 17825–17831.
- 45 T. F. Paulo, R. A. Ando, I. C. N. Diógenes and M. L. A. Temperini, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 6275–6283.
- 46 J. R. Sousa, A. A. Batista, I. C. N. Diógenes, G. F. S. Andrade, M. L. A. Temperini, L. G. F. Lopes and I. S. Moreira, *J. Electroanal. Chem.*, 2003, **543**, 93–99.
- 47 M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung and M. D. Porter, *Langmuir*, 1991, **7**, 2687–2693.
- 48 C.-J. Zhong, J. Zak and M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, **421**, 9–13.
- 49 E. Pensa, C. Vericat, D. Grumelli, R. C. Salvarezza, S. H. Park, G. S. Longo, I. Szleifer and L. P. Mendez De Leo, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 12355–12367.
- 50 K. D. Karlin, N. Wei, B. Jung, S. Kaderli, P. Niklaus and A. D. Zuberbuehler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9506–9514.
- 51 S. Kim, J. Y. Lee, R. E. Cowley, J. W. Ginsbach, M. A. Siegler, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 2796–2799.
- 52 S. Kim, J. W. Ginsbach, J. Y. Lee, R. L. Peterson, J. J. Liu, M. A. Siegler, A. A. Sarjeant, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 2867–2874.
- 53 S. Goldstein and G. Czapski, *J. Free Radicals Biol. Med.*, 1985, **1**, 373–380.
- 54 O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. Gajewski and M. Dizdaroglu, *Biochem. J.*, 1991, **273**, 601–604.
- 55 B. Halliwell and J. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2007.
- 56 Q. Jiang, N. Xiao, P. Shi, Y. Zhu and Z. Guo, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1951–1972.
- 57 K. D. Karlin, N. Wei, B. Jung, S. Kaderli, P. Niklaus and A. D. Zuberbuehler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9506–9514.
- 58 G. R. Buettner, *Free Radical Biol. Med.*, 1987, **3**, 259–303.
- 59 S. Joseph and H. F. Noller, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2000, vol. 318, pp. 175–190.
- 60 P. Wilhelm and D. Stephan, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2007, **185**, 19–25.
- 61 Y. Nakabayashi and Y. Nosaka, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 30570–30576.
- 62 Y. Nosaka and A. Y. Nosaka, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 11302–11336.
- 63 L. M. Kumar, R. M. Ansari and B. R. Bhat, *Appl. Organomet. Chem.*, 2018, **32**, e4054.
- 64 M. A. S. Silva, A. I. B. Romo, D. S. Abreu, M. S. P. Carepo, L. Lemus, M. Jafelici, T. F. Paulo, O. R. Nascimento, E. Vargas, J. C. Denardin and I. C. N. Diógenes, *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **186**, 294–300.
- 65 J. Vázquez-Vivar, A. M. Santos, V. B. C. Junqueira and O. Augusto, *Biochem. J.*, 1996, **314**, 869–876.
- 66 B. H. J. Bielski and A. O. Allen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 3793–3794.
- 67 A. S. Bondarenko and G. A. Ragoisha, in *Progress in Chemometrics Research*, ed. A. L. Pomerantsev, Nova Science Publishers, New York, 2005, pp. 89–102.
- 68 R. A. Martinelli, G. R. Hanson, J. S. Thompson, B. Holmquist, J. R. Pilbrow, D. S. Auld and B. L. Vallee, *Biochemistry*, 1989, **28**, 2251–2258.
- 69 S. Stoll and A. Schweiger, *J. Magn. Reson.*, 2006, **178**, 42–55.
- 70 S. I. Khan, A. E. Beilstein, G. D. Smith, M. Sykora and M. W. Grinstaff, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 2411–2415.
- 71 D. T. Sawyer, A. Sobkowiak, J. Julian and L. Roberts, *Electrochemistry for Chemists*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.