





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**Degradación de celulosa con complejos de cobre y  
ligantes bencimidazólicos**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Lic. Andrea Paola Torres Flores**



Ciudad de México, Agosto 2020.



*Para mis padres. Gracias por estar  
conmigo siempre. Los amo*

## AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM.
- Al proyecto DGAPA-PAPIIT IN203317 por la beca otorgada.
- A CONACyT por la beca 887795
- Al Dr. Ivan Castillo Pérez y los integrantes del laboratorio 2-2, por su apoyo, amistad y asesoría durante la realización del proyecto.
- Al equipo técnico y académico del Instituto de Química
- M. en C. Simón Hernández Ortega por la difracción de rayos X.
- M. en C. María del Carmen Márquez y a Q. Eréndira García Ríos por la espectrometría de masas por la técnica de electrospray, DART y FAB.
- Q.F.B. Rocío Patiño Maya obtención de espectros de infrarrojo.
- M. en C. Virginia Gómez Vidales por la obtención y asesoramiento en resonancia paramagnética electrónica.
- A mis profesores, compañeros, amigos y familia que me han brindado su apoyo incondicional a lo largo de la carrera y de la vida.
- A Matthias Sustek que siempre me ayuda cuando tengo dudas y me da fuerzas para ser mejor.
- A mis padres y hermanos que me brindaron su apoyo, económico, académico y emocional, muchas gracias por estar ahí siempre.

## **Miembros del jurado**

Presidente

Dr. Anatoly Yatsimirsky

Vocal

Dr. Herbert Höpfl Bachner

Vocal

Dr. Ernesto Rivera García

Vocal

Dra. Susana Porcel García

Secretario

Dra. Itzel Guerrero Ríos

## **DIVULGACIÓN**

### **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS**

- SILQCOM7 poster: “Cu(I) complexes with benzimidazole-derived ligands”  
celebrado en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, Agosto 2019

# I TABLA DE CONTENIDO

---

RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1- ANTECEDENTES .....	9
1.1 Cobre.....	9
1.1.1 Cobre (I) .....	9
1.1.2 Cobre (II) .....	10
1.1.3 Propiedades redox del sistema Cobre(I)/(II) .....	12
1.2 Metaloenzimas .....	12
1.3 Monooxigenasas de Cu .....	13
1.3.1 Monooxigenasa $\alpha$ -hidroxilante de peptidiglicina (PHM).....	13
1.3.2 Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO).....	16
1.4 Influencia de los ligantes en sistemas biomiméticos .....	19
1.5 Antecedentes directos .....	22
1.6 Importancia del proyecto .....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo general.....	26
2.2 Objetivos particulares .....	26
3 HIPÓTESIS .....	27
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	28
4.1 general.....	28
4.2 Equipos .....	28
4.3 Degradación de celulosa a escala preparativa.....	29

5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
5.1	Síntesis y caracterización .....	30
5.2	Pruebas de reactividad .....	43
5.2.1	Pruebas de espectroscopía UV-vis .....	43
5.2.2	Pruebas de Resonancia Paramagnética Electrónica.....	56
5.2.3	Espectrometría de masas .....	58
5.3	Pruebas de degradación .....	59
5.3.1	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>1</sup> .....	62
5.3.2	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>1</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Et <sub>3</sub> N.....	64
5.3.3	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>2</sup> .....	67
5.3.4	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>2</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Et <sub>3</sub> N.....	69
5.3.5	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>3</sup> .....	72
5.3.6	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>3</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Et <sub>3</sub> N.....	73
5.3.7	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>4</sup> .....	75
5.3.8	Resultados de los estudios de degradación para CuL <sup>4</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Et <sub>3</sub> N.....	76
6	CONCLUSIONES.....	80
7	REFERENCIAS .....	82
8	Anexos.....	87
8.1	Datos cristalográficos .....	87

## RESUMEN

---

En este trabajo se realizó la síntesis y caracterización de cuatro compuestos de coordinación de cobre con el objetivo de utilizarlos como catalizadores para la reacción de oxidación de un enlace glucosídico.

Los complejos propuestos están bioinspirados en los sitios activos de las enzimas PHM (monooxigenasa  $\alpha$ -hidroxilante de peptidiglicina), D $\beta$ M (dopamina  $\beta$ -monooxigenasa) y LPMO (monooxigenasas líticas de polisacáridos), con el afán de mimetizar la activación de oxígeno que se lleva a cabo en sus centros mononucleares de cobre. Cuando el metal está en estado reducido reacciona con alguna fuente de oxígeno, por lo general oxígeno molecular, como agente oxidante. Los ligantes tripodales empleados contienen al grupo bencimidazol, mismo que fue elegido debido a las similitudes en sus propiedades químicas con respecto al imidazol de histidina en el ambiente de coordinación del cobre en las enzimas mencionadas.

Se buscó identificar posibles especies reactivas cobre-oxígeno que puedan actuar como intermediarios, haciendo reaccionar los complejos sintetizados con los agentes oxidantes O<sub>2</sub> y una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N. Posteriormente, se realizaron pruebas de los mismos complejos con la mezcla oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N para observar la posible degradación oxidativa utilizando celulosa, que es el sustrato natural de las enzimas LPMO. Los resultados obtenidos de este último estudio arrojaron resultados interesantes como la identificación de especies que han sido reportadas anteriormente como productos de degradación oxidativa de enlaces glucosídicos, tales como derivados de furanosas, ácido aldónico, levoglucosano, entre otras, demostrando que los complejos en presencia de la mezcla oxidante son catalizadores competentes para llevar a cabo la degradación de celulosa.

## INTRODUCCIÓN

---

A pesar de que el cambio climático es uno de los principales problemas con los que se enfrenta la humanidad, los gases de efecto invernadero y la demanda de combustibles fósiles para generar energía siguen en aumento, siendo esta la principal fuente de energía hasta el momento pese al desarrollo de nuevas tecnologías para generar energías limpias y renovables. Cerca del 80% de la energía consumida a nivel mundial proviene de combustibles fósiles<sup>1</sup>, del cual el 32.8% se debe al petróleo, 27.2% al carbón y el 20.9% al gas natural<sup>2</sup>, lo cual ocasiona que la inversión en energías alternativas no pueda competir con la inversión asociada a combustibles fósiles. Además de que el uso excesivo de este tipo de combustibles nos atrasa en la meta establecida en el acuerdo de Paris 2015, existen también evidencias documentadas de que en el futuro el abastecimiento de combustibles fósiles presentará desafíos ya que la disponibilidad física de este recurso es incierta en años próximos, al igual que los precios que se encuentran en constante fluctuación podrían llevarlo a ser un recurso no competitivo<sup>3,4,5</sup>. El desarrollo de energías renovables por lo tanto es imperativo, en especial porque de toda la energía generada en el 2011 tan solo el 10.2% provenía de biomasa, el 5.8% de energía nuclear y el 2.3% de presas hidroeléctricas<sup>2</sup>.

El bioetanol es un combustible atractivo que tiene como ventaja que es seguro con el medio ambiente, además de su renovabilidad. A pesar de que un litro de etanol genera el 66% de energía que la misma cantidad de gasolina, el etanol tiene un mayor octanaje (106-110), por lo que la mezcla de bioetanol con combustibles de uso común ayudaría a que la combustión fuera más uniforme y controlada<sup>6</sup>. El bioetanol es un combustible que contiene 34.7% de oxígeno en su composición, elemento que se encuentra ausente en la gasolina, lo cual incrementa su eficiencia de combustión en un 15% y a su vez reduce la emisión de óxidos de nitrógeno<sup>7</sup>. Otra de sus ventajas es que la cantidad de azufre presente en el etanol es casi nula en comparación con la gasolina, por lo que su mezcla contribuye a la disminución de emisión de óxidos de azufre al medio ambiente.

Las fuentes renovables de las que se puede obtener bioetanol son principalmente azúcares, almidones, biomasa lignocelulósica y algas, de las cuales únicamente la última no se ha

probado en escala comercial. En todos los demás casos, el último paso es la obtención de azúcares para su posterior fermentación y en el caso particular de la obtención de etanol a partir de biomasa, el tratamiento para llegar a la fermentación es complicado y costoso. En este trabajo haremos hincapié en la utilización de biomasa lignocelulósica ya que, es la más abundante en el mundo y la que no interfiere con la cadena de abasto alimenticio puesto que puede provenir de residuos forestales, agrícolas, e incluso desechos sólidos urbanos.

La biomasa lignocelulósica contiene diferentes proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina, los dos primeros constituyendo casi dos tercios del peso total de la biomasa. Los tres componentes forman una red compleja de carbohidratos conectados a través de enlaces de hidrógeno, y cuyas características, tales como la cristalinidad de la celulosa, la protección de la celulosa y la hemicelulosa por la lignina y el área limitada de superficie, la convierte en un material recalcitrante a la despolimerización, lo cual hace que su degradación se vuelva un desafío<sup>8</sup>.

Factores como los anteriores siguen impidiendo el crecimiento e implementación a gran escala de energías renovables, debido a que la inversión estimada que se necesitaría realizar para lograr lo establecido en el acuerdo de París es de 1700 billones de dólares para el año 2030<sup>9</sup>. Por esto, en el presente trabajo se propone trabajar con cobre, ya que es un metal económicamente accesible, amable con el medio ambiente y con propiedades químicas interesantes que podrían ser útiles en la búsqueda de soluciones a los problemas energéticos actuales.

# 1- ANTECEDENTES

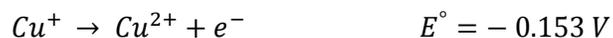
---

## 1.1 COBRE

El cobre y sus sales pueden ser altamente tóxicas para diferentes microorganismos y en grandes cantidades también puede ser venenoso para el ser humano. Sin embargo, en bajas concentraciones es un constituyente esencial de proteínas y enzimas. Los estados de oxidación más comunes están en el rango de 0 a 4 siendo el Cu(0) y el Cu(IV) los más limitados. El estado de oxidación III es relativamente común, pero solo en especies intermediarias en mecanismos de reacciones organometálicas. Los estados de oxidación Cu(I) y Cu(II) son por mucho los más abundantes, siendo el Cu(II) el más estable de los dos en condiciones normales.

### 1.1.1 Cobre (I)

La configuración electrónica del Cu(I) ( $[\text{Ar}]3d^{10}$ ) involucra una capa 3d llena y por ende es más simétrico en contraste con la simetría no esférica del Cu(II). También se espera que el ion Cu(I) sea más grande en comparación con el Cu(II). Los complejos de Cu(I) son diamagnéticos e incoloros, excepto donde el color es resultado del anión o de las bandas de transferencia de carga. Las estabilidades relativas del cobre (I) y el cobre (II) están indicadas por los siguientes potenciales de reducción:



Donde:



$$K = [\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^+]^2 = \sim 10^6$$

Las estabilidades relativas del Cu(I) y Cu(II) dependen de la naturaleza de los aniones y del disolvente en el que se encuentren<sup>10</sup>. Normalmente los compuestos estables de Cu(I) son insolubles en agua y son obtenidos generalmente mediante la interacción directa de los ligantes con los halogenuros de Cu(I) o mediante la reducción del correspondiente complejo de Cu(II)<sup>11</sup>.

### 1.1.2 Cobre (II)

El Cu(II) es el estado de oxidación más común del cobre y es particularmente estable en disolución acuosa. El Cu(II) posee una capa de orbital d incompleta de electrones, la configuración electrónica de esta especie es  $[\text{Ar}]3d^9$  y sus compuestos son predominantemente paramagnéticos y coloridos. En general los compuestos de Cu(II) son estables al aire a diferencia de las especies de Cu(I). Mientras que el ion Cu(I) es considerado un ácido de Lewis blando, el ion Cu(II) es considerado como un ácido duro debido a su deficiencia en electrones y pequeño tamaño en comparación. Los grupos funcionales que contienen nitrógeno como átomo donador son probablemente los mejores donadores electrónicos para el Cu(II), mientras que el haluro coordinante más común para este ion es el cloruro. Como todos los metales del primer periodo de transición con carga (II), el Cu(II) forma especies de coordinación con números de coordinación cuatro, cinco y seis principalmente, pero a diferencia de varios metales, los complejos de cobre se caracterizan por poseer un número grande de distorsiones en sus poliedros de coordinación. La mayoría de los complejos de Cu(II) hexacoordinados involucran una estructura rómbica octaédrica con un eje elongado. Para los compuestos pentacoordinados muy raramente se mantiene una geometría de pirámide de base cuadrada regular, normalmente existen distorsiones que involucran una elongación y una distorsión de la bipirámide trigonal.

Mientras que la separación de los niveles orbitales  $t_{2g}$  y  $e_g$  en un ambiente octaédrico dependerá de la geometría de cada complejo, las energías de los espectros electrónicos estarán determinadas por la diferencia energética entre el estado basal y los estados excitados, aunque se necesita un conocimiento preciso de la configuración de dichos estados para entender las reglas de selección que gobiernan la transición electrónica entre ellos<sup>11</sup>.

Cuando los iones Cu(II) están lo suficientemente separados entre sí ( $> 5 \text{ \AA}$ ), el momento magnético efectivo dado por  $\mu_{se} = \sqrt{4S(S + 1)}$  (donde “se” se refiere al momento magnético de *solo spin*) es de 1.73 BM; dicho valor es consistente con la presencia de un solo electrón desapareado. La posible interacción que se pueda dar entre dos átomos de cobre se da a través de otros átomos que puedan formar puentes conectando ambos centros metálicos. Los aniones más comunes que pueden formar puentes entre dos átomos de cobre son  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{OH}^-$ . El mecanismo del acoplamiento que se da en este tipo de dímeros no está del todo claro, pero se cree que sucede a través del traslape orbital entre el orbital d del electrón desapareado de los átomos de cobre y los orbitales s, p, o híbridos de los orbitales llenos de los átomos que forman el puente<sup>11</sup>. Esencialmente, todos los complejos de Cu(II) son azules o verdes debido a la presencia de una banda de absorción en la región de 600 a 900 nm del espectro electromagnético (16,600 a 11,100  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente). Muchos compuestos con Cu(II) que tienen como donadores aminas son de un color azul intenso debido a que las bandas de absorción se desplazan de números de onda menores a mayores (desplazamiento hipsocrómico).

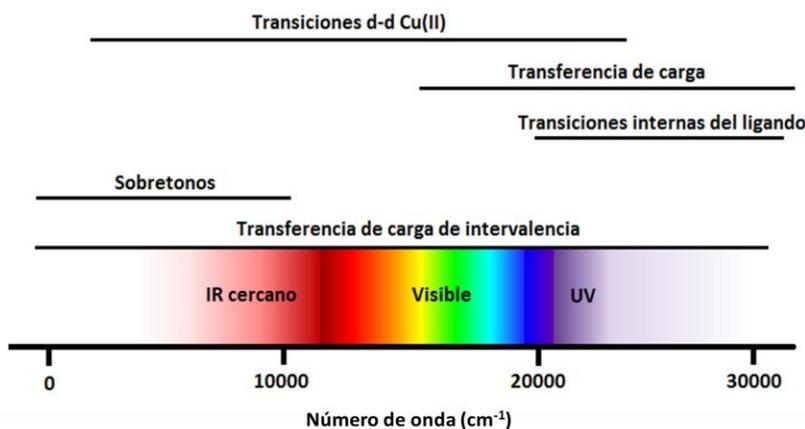


Figura 1. Rangos energéticos para Cu(II) para los diferentes tipos de transición

Las transiciones d-d en los complejos de Cu(II) tienden a ocurrir debajo de los 20,000  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que las transferencias de carga y las transiciones internas del ligante ocurren por debajo de los 30,000  $\text{cm}^{-1}$ ; estas últimas suelen ser más intensas que las d-d, y si son de suficiente baja energía pueden enmascararlas, lo cual sucede cuando hay presencia de ligantes con sulfuro<sup>12</sup>.

### 1.1.3 Propiedades redox del sistema Cobre(I)/(II)

El par redox del sistema Cobre(I)/(II) está asociado con tres procesos principales: (a) oxidación y reducción electrolítica, (b) desproporción y (c) la oxidación de Cu(I) con oxígeno molecular. Este último proceso es el responsable del papel catalítico del Cu(I) en la oxidación de moléculas orgánicas en sistemas biológicos. Una característica importante de la química de Cu(I) es su habilidad para llevar a cabo la absorción reversible de moléculas pequeñas como el oxígeno, el monóxido de carbono y alquenos. La relevancia principal de esta interacción entre Cu(I) y O<sub>2</sub> es su rol como posible especie intermediaria en diferentes procesos biológicos.

## 1.2 METALOEENZIMAS

Las proteínas tienen muchas variantes, por ejemplo, aquellas que contienen únicamente residuos de aminoácidos en su constitución son llamadas proteínas simples, como en el caso de la enzima ribonucleasa. También existen proteínas en cuya constitución se encuentran componentes químicos diferentes a residuos aminoácidos, las cuales son nombradas proteínas conjugadas. La parte que no está formada por aminoácidos se llama usualmente grupo prostético. Las proteínas conjugadas son clasificadas según la naturaleza química de su grupo prostético, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos y ejemplos de proteínas conjugadas<sup>13</sup>

<b>Proteínas Conjugadas</b>		
<i>Clase</i>	<i>Grupo Prostético</i>	<i>Ejemplo</i>
Lipoproteínas	Lípidos	β <sub>1</sub> -Lipoproteína de sangre
Glicoproteínas	Carbohidratos	Inmunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína de leche
Hemoproteínas	Grupo hemo	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleótidos	Succinato deshidrogenasa
Metaloproteínas	Hierro	Ferritina

Dentro de las proteínas conjugadas se encuentran las enzimas llamadas oxigenasas. Estas catalizan reacciones oxidativas en donde átomos de oxígeno son integrados a un particular tipo de sustrato. Dentro de esta categoría de enzimas se encuentran las dioxigenasas (en donde ambos átomos de oxígeno provenientes de O<sub>2</sub> son incorporados al sustrato orgánico) y las monooxigenasas (sólo un átomo de oxígeno proveniente de O<sub>2</sub> es incluido al sustrato orgánico mientras que el otro es reducido a una molécula de H<sub>2</sub>O)<sup>13</sup>. Las enzimas monooxigenasas son más abundantes y más complejas en su mecanismo de reacción.

Algunas de las muchas monooxigenasas se encuentran dentro de la clase de las metaloproteínas, en particular son interesantes para el objetivo de este trabajo las metaloenzimas de cobre nombradas dopamina β-monooxigenasa (DβM), la monooxigenasa α-hidroxilante de peptidiglicina (PHM) y las monooxigenasas líticas de polisacáridos (PLMO).

### 1.3 MONOOXIGENASAS DE CU

#### 1.3.1 Monooxigenasa α-hidroxilante de peptidiglicina (PHM)

Tanto la enzima DβM como la PHM son se encuentran en eucariontes superiores en diferentes compartimientos celulares. La enzima PHM es uno de los dos dominios independientes que conforman a la Peptidiglicina α-amidante monooxigenasa (PAM) y es la encargada de catalizar una de las dos reacciones consecutivas que ocurren en esta enzima<sup>14</sup>. La PHM cataliza la hidroxilación estereoespecífica del carbono α de sustratos de peptidiglicina en la ruta de la biosíntesis de hormonas peptídicas, Figura 2. Este dominio es dependiente de ascorbato, el cual actúa como un reductor exógeno y contiene en su sitio activo dos átomos de cobre en estado de oxidación +2 antes de la reducción, cada uno de los cuales acepta un electrón de los dos requeridos para que se lleve a cabo la hidroxilación. A pesar de que ambos átomos de cobre participan en la catálisis, estos se encuentran a una distancia de 11 Å por lo que no se forma un centro binuclear<sup>14</sup> y cada uno de sus correspondientes ambientes de coordinación es único. Mediante estudios espectroscópicos se determinó que los átomos de cobre de la PHM en disolución se encuentran

predominantemente tetracoordinados con alguna contribución secundaria de especies pentacoordinadas.

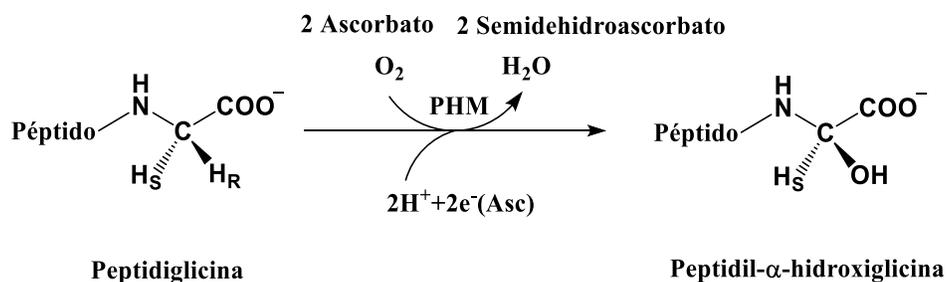


Figura 2 Mecanismo de reacción de la enzima PHM<sup>15</sup>

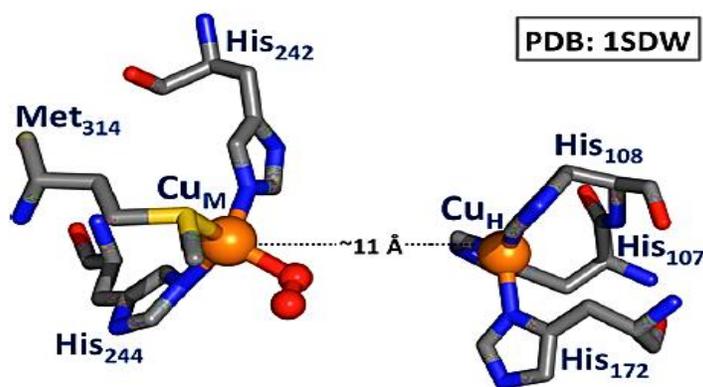


Figura 3 Fragmento de la estructura de rayos X del sitio activo de la enzima PHM con  $\text{O}_2$  coordinado<sup>16</sup>

En el sitio activo de la enzima se encuentran los dos átomos de cobre que se han nombrado  $\text{Cu}_\text{H}$  y  $\text{Cu}_\text{M}$ . El  $\text{Cu}_\text{H}$ , está coordinado por tres residuos de histidina y es el sitio responsable de la transferencia electrónica, mientras que el  $\text{Cu}_\text{M}$  se encuentra coordinado por una metionina y dos residuos de histidina. En este último es donde se lleva a cabo la activación de oxígeno y la hidroxilación del sustrato, ver Figura 3<sup>16</sup>.

El mecanismo de reacción propuesto para estas enzimas se ilustra en la Figura 4. El primer paso es la reducción de los dos átomos de cobre por dos moléculas de ascorbato seguido por la unión del oxígeno molecular al  $\text{Cu}_\text{M}$ , donde se activa pasando de una especie  $\text{Cu}(\text{I})\text{-O}_2$  a una  $\text{Cu}(\text{II})\text{-O}_2^*$ . Esta especie cobre-superóxido es la responsable de la transferencia de un

átomo de hidrógeno del sustrato para formar el complejo hidroperoxo (Hp en Figura 4) y el radical sustrato. A partir de este punto, el mecanismo de reacción puede tomar dos caminos; en el primero, la ruptura homolítica del enlace O-O es inducida por la presencia de un protón y por la transferencia electrónica del Cu<sub>H</sub>(I), resultando en una molécula de agua y en un intermediario oxilo (Cp), que posteriormente se enlaza con el radical sustrato. Esta especie rompe su enlace Cu(II)-O al protonarse, dando como productos la especie hidroxilada y la enzima de Cu(I). En el segundo camino, la especie Hp reacciona directamente con el sustrato radical rompiendo el enlace O-O e hidroxilando al sustrato inmediatamente, dando como resultado el producto y la especie Cp que puede ser reducida y protonada hasta dar como producto agua y la enzima de Cu(I)<sup>17</sup>.

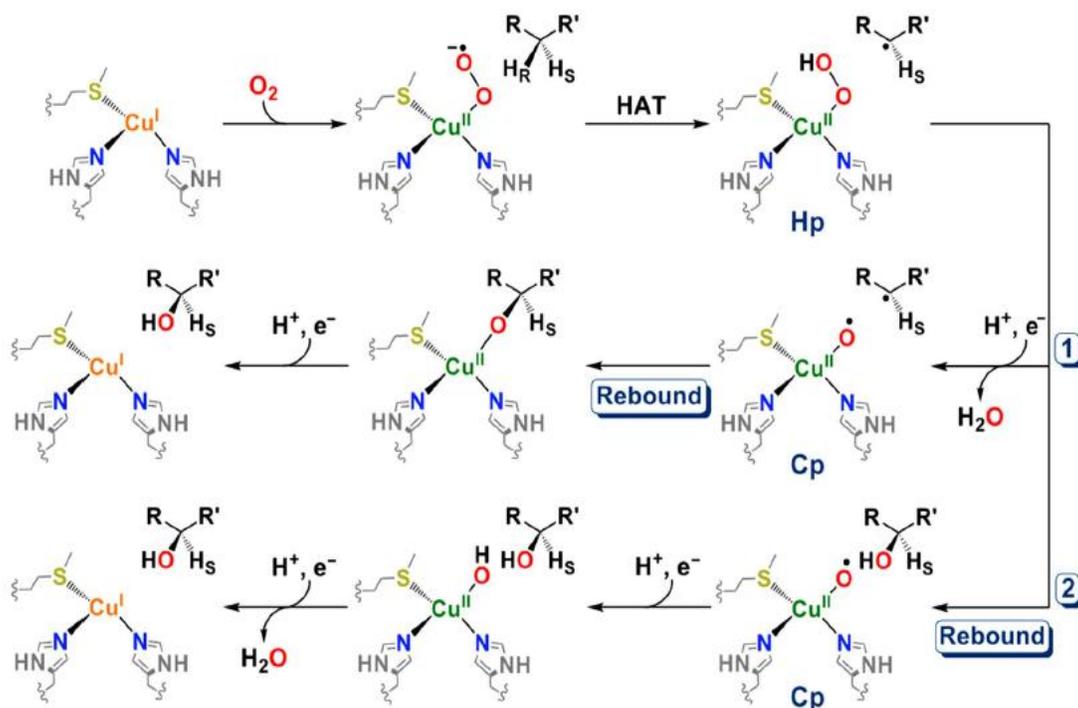


Figura 4 Mecanismo de reacción propuesto para la enzima PHM<sup>16</sup>

También se ha demostrado que PHM puede catalizar la hidroxilación de sustratos de peptidiglicina partiendo de la especie de cobre oxidada y utilizando peróxido de hidrógeno como fuente única de oxígeno<sup>18</sup>, e incluso se propone un mecanismo en el cual la especie formada por la interacción Cu(II) – peróxido, pueda reducir también sitios activos de cobre,

que en contacto con oxígeno puedan formar especies Cu-O para seguir el mecanismo de reacción propuesto inicialmente.

### 1.3.2 Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO)

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs por sus siglas en inglés) son enzimas que se encuentran en hongos, bacterias, virus, invertebrados y algas y tienen como función romper oxidativamente enlaces de polisacáridos para que estos organismos puedan utilizarlos más eficientemente. Su sitio activo posee un átomo de cobre central con estado de oxidación +2 antes de su reducción, y dos histidinas que poseen 3 nitrógenos donadores, dos de ellos pertenecientes al anillo de histidina y el otro proveniente de la amina terminal; este ordenamiento está denominado como abrazo de histidina (Figura 5)<sup>19</sup>. Adicionalmente, se puede observar un residuo de tirosina que, si bien no está coordinado al átomo de cobre, su presencia es objeto de discusión ya que puede conferir estabilidad al intermediario reactivo.

Existen algunas diferencias entre las enzimas dependiendo de la especie de la que provengan, por ejemplo, en el caso de las LPMO bacterianas se puede observar que el átomo de nitrógeno del anillo de histidina no se encuentra metilado, a diferencia de las LPMO provenientes de hongos. Estas diferencias pueden ocasionar variaciones en la reactividad de la enzima: por ejemplo, se piensa que esta metilación incrementa la constante de disociación de la histidina en 0.5 unidades, lo que se traduce en un incremento en la afinidad hacia Cu(II)<sup>20</sup>.

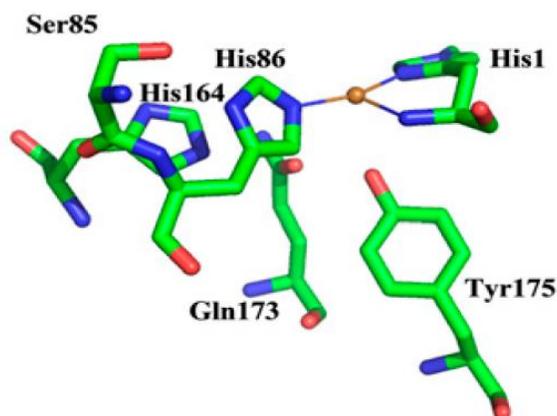


Figura 5. Sitio activo de la LPMO AA9 siendo el átomo central naranja la representación del átomo de Cu<sup>19</sup>

Estudios previos han demostrado que, en disolución, el átomo de Cu de la LPMO en su estado oxidado está coordinado por los tres átomos de nitrógeno y una o dos moléculas de agua, mientras que en su estado reducido posee una coordinación trigonal plana coordinado a los tres átomos de nitrógeno únicamente. También se sabe que la transferencia electrónica entre el Cu(I) y el O<sub>2</sub> se da mediante un mecanismo de esfera interna facilitado por un enlace químico para obtener la formación de una especie reactiva cobre-oxígeno, siendo Cu(I)-O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> la más aceptada y la cual actuaría como intermediaria en la oxidación del polisacárido. Se ha propuesto también un mecanismo mediante reacciones tipo Fenton, sin embargo los cálculos teóricos favorecen la formación de un estado intermediario cobre-oxígeno sobre la formación de radicales libres<sup>19</sup>.

Las LPMO dependientes de cobre utilizan oxígeno molecular y una fuente de electrones para romper el enlace C-H en las posiciones 1 o 4 de glucósidos, incorporando un átomo de oxígeno y rompiendo finalmente el enlace glucosídico. En la Figura 6 se ilustra el posible mecanismo de reacción, en donde la LPMO hidroxila alguna de las posiciones mencionadas, formando especies intermediarias inestables que posteriormente sufrirán una eliminación. En la Figura 6 se muestra esquemáticamente el caso de activación de la posición C1 que resulta en una aldono lactona, y en el caso de la posición C4 en una cetoaldosa. También puede ocurrir la consecuente hidrólisis de las aldono lactonas para formar ácidos aldónicos<sup>21</sup>.

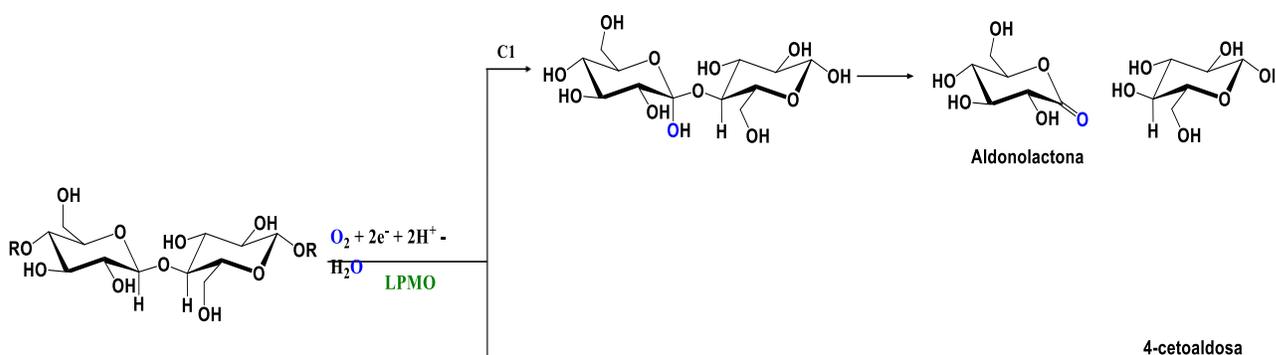


Figura 6. Hidroxilación en C1 o C4 del enlace glucosídico debido a la acción de la enzima LPMO<sup>21</sup>

Para que la reacción se lleve a cabo es necesaria una fuente de electrones para reducir el complejo a Cu(I); algunas de las posibles fuentes pueden ser lignina o ácido gálico encontrados en la pared celular de las plantas, o también existe la posibilidad de que sea una macromolécula como la celulosa deshidrogenasa secretada por el mismo hongo<sup>22</sup>. Sin embargo, debido a que el sitio activo de la enzima necesita estar en contacto con el sustrato para llevar a cabo la oxidación, es poco probable que la transferencia electrónica se dé por contacto con alguna de estas moléculas, en especial la celulosa deshidrogenasa, por lo que es probable que la transferencia electrónica se de a través de la parte proteica de la enzima<sup>21</sup>; no obstante, la fuente de electrones dependerá de la naturaleza específica de la enzima.

El grupo de Phillips<sup>22</sup> y colaboradores propusieron el siguiente mecanismo de reacción, el cual es análogo al de las enzimas PHM y DβM, previamente descrito. En el primer paso se da la reducción del átomo de cobre y la posterior activación de la molécula de oxígeno para formar la especie Cu(II)-superoxo, después dicha especie abstraerá un átomo de hidrógeno del sustrato para formar la especie Cu(II)-hidroperoxo y un sustrato radical. A continuación la especie hidroperoxo se reduce nuevamente y el enlace O-O se rompe para formar la especie radical Cu(II)-oxil, (Cu(II)-O<sup>\*</sup>) que reaccionará con el sustrato radical para formar el producto aniónico y la enzima vuelve a su estado original, Figura 7. Existe también otro camino propuesto por el grupo de Solomon<sup>23</sup> y colaboradores, en el cual la especie hidroperoxo reacciona con el radical sustrato para obtener el producto hidroxilado y la especie Cu(II)-oxilo que posteriormente reaccionará con 2 protones y un electrón para liberar agua y la especie libre de Cu(II). Tanto la especie Cu(II)-superoxo como la Cu(II)-hidroperoxo han sido observadas y caracterizadas en enzimas y en compuestos de coordinación como modelos<sup>24,25,26,27</sup>.

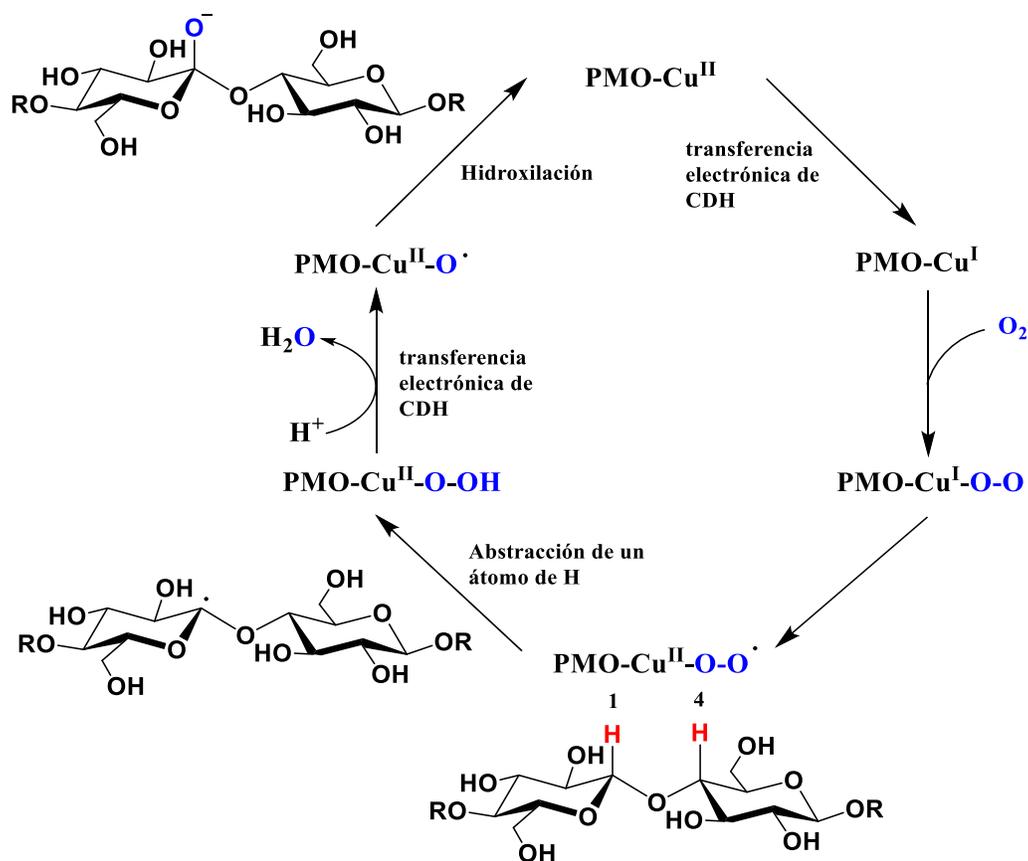


Figura 7. Mecanismo propuesto para la enzima LPMO<sup>22</sup>

Conocer las características estructurales de los sitios activos es de suma importancia para comprender el mecanismo de reacción que se lleva a cabo en ellos y también para proponer sistemas bioinspirados que puedan tener potenciales aplicaciones. Para comprender más acerca del funcionamiento de estas enzimas, a su vez, se han diseñado y estudiado modelos biomiméticos de cobre con diferentes ligantes en diversos grupos de investigación que se mencionarán en el siguiente capítulo.

#### 1.4 INFLUENCIA DE LOS LIGANTES EN SISTEMAS BIOMIMÉTICOS

Uno de los mayores problemas al intentar sintetizar un ligante funcional que pueda mimetizar el sitio activo de enzimas monooxigenasas, es que la mayoría de las veces los aductos LCu(II)-O<sub>2</sub> se dimerizan con mucha facilidad formando especies dinucleares de cobre

punteadas por átomos de oxígeno o en otras conformaciones según el sistema<sup>15</sup>, por lo que el ligante a diseñar debe de estar pensado para evitar la dimerización y que pueda mimetizar correctamente el sitio activo de la enzima. Tolman y colaboradores sintetizaron tres ligantes modelo mostrados en la Figura 8 en el año 2002<sup>28,29</sup>.

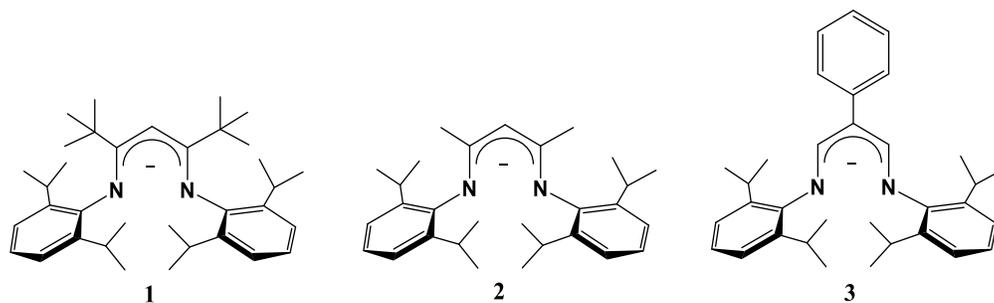


Figura 8 Beta-dicetoiminatos propuestos por Tolman y colaboradores<sup>29</sup>

Estos ligantes llamados  $\beta$ -dicetoiminatos mostraron que a pesar de tener grupos 2,6-diisopropilfenil idénticos y solo cambiar uno de los sustituyentes, esta pequeña modificación es suficiente para cambiar el tipo de aducto formado por los complejos de cobre en presencia de  $O_2$ . Los ligantes etiquetados como **1** y **2** mostraron que gracias al impedimento estérico producido por los sustituyentes metilo y terbutilo, las especies diméricas no se formaron a diferencia que con el ligante **3** en donde si se observó la formación de dímeros.

En este mismo grupo de investigación, también se sintetizaron ligantes en donde se introdujeron grupos tioéter<sup>30</sup>. Cabe mencionar que la presencia de residuos tioéter en el sitio activo tanto de DBM como de PHM es poco común ya que este tipo de enlace no está presente en otras proteínas de cobre que activan oxígeno, por lo que la incorporación de estos grupos en el diseño de ligantes es interesante para conocer cuál es su papel en el mecanismo de reacción. Los resultados obtenidos en este grupo de investigación<sup>30</sup> los llevan a teorizar la utilidad del residuo de metionina presente en la PHM; en primer lugar se observó que puede estabilizar las especies de Cu(I) y por ende desfavorecer el enlace del  $O_2$ , por lo que su funcionalidad puede ser reguladora para evitar la innecesaria formación de especies oxidantes cuando no hay presencia de sustrato o para controlar mejor la transferencia electrónica. Otra de las posibles funciones del residuo metionina es el de favorecer la formación de aductos con  $O_2$  en posición terminal (*end-on*) que en posición lateral (*side-on*). Existe también la

posibilidad de que la presencia de metionina ayude a estabilizar mejor las especies Cu(II)-oxilo, que están entre los intermediarios propuestos en el mecanismo de reacción.

Otro de los modelos utilizados para mimetizar el sitio activo de la PHM son los ligantes tripodales. Uno de los modelos tripodales propuestos es el del grupo de investigación de Itoh<sup>31</sup>, que forma compuestos monoméricos de cobre (Figura 9). Estos ligantes pueden estabilizar complejos de metales de transición en los que se evita la dimerización debido al gran impedimento estérico; sin embargo, también da lugar a que el complejo de cobre interactúe con una molécula de dioxígeno. Estos ligantes son solubles en disolventes no polares ya que tienen sustituyentes hidrofóbicos. Igualmente se comprobó vía espectroscopía UV-visible que los aductos de cobre oxígeno son formados en una posición terminal.

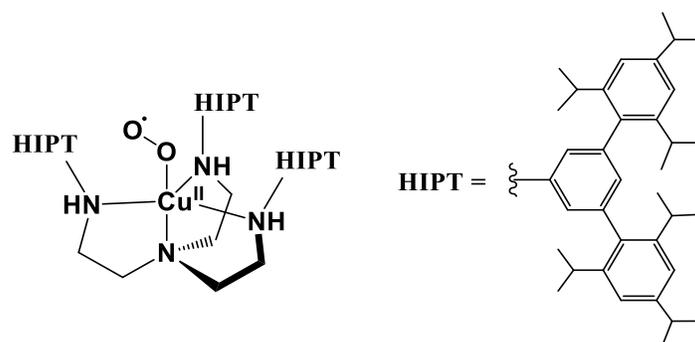


Figura 9. Ligantes tripodales empleados por el grupo de Itoh<sup>31</sup>

A pesar de que muchos de estos modelos poseen aminas polidentadas, piridinas o grupos pirazolilo, pocos ligantes reportados han incorporado como principales donadores imidazoles, los cuales son relevantes biológicamente en la enzima. Bajo esta premisa, el grupo de investigación de K. M. Nicholas<sup>32</sup> sintetizó los ligantes presentados en la Figura 10.

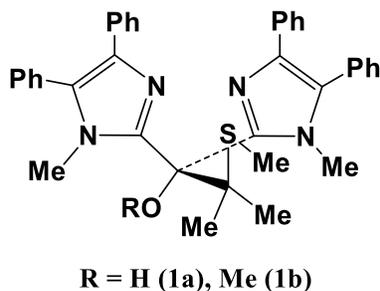


Figura 10. Ligantes tripodales tipo bis(imidazol) tioéter<sup>32</sup>

Los complejos de Cu(I) obtenidos con estos ligantes dan lugar a estructuras dinucleares de Cu(II) pentacoordinadas al reaccionar con O<sub>2</sub>, como se muestra en la Figura 11. En el complejo 2a tanto el Cu como el átomo de S sufren oxidación, en contraste con lo que ocurre en el sitio activo de PHM y DβM donde la metionina no es oxidada. El compuesto 2b forma un dímero puentado por un enlace ya sea μ-oxo coordinado a Cu(III) o μ-hidroxo coordinado a Cu(II).

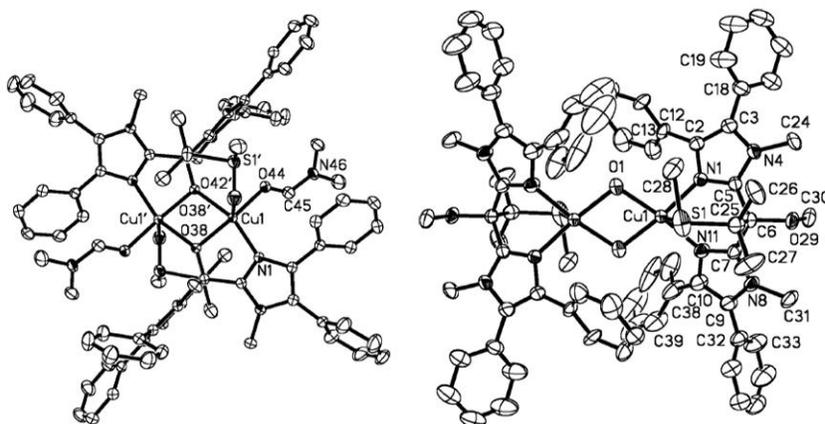


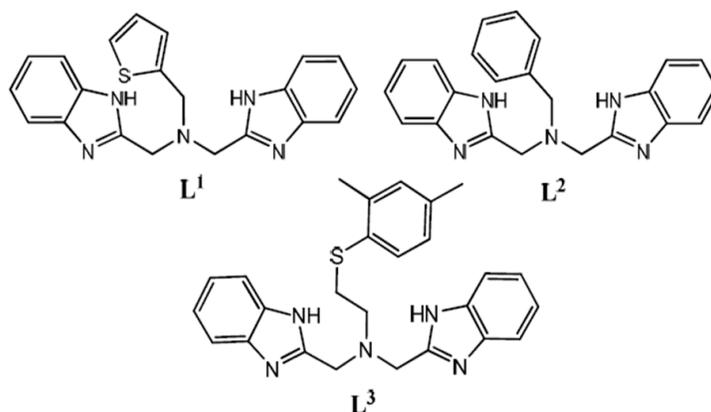
Figura 11 Aductos formados de los ligantes tripodales bis(imidazol) tioéter. Icq (2a), der (2b)<sup>32</sup>

En un estudio posterior del mismo grupo de investigación, se sintetizaron ligantes similares con pequeñas modificaciones. De acuerdo con los resultados obtenidos en estos trabajos, se pudo concluir que a pesar de que se piensa que las especies de tipo N<sub>2</sub>S-Cu con grupos imidazol podrían reducir al oxígeno de una forma más eficiente que las especies N<sub>3</sub>-Cu, aún existen diferencias entre los modelos sintéticos y los sitios activos de las enzimas. Así también, notaron que funcionalizar los ligantes con grupos muy voluminosos como fenilos no asegura que se obtenga una mejor reactividad hacia la reducción de oxígeno<sup>33</sup>.

## 1.5 ANTECEDENTES DIRECTOS

Dentro de nuestro grupo de investigación se han sintetizado y caracterizado ligantes derivados del bencimidazol con el objetivo de mimetizar el ambiente de coordinación dentro de los sitios activos de las enzimas mencionadas anteriormente<sup>16,19,20</sup>. Algunos de los ligantes propuestos para emular el sitio activo de la PHM contienen dos grupos bencimidazol que proporcionan mayor protección estérica que los imidazoles. Igualmente, la capacidad

donadora del bencimidazol es similar a la del imidazol en la histidina, esto como consecuencia de la sustitución de un grupo metileno en la posición 2 del bencimidazol.



**Figura 12** Ligantes previamente sintetizados y caracterizados por Solano<sup>34</sup>

Esta aseveración se encuentra respaldada con el valor de  $pK_a$  (6.15)<sup>34</sup> del par 2-metilbencimidazolio/2-metilbencimidazol que es cercano al valor de  $pK_a$  de la histidina que se encuentra alrededor de los 6.5<sup>35</sup>.

Recientemente se sintetizó un compuesto de cobre con el objetivo de mimetizar la actividad de la enzima LPMO frente a celobiosa como un modelo de polisacárido recalcitrante<sup>36</sup>, como se muestra en la Figura 13.

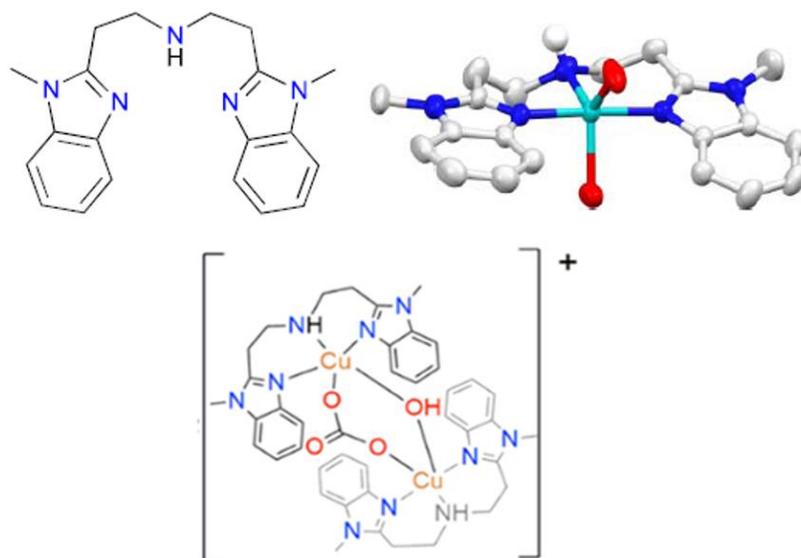


Figura 13. Ligante, complejo y especies identificadas por Neira *et al.* <sup>36</sup>

En este caso el ligante tiene dos sustituyentes bencimidazol puenteados por dos grupos metileno y un átomo de nitrógeno, adicionalmente el nitrógeno del bencimidazol se encuentra metilado a diferencia de los mostrados en la Figura 12. A pesar de que se forman dímeros, pruebas de reactividad con un sustrato modelo como la celobiosa (dímero de glucosa) mostraron resultados positivos para la degradación oxidativa. Por ello, se espera que este tipo de ligantes puedan ser una alternativa interesante para la degradación de biomasa, de manera análoga a como lo hacen las enzimas LPMO.

## 1.6 IMPORTANCIA DEL PROYECTO

Uno de los alicientes del proyecto es encontrar una metodología viable para la degradación de celulosa que pueda competir con las metodologías establecidas que se detallan a continuación. Debido a que la celulosa es un polímero recalcitrante, el paso limitante de la generación de bioetanol a partir de biomasa es el pretratamiento aplicado a la materia prima, así como su posterior hidrólisis y fermentación.

El pretratamiento es el paso más complicado y costoso de la conversión de biomasa a biocombustible y sus principales objetivos son eliminar la lignina y la hemicelulosa de la matriz, romper la cristalinidad de la celulosa e incrementar la superficie de reacción<sup>37</sup>.

Actualmente, existen cuatro tipos de pretratamiento que se utilizan para tales fines, el pretratamiento físico, el químico, el fisicoquímico y el biológico, cada uno con sus particularidades, sus ventajas y desventajas.

Los métodos físicos incluyen la molienda mecánica, la termólisis y la irradiación, sin embargo, estos tratamientos consumen mucha energía y por ende no son muy adecuados para procesos comerciales. Los tratamientos químicos utilizan ácidos o bases para disminuir la cristalinidad de la celulosa; los ácidos más utilizados son  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $H_3PO_4$  y  $HNO_3$ , pero una de sus desventajas es que se necesitan altas temperaturas para que el resultado sea favorecedor y que se contienen subproductos inhibidores de la fermentación. El tratamiento fisicoquímico es una combinación de los dos métodos mencionados anteriormente, que resulta en mejores resultados. Por último, el tratamiento biológico se lleva a cabo con microorganismos, principalmente hongos o también con enzimas; no obstante, este tipo de tratamientos a pesar de ser muy efectivos, resultan muy costosos<sup>38</sup>.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es utilizar los ligantes propuestos por nuestro grupo de investigación como plataforma de complejos de cobre como modelo inorgánico para mimetizar el sitio activo de las enzimas PHM y LPMO, tanto estructuralmente como en su actividad catalítica. Los ligantes tendrán dos residuos bencimidazólicos que emularán a la histidina presente en el sitio activo, al igual que un residuo con un átomo de azufre en diferente posición para evaluar cómo influye en la actividad el residuo de metionina presente en las enzimas. Se evaluarán en un primer paso las reactividades de cada complejo de cobre(II) frente a diferentes agentes oxidantes y posteriormente se realizarán pruebas con celulosa como sustrato, para comprobar que se lleva a cabo la oxidación degradativa.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar y caracterizar los ligantes derivados de bencimidazol.
- Sintetizar y caracterizar de los complejos de Cu(II) con cada uno de los ligantes propuestos.
- Evaluar la actividad que tiene cada uno de los complejos de Cu(II) frente a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N como agentes oxidantes con ayuda de técnicas espectroscópicas como espectroscopía UV-visible, Resonancia Paramagnética Electrónica y espectrometría de masas.
- Realizar pruebas de degradación catalítica con los complejos, con los diferentes agentes oxidantes propuestos y celulosa.

### **3 HIPÓTESIS**

---

Los complejos de cobre planteados reaccionarán con agentes oxidantes tales como oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, generando así intermediarios reactivos cobre-oxígeno como se ha observado que sucede en las enzimas PHM y PLMO. Los intermediarios podrán ser identificados por diferentes técnicas analíticas, haciendo énfasis en espectroscopía UV-visible a baja temperatura, espectrometría de masas por electrospray y de ser posible mediante espectroscopía infrarroja a baja temperatura. Los intermediarios reactivos serán capaces de degradar celulosa para de esta manera aprovechar los nuevos compuestos para explotar biomasa.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

---

### 4.1 GENERAL

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico de proveedores comerciales y se utilizaron sin tratamiento previo. El 1-BOC-2-clorometilbencimidazol fue sintetizado según lo reportado en la literatura<sup>39</sup>, y tanto los complejos como los ligantes se sintetizaron con los procedimientos anteriormente reportados por el grupo de investigación<sup>34</sup>. Los disolventes se obtuvieron de proveedores comerciales y en los casos necesarios se destilaron por métodos convencionales<sup>40</sup>. Para los análisis de RMN se utilizaron como disolventes  $\text{CDCl}_3$  99.8% y  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  99.8%, obtenidos de Sigma-Aldrich.

### 4.2 EQUIPOS

Los puntos de fusión se tomaron con un aparato Electrothermal Mel-Temp y no se corrigieron. Los espectros de RMN se obtuvieron a 300 MHz con un equipo Bruker Avance en disolventes deuterados con tetrametilsilano como referencia interna, o referenciados frente a la señal residual del disolvente. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27 entre 4000 y  $400\text{ cm}^{-1}$  como pastilla de KBr. Los espectros de masas mediante el método FAB (Fast Atom Bombardment) se obtuvieron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-SX-102a con un voltaje de aceleración de 10 keV en una matriz de alcohol nitrobenílico y átomos de Xenon a 6 keV. Los espectros de masas con el método ESI (Electrospray Ionization) se obtuvieron con un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000 con ionización química a presión atmosférica y trampa de iones. Los análisis elementales fueron adquiridos con un aparato Thermo Scientific/Flash 2000. Los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) se adquirieron en tubos de cuarzo a una temperatura de 77 K con un espectrómetro JEOL JES-TE300 en una frecuencia de banda X (9.4 GHz) con un campo de modulación de 100 KHz. La medida externa del campo magnético estático se realizó con un gaussómetro de precisión JEOL ES-FC5. Para obtener las mediciones a baja temperatura se utilizó un controlador de temperatura variable ITC. Para la adquisición y manipulación de los espectros se utilizó el programa ESPRIT-328, v.1-916.

Las mediciones de difracción de rayos X (DRX) se realizaron con el difractómetro de monocristal marca Bruker, modelo D8 Venture, con microfuelle de cobre y molibdeno. Las estructuras se resolvieron utilizando el programa SHELXS-97. La voltamperometría cíclica se llevó a cabo con un potenciostato CH Instruments 1200b, en una celda de tres electrodos con un electrodo de trabajo de carbón vítreo de 3 mm de diámetro, alambre de platino como contra-electrodo y un electrodo de referencia de  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  con una disolución de bromuro de tetra-n-butilamonio ( $\text{Bu}_4\text{NBr}$ ). El electrolito soporte fue hexafluorofato de tetra-n-butilamonio ( $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ )  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  en 5 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  grado Biotech. Los potenciales medidos al electrodo de trabajo están referenciados al par ferrocinio/ferroceno ( $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ ). La medición del potencial del par  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  se realizó adicionando ferroceno a la disolución de electrolito al término de cada experimento. Los experimentos de HPLC-MS se llevaron a cabo con un cromatógrafo de gases Agilent 7890B, el método de ionización fue por electrospray.

#### 4.3 DEGRADACIÓN DE CELULOSA A ESCALA PREPARATIVA

Las disoluciones blanco se dejaron en agitación durante 24 horas antes de medirse. Las disoluciones de las pruebas de degradación con los complejos enlistados en la Tabla 2 y el agente oxidante se dejaron reaccionar durante periodos de 24 y 72 horas; en el primer caso se agregaron 30 mg de celulosa en todos los experimentos con 1 equivalente de complejo y 10 equivalentes de agente oxidante, mientras que para el segundo caso se doblaron las cantidades, agregando 2 equivalentes de complejo y 20 de agente oxidante. Los resultados obtenidos en los tiempos de retención y en los espectros de masas fueron virtualmente los mismos, cambiando únicamente el porcentaje de celulosa sobrante en cada experimento.

**Tabla 2.** Complejos utilizados en el estudio de la degradación de celulosa

$[\text{CuL}^1(\text{ClO}_4)_2](\text{CH}_3\text{CN})$
$[\text{CuL}^2](\text{ClO}_4)_2$
$\{[\text{CuL}^3(\text{ClO}_4)_2](\text{H}_2\text{O})_2\}_n$
$[\text{CuL}^4](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

La síntesis y caracterización de los ligantes y sus correspondientes complejos ha sido reportada parcialmente<sup>34</sup>, mientras que en este trabajo se propone un ligante completamente nuevo, cuyo esquema de síntesis se presenta a continuación:

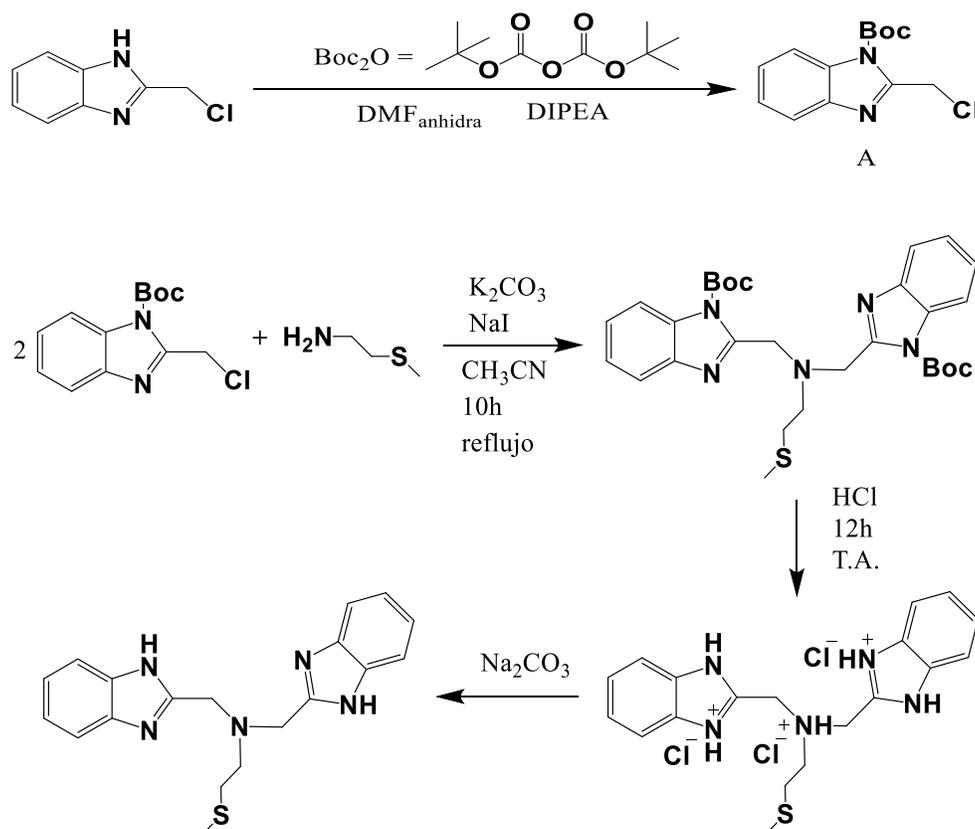


Figura 14. Condiciones de la reacción de formación del ligante L<sup>134</sup>

Los procedimientos y resultados de esta síntesis y caracterización se puntualizan a continuación:

**Síntesis de 1-BOC-2-clorometilbencimidazol (A):** En un matraz bola provisto de agitación se colocaron 1.5 g (0.009 mol) de 2-clorometilbencimidazol junto con 2.15 g (0.0098 mol) de di-terbutil dicarbonato suspendidos en 4.5 mL de DMF seco. Una vez en agitación se

adicionó a la mezcla de reacción 0.16 mL (0.0004 mol) de N,N-diisopropiletilamina y se dejó en agitación a 25°C durante 5 h. Posteriormente se adicionaron 0.43 g (0.0019 mol) de di-terbutil dicarbonato y se aumentó la temperatura a 40°C y se agitó durante 6 h. Una vez pasado este tiempo, se agregó a la mezcla de reacción 1.3 mL de agua destilada y se continuó la agitación alrededor de 2 h a 40°C. La mezcla de reacción se concentró a vacío manteniendo la temperatura en 40°C a aproximadamente la mitad de volumen. La temperatura se redujo a 22°C, se agregaron 0.5 mL de agua destilada y 1 mL de DMF y se continuó la agitación durante 2 h más. En este periodo de tiempo se formó un precipitado sólido de color amarillo, mismo que se filtró al vacío y se enjuagó con agua destilada. El rendimiento de esta reacción fue del 80% obteniendo 1.9 g del producto final. Los valores de RMN coinciden con los dados en la literatura: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.73 (s, 9H), 5.06 (s, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.37 (dd, 1H  $J=4.1, 0.9$  Hz)), 7.98 (dd, 1H,  $J=4.1, 0.9$  Hz).

**Síntesis de bis(2-metilbencimidazol)- 2-etilaminometiltioéter ( $\text{L}^1$ ):** A una disolución de acetonitrilo (40 mL) que contenía 1.5 g (0.0056 mol) de 1-BOC-2-clorometilbencimidazol, se agregaron 0.26 mL (0.0028 mol) de 2-(metiltio)etilamina, 1.16 g (0.0084 mol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y una cantidad catalítica de NaI (~20 mg) y se colocó en reflujo durante 10 h. Posteriormente se añadió a la mezcla de reacción HCl hasta llegar a  $\text{pH}=3$  y se dejó en agitación durante 12 h a temperatura ambiente. El sólido resultante cristaliza por evaporación lenta disolvente. Los cristales obtenidos se redisolvieron en agua, se agregó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hasta llegar a  $\text{pH}=11$  y el precipitado se filtró y se secó a alto vacío. Rendimiento 76%, p.f. 127°C, IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3053, 2913, 2824, 1674, 1618, 1589, 1532, 1487, 1426 (intensa), 1346, 1307, 1269 (intensa), 1219, 1112, 1020, 997, 929, 842, 738 (intensa), 616, 475, 430  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=$  2.04 (s, 3H), 2.73 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 3.97 (s, 4H), 7.25 (m, 4H), 7.59 (m, 4H) ppm. RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=$  15.34, 32.50, 51.23, 52.70, 114.89, 122.45, 151.25 ppm.

Una vez obtenido el ligante se realizó su caracterización. A continuación, se presentan los espectros de RMN, espectrometría de masas DART, IR, análisis elemental y DRX de monocristal.

En el caso del espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) para  $\text{L}^1$ , Figura 15, se observa la señal correspondiente a los grupos metileno con un desplazamiento alrededor de 4 ppm; en la región aromática se identifican únicamente dos señales correspondientes al bencimidazol debido a que son equivalentes. Para el grupo tioéter se observa un desplazamiento a campo alto de protón vecinal al S, el cual es un singulete mientras que el metileno cercano al nitrógeno, también singulete, tiene un desplazamiento a un campo un poco más bajo. En la Figura 16 se muestra el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

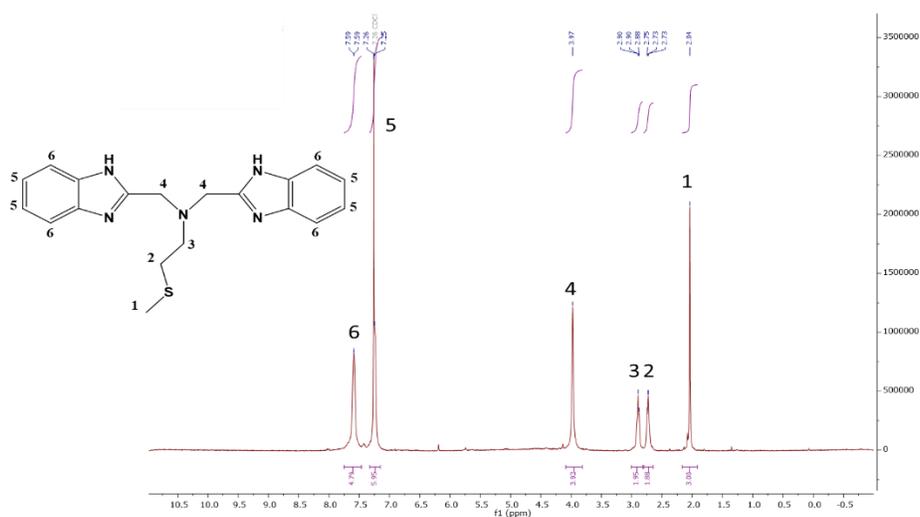


Figura 15. Espectro de RMN de protón del ligante  $\text{L}^1$



Figura 16. Espectro de RMN de carbono del ligante  $\text{L}^1$

El espectro de masas muestra un pico correspondiente a la masa del ligante, mientras que en el espectro de IR se observan bandas que van de 1220-1020  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se asignan al grupo bencimidazol, cuyo espectro (en rojo) tiene tres bandas de intensidad semejante alrededor de 1069 (flexión HN-CH), 1240 (flexión) y 1258 (tensión)  $\text{cm}^{-1}$  41.

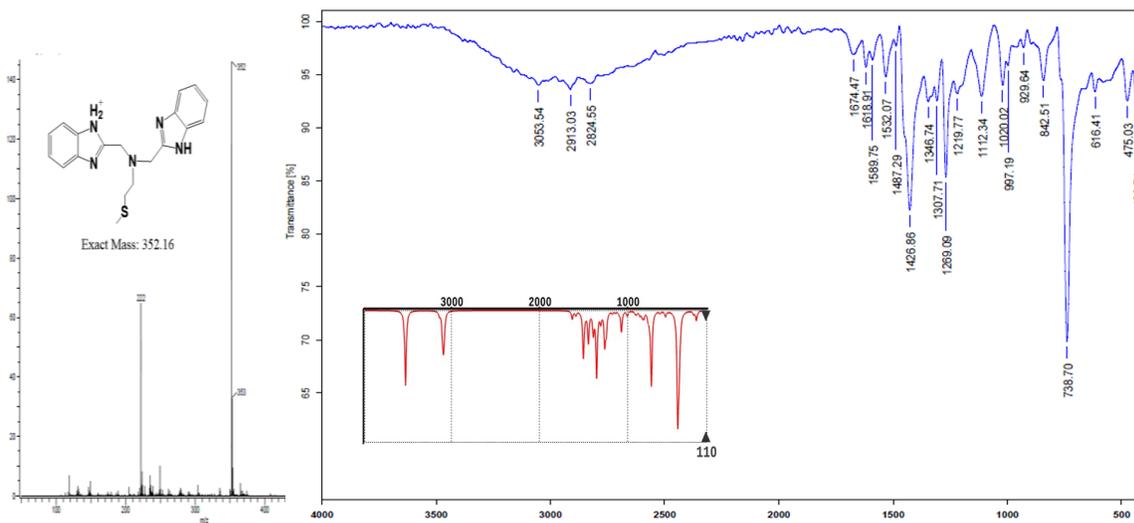


Figura 17. Espectro de masas y espectro de infrarrojo para el ligante CuL<sup>1</sup>

En la Figura 18 se ilustran los cuatro ligantes con los que se trabajó en este proyecto junto con las etiquetas que se utilizarán para nombrarlos a lo largo de este documento.

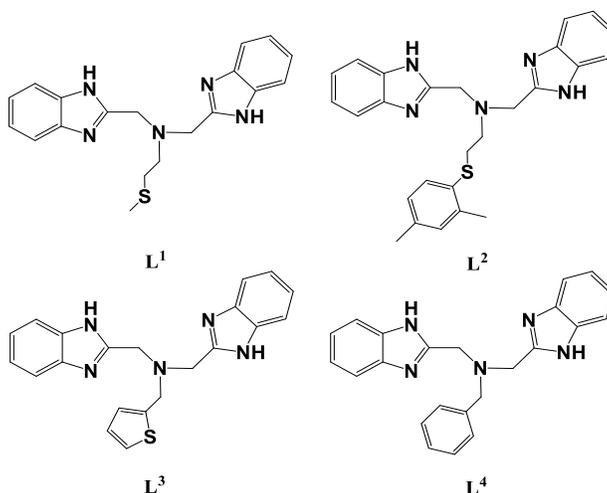


Figura 18. Ligantes utilizados en este proyecto.

En la Tabla 3 se enlistan las bandas principales de los espectros de IR para los ligantes reportados<sup>34</sup> y para el nuevo ligante sintetizado.

**Tabla 3.** Principales bandas de absorción de los ligantes en espectroscopia infrarroja

	<b>L<sup>1</sup> (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>L<sup>2</sup> (cm<sup>-1</sup>)<sup>34</sup></b>	<b>L<sup>3</sup> (cm<sup>-1</sup>)<sup>34</sup></b>	<b>L<sup>4</sup> (cm<sup>-1</sup>)<sup>34</sup></b>
Aromáticos C-H (alargamiento)	3056	3090, 3056	<b>3094</b> , 3057	3092, <b>3057</b>
Metileno C-H (alargamiento)	2913, 2824	2921, 2856	2919, 2828	2918
Aromáticos C-C (alargamiento)	<b>1426</b>	<b>1434</b>	<b>1431</b>	<b>1433</b>
Ar-NH, Bencimidazol (alargamiento)	<b>1269</b>	<b>1272</b>	1341, 1272	1345, 1272
Benzimidazol (flexiones)	1219, 1112, 1020	1218, 1119, 1022	1221, 1105, 1022	1220, 1119, 1025
Aromáticos C-H (flexión en el plano)	<b>738</b>	<b>744</b>	<b>749</b> , 706	<b>743</b> , 701

En la Tabla 4 se muestra el análisis elemental del nuevo ligante sintetizado. Se utilizó el material de referencia metionina como estándar de verificación.

**Tabla 4.** Análisis elemental del ligante L<sup>1</sup>

<b>Valor</b>	<b>N [%]</b>	<b>C [%]</b>	<b>H [%]</b>	<b>S [%]</b>
Teórico	19.93	64.93	6.02	9.12
Experimental	18.35	60.74	5.69	6.54

Para sintetizar los complejos de cobre(II) se eligieron sales de cobre que tuvieran contraiones lábiles, por lo que se utilizaron Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y Cu(SO<sub>3</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Los complejos tienen como característica ser muy polares por lo que son solubles en disolventes polares como acetonitrilo o metanol. El complejo de Cu(II) con el ligante L<sup>1</sup> se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema y con la siguiente descripción del procedimiento:

**Síntesis de [CuL<sup>1</sup>(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>](CH<sub>3</sub>CN):** Se utilizaron cantidades equimolares de la sal de cobre Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y el ligante L<sup>1</sup>, las cuales se disolvieron en acetonitrilo y se dejaron en agitación durante 12 h a temperatura ambiente; posteriormente se evaporó el acetonitrilo a

presión reducida, se agregó dietiléter para favorecer la precipitación del complejo, y por último se filtró y secó a presión reducida. Rendimiento: 92%, p.desc. 220°C. Análisis elemental obtenido C, 39.89; H, 3.57; N, 11.82; S, 3.7; calculado para  $C_{21}H_{24}Cl_2CuN_6O_8S$ : C, 38.51; H, 3.69; N, 12.83; S, 4.89. Espectrometría de masas  $FAB^+$   $m/z = 414 [L^1Cu]^+$ , IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3225, 2924, 1596, 1545, 1474, 1450, 1384, 1324, 1277, 1223, 1068 (intensa), 925, 847, 743 (intensa), 619 (intensa), 460, 428  $cm^{-1}$ . Absorción UV-Visible en acetonitrilo,  $\lambda_{max}$ : 625 nm. Recristalización: acetonitrilo t.a.

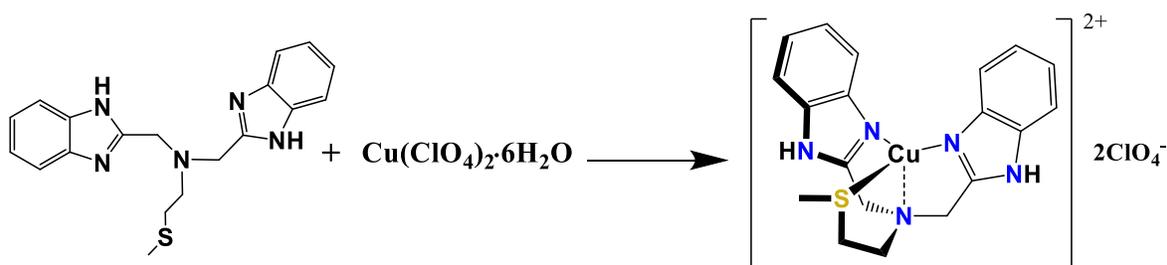


Figura 19. Diagrama de la reacción de formación del complejo  $CuL^1$

El compuesto resultante se caracterizó mediante espectrometría de masas  $FAB^+$ , espectroscopia infrarroja (Figura 20), análisis elemental, EPR y difracción de rayos X de monocristal.

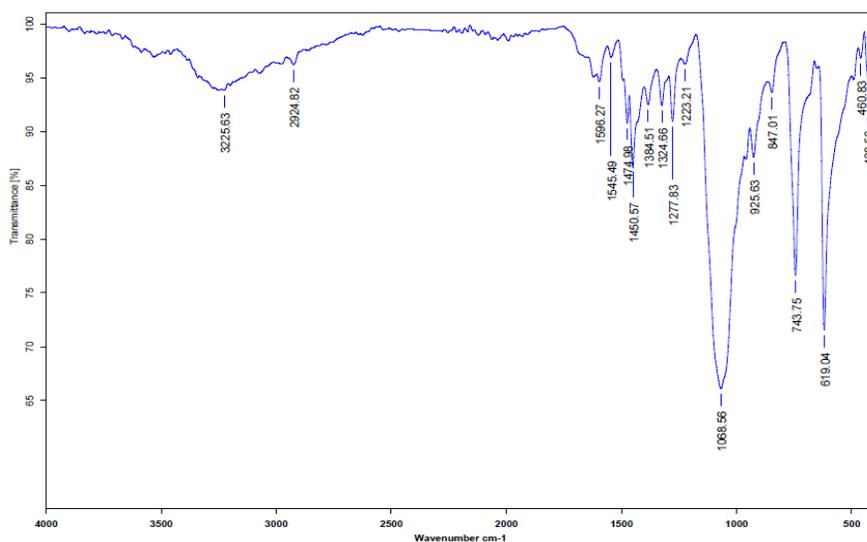
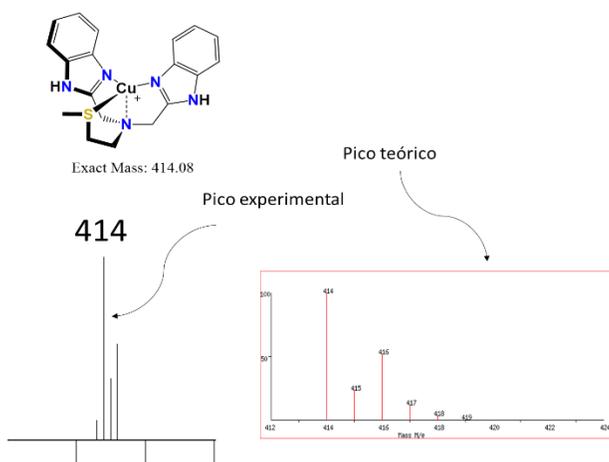


Figura 20. Espectro de masas FAB<sup>+</sup> y espectro de infrarrojo del complejo CuL<sup>1</sup>

En la Tabla 5 se comparan las vibraciones del ligante a las del complejo de Cu(II)<sup>42</sup>; como se puede observar, en todas las bandas ocurre un desplazamiento a energías más altas corroborando que se lleva a cabo la coordinación del cobre debido a la estructura rígida del complejo a comparación del ligante libre. También se observa una banda en 1068 cm<sup>-1</sup> característica de la vibración Cl-O proveniente del contraión perclorato.

**Tabla 5.** Comparación de las bandas de absorción infrarroja entre el ligante L<sup>1</sup> y el complejo CuL<sup>1</sup>

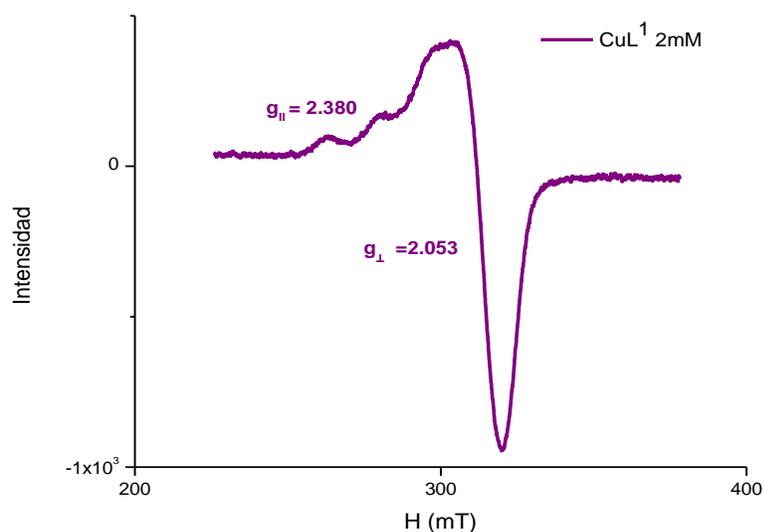
	<b>L<sup>1</sup> (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>CuL<sup>1</sup> (cm<sup>-1</sup>)</b>
Aromáticos C-H (alargamiento)	3056	3225
Metilenos C-H (alargamiento)	2913, 2824	2924
Aromáticos C-C (alargamiento)	<b>1426</b>	1474, <b>1450</b>
Ar-NH, Bencimidazol (alargamiento)	<b>1269</b> , 1219, 1112, 1020	1384, 1324, <b>1277</b>
Cl-O		<b>1068</b>
Aromáticos C-H (alargamiento)	738	<b>743, 619</b>

Los resultados del análisis elemental se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Análisis elemental del complejo CuL<sup>1</sup>

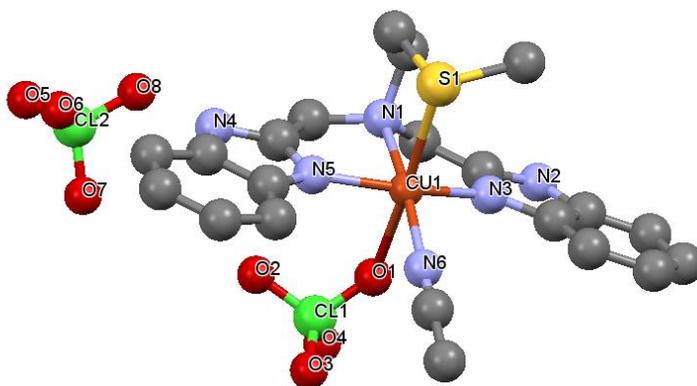
<b>Valor</b>	<b>N [%]</b>	<b>C [%]</b>	<b>H [%]</b>	<b>S [%]</b>
Teórico	12.83	38.51	3.69	4.89
Experimental	11.82	39.89	3.57	3.7

En cuanto a la caracterización por Resonancia Paramagnética Electrónica, la medición se realizó a 77 K en solución de acetonitrilo. En la Figura 21 se observa la forma característica del Cu(II) con geometría axial, lo cual hace referencia a una geometría de pirámide de base cuadrada o un octaedro distorsionado, con valores de  $g_{\parallel} = 2.380$ ,  $g_{\perp} = 2.053$  y  $A_{\parallel} = 15.3455$  mT<sup>43</sup>.



**Figura 21.** Espectro de RPE del complejo  $\text{CuL}^1$  en una disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}$   $0.002 \text{ mol L}^{-1}$  a  $77 \text{ K}$

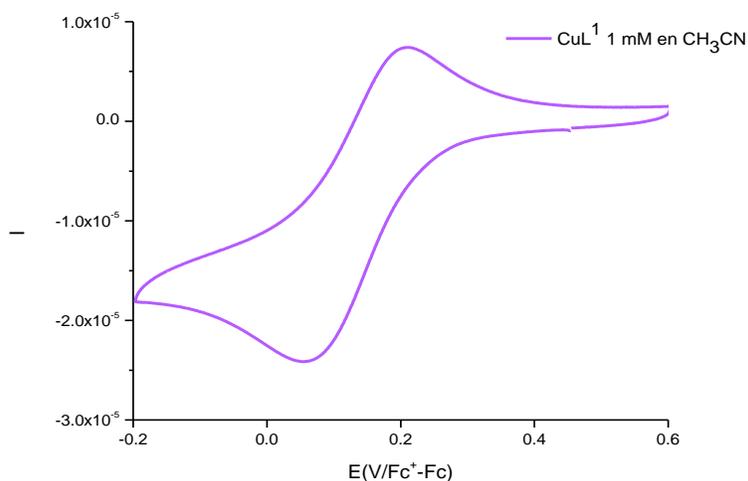
También se logró obtener la estructura en estado sólido por difracción de rayos X de monocristal. Se observa que en efecto se trata de un octaedro distorsionado con los nitrógenos de los dos imidazoles, el nitrógeno central del ligante y una molécula de acetonitrilo coordinadas de forma ecuatorial, mientras que un ion perclorato se coordina de manera axial al igual que el azufre del residuo tioéter, Figura 22.



**Figura 22.** Estructura de rayos X del complejo  $\text{CuL}^1$ . Diagrama ORTEP al 50% de probabilidad

Tabla 7. Distancias y ángulos de enlace del complejo CuL<sup>1</sup>

Distancias	CuL <sup>1</sup> [Å]
Cu(1)-N(1)	2.128(5)
Cu(1)-N(3)	1.955(2)
Cu(1)-N(5)	1.960(5)
Cu(1)-N(6)	2.021(6)
Cu(1)-S(1)	2.646(2)
Ángulos	CuL <sup>1</sup> [°]
N(3)-Cu(1)-N(6)	97.4(2)
N(1)-Cu(1)-N(5)	82.9(2)
N(5)-Cu(1)-N(6)	96.9(2)
N(1)-Cu(1)-S(1)	86.50(16)



**Figura 23.** Voltamperograma catódico de CuL<sup>1</sup> (vs Fc<sup>+</sup>/Fc) a una concentración de 0.001 mol L<sup>-1</sup>, en CH<sub>3</sub>CN electrodo de trabajo vítreo y electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, concentración 0.1 mol L<sup>-1</sup>

Se realizó también la voltamperometría cíclica de L<sup>1</sup> y del complejo CuL<sup>1</sup> para determinar el potencial de reducción del par Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup>. Las condiciones experimentales fueron iguales a las

realizadas anteriormente para la caracterización de los otros complejos con el objetivo de realizar una comparación certera. En la Tabla 8 se enlistan los potenciales anódicos, catódicos y de media onda de todos los complejos referenciados a al par ferrocinio/ferroceno ( $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ ).

**Tabla 8.** Potenciales de media onda para los complejos  $\text{CuL}^1$ ,  $\text{CuL}^2$ ,  $\text{CuL}^3$  y  $\text{CuL}^4$  (vs  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ )

	$E_{\text{pa}}$ (V)	$E_{\text{pc}}$ (V)	$E_{1/2}$ (V)
$[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$	0.76	0.55	0.65
$\text{CuL}^1$	0.21	0.06	0.13
$\text{CuL}^{2\ 34}$	-0.06	-0.17	-0.12
$\text{CuL}^{3\ 34}$	-0.01	-0.16	-0.09
$\text{CuL}^{4\ 34}$	0.04	-0.19	-0.08

El potencial de media onda del complejo  $\text{CuL}^1$  es 0.13 V, lo que indica que tiene mayor tendencia a la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^+$  que el resto de los complejos en la Tabla 8. Siguiendo esta tendencia se encuentran  $\text{CuL}^4$ ,  $\text{CuL}^3$  y  $\text{CuL}^2$ , los cuales tienen potenciales negativos, siendo el  $\text{CuL}^2$  el menos favorable hacia la reducción. El potencial de reducción del complejo  $\text{CuL}^1$  implica que posee una menor estabilidad en su estado oxidado, siendo el complejo que puede aceptar electrones más fácilmente, pudiendo esto relacionarse con la presencia del átomo de azufre coordinado al cobre. En teoría cuando el azufre se encuentra coordinado al átomo de cobre, se estabiliza el estado de oxidación Cu(I), y al coordinarse con molécula de  $\text{O}_2$  la interacción Cu-S desaparece. Esto puede ser posible debido a la flexibilidad y potencial labilidad del brazo que contiene el residuo de azufre. Teniendo esto en cuenta, se esperaría que al realizar pruebas de oxidación para algún sustrato utilizando  $\text{O}_2$  como agente oxidante, el complejo  $\text{CuL}^1$  tuviera la mejor actividad, debido a que puede reducirse a Cu(I) más fácilmente, volviéndolo más reactivo.

En resumen, los complejos utilizados para realizar las pruebas de reactividad junto con sus parámetros más importantes ya reportados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Nombre de complejos utilizados y su composición

	Fórmula química
<b>CuL<sup>1</sup></b>	[CuL <sup>1</sup> (ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ](CH <sub>3</sub> CN)
<b>CuL<sup>2</sup></b> <sup>34</sup>	[CuL <sup>2</sup> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
<b>CuL<sup>3</sup></b> <sup>34</sup>	{[CuL <sup>3</sup> (ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ](H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> } <sub>n</sub>
<b>CuL<sup>4</sup></b> <sup>34</sup>	[CuL <sup>4</sup> ](CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Se obtuvieron las estructuras de rayos X de monocristal para los complejos nombrados CuL<sup>1</sup> y CuL<sup>3</sup><sup>34</sup>. Ambos poseen geometría octaédrica distorsionada, CuL<sup>1</sup> posee el ligante coordinado de manera ecuatorial al igual que una molécula de acetonitrilo, y posee un ion perclorato coordinado de manera axial. En cuanto a CuL<sup>3</sup>, de igual forma tiene al ligante coordinado de forma ecuatorial junto con una molécula de agua, y de manera axial tiene a ambos iones perclorato, que actúan como puente entre diferentes unidades. Cabe destacar que para el complejo CuL<sup>1</sup> el átomo de azufre del tioéter se encuentra coordinado al átomo de cobre de forma axial, mientras que en el caso de CuL<sup>3</sup> esto no sucede, lo cual puede atribuirse la pobre capacidad donadora del tiofeno, Figura 24.

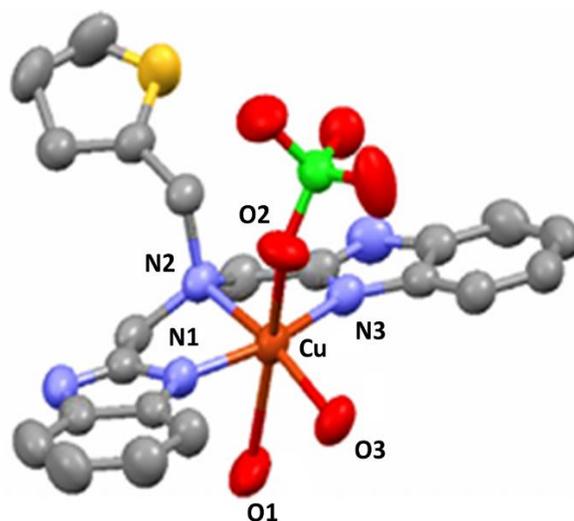


Figura 24. Diagrama ORTEP al 50% de probabilidad para el complejo CuL<sup>3</sup>. (O3 corresponde a una molécula de agua y O1 proviene de otro anión perclorato)<sup>34</sup>

Adicionalmente se muestran las estructuras obtenidas anteriormente<sup>34</sup> de los complejos de Cu(II) con los ligantes faltantes con otros contraiones, para tener una referencia visual en la Figura 25.

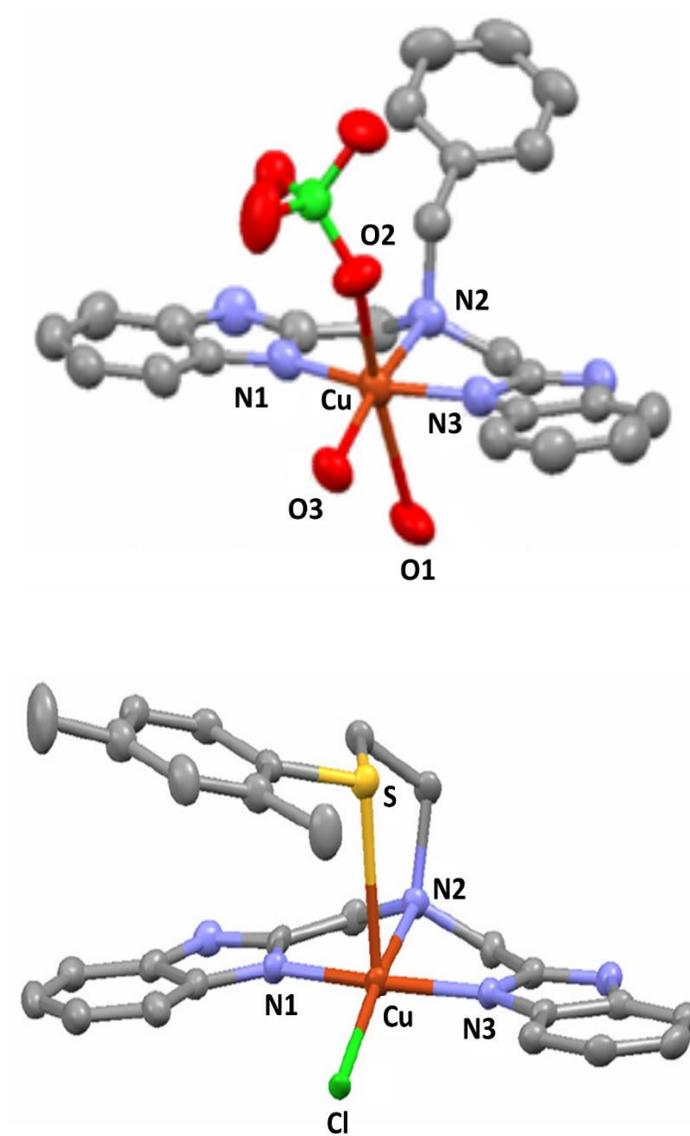


Figura 25. Diagramas ORTEP al 50% de probabilidad para los complejos  $\text{CuL}^4$  y  $\text{CuL}^2$  (nombrados  $\text{C}^2$  y  $\text{C}^{3b}$  en la tesis correspondiente) (O1 es una representación incompleta del anión perclorato)<sup>34</sup>

En todos los casos, los cuatro complejos presentan señal en EPR en acetonitrilo a 77 K, por lo que en disolución los complejos deben encontrarse en forma monomérica.

## 5.2 PRUEBAS DE REACTIVIDAD

### 5.2.1 Pruebas de espectroscopía UV-vis

Con el objetivo de identificar un posible intermediario reactivo Cu-O, se llevó a cabo la reacción de los complejos anteriormente descritos con diferentes agentes oxidantes y se siguió por espectroscopía UV-vis para identificar posibles cambios en los espectros de absorción. En el primer experimento realizado, se realizó la reducción *in situ* de los complejos de Cu(II) con un ligero exceso (1.5 equivalentes) de ascorbato de sodio para asegurar la reducción. Los complejos se analizaron en disolución de acetonitrilo a diferentes concentraciones para identificar todos los cambios posibles a diferentes longitudes de onda y a una temperatura de -30°C. Una vez observada la reducción, se burbujeó en la misma celda espectrofotométrica O<sub>2</sub> durante aproximadamente 1 minuto, y posteriormente se tomaron mediciones a diferentes tiempos para observar posibles cambios en la Figura 26.

### 5.2.1.1 O<sub>2</sub> como agente oxidante

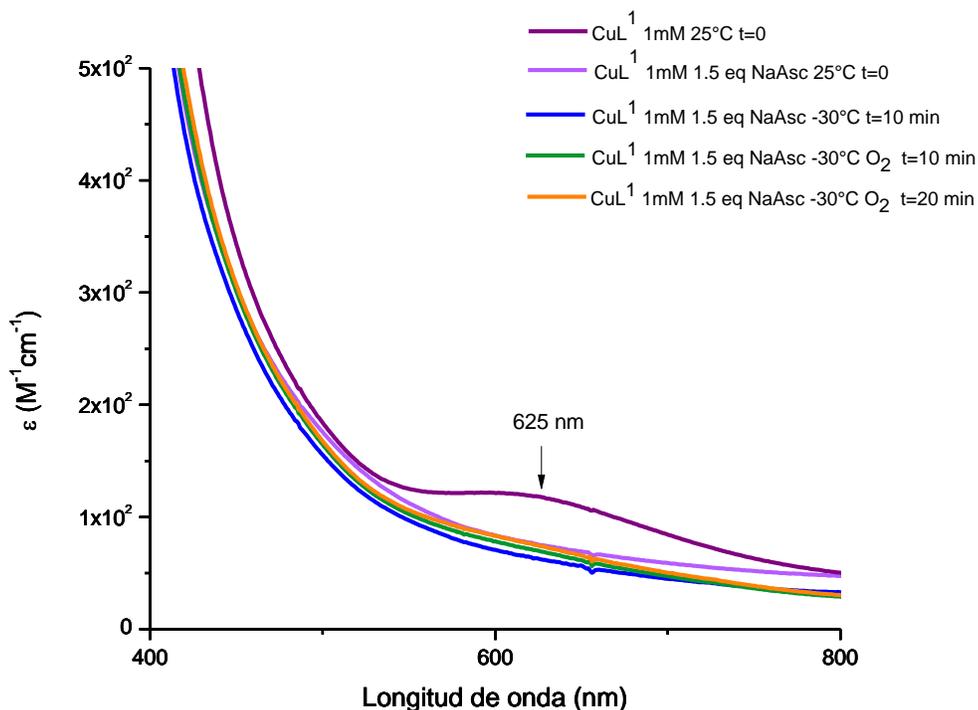


Figura 26. Espectros de UV-vis del complejo CuL<sup>1</sup> con concentración 1 mM en disolución de CH<sub>3</sub>CN a -30°C

Se analizaron los resultados para CuL<sup>1</sup>, CuL<sup>3</sup> y CuL<sup>4</sup>; en los tres casos el cambio más evidente es la reducción de Cu(II) a Cu(I), ya que las bandas que se encuentran entre 625-640 nm producidas por las transiciones *d-d* desaparecen después de la adición de ascorbato de sodio a temperatura ambiente. Después de burbujear dioxígeno a -30°C no se observan cambios significativos incluso después de 20 min. A pesar de ello, en la Figura 27 se puede observar la aparición de una banda en 481 nm para el caso del complejo CuL<sup>3</sup>, mientras que en la Figura 28 se observa una banda análoga en 460 nm para CuL<sup>4</sup>.

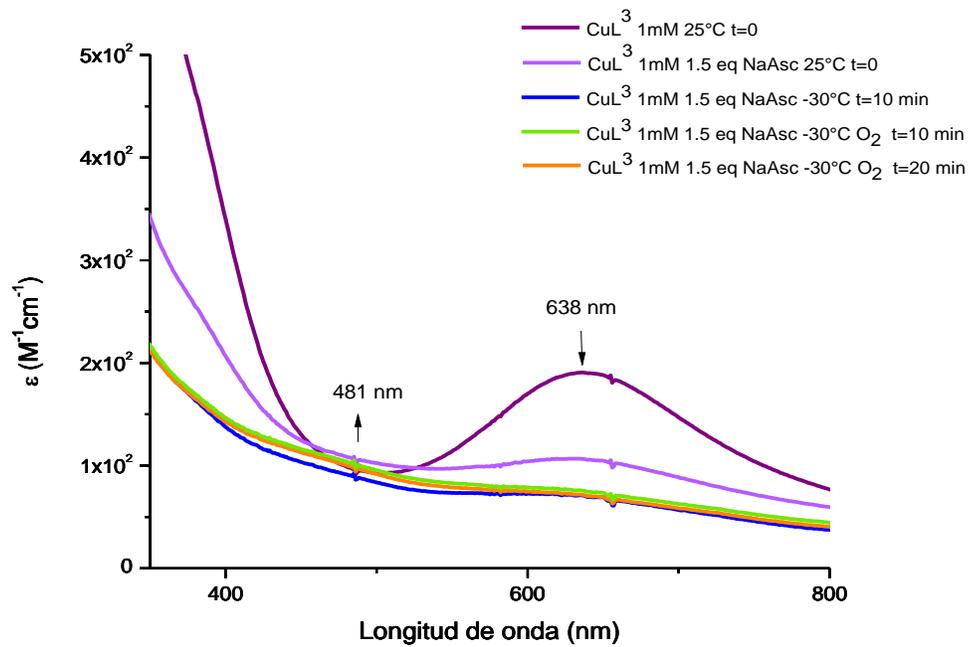


Figura 27. Espectros de UV-vis del complejo  $CuL^3$  con concentración 1 mM en disolución de  $CH_3CN$  a  $-30^\circ C$

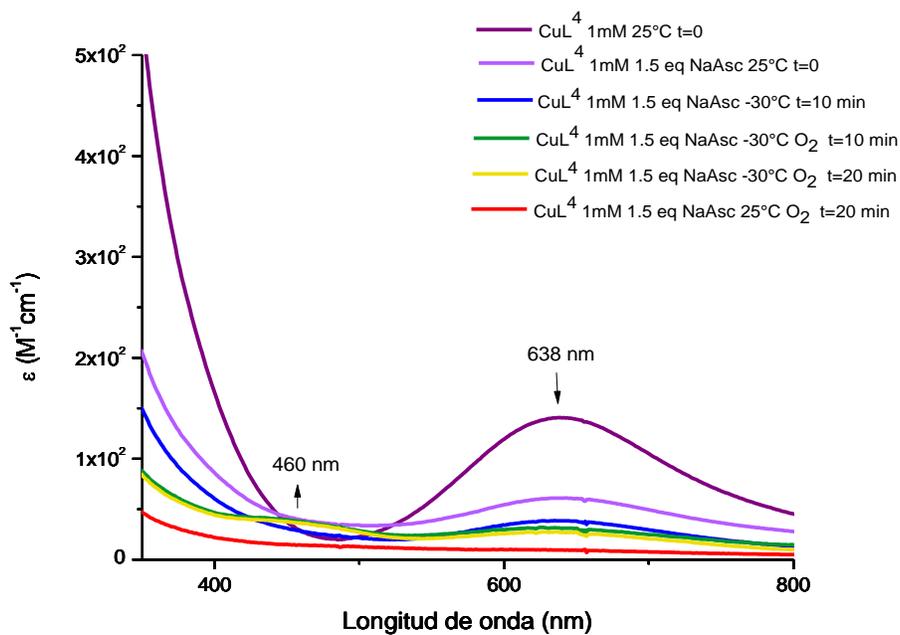


Figura 28. Espectros de UV-vis del complejo  $CuL^4$  con concentración 1 mM en disolución de  $CH_3CN$  a  $-30^\circ C$

Estudios previos han reportado la aparición de una banda alrededor de los 430 nm en complejos de cobre con ligantes tripodales tetradentados que han sido adjudicados a la formación del aducto Cu(II)-superoxo con un arreglo terminal<sup>31,44</sup> y cuya formación fue corroborada por otros métodos analíticos. Sin embargo, las bandas reportadas poseen una absorptividad mayor y también para dichos complejos aparecen otras bandas en energías más bajas, por encima de 500 nm. A pesar de las diferencias mencionadas, no se debe descartar la posible formación de una nueva especie cuya estructura quedará pendiente por determinar. Debido a la baja intensidad de las bandas observadas, se optó por utilizar un agente oxidante diferente y realizar los experimentos correspondientes.

#### *5.2.1.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante*

Se eligió el peróxido de hidrógeno como agente oxidante por encima de otros como hipoclorito de sodio, ya que es más benigno con el medio ambiente. Se sabe que la capacidad oxidativa del peróxido de hidrógeno aumenta con la basicidad de su ambiente<sup>45,46</sup>, por lo que se eligió trietilamina como base, la cual puede imponer un pH de 10.75 en disolución acuosa. Los experimentos se llevaron a cabo con disoluciones tanto de acetonitrilo como de metanol a -30°C y -80°C respectivamente. La mezcla oxidante se preparó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en disolución acuosa.

El experimento realizado con el complejo CuL<sup>1</sup> a -30°C con concentración 1 mM fue difícil de monitorear ya que al exceder los 10 equivalentes de mezcla oxidante la señal se satura, lo cual se atribuye a la formación de un precipitado muy fino que hace turbia la disolución. Posiblemente el precipitado formado sea Cu(OH)<sub>2</sub>, cuya precipitación es factible debido a la presencia de Et<sub>3</sub>N. Sin embargo, como se muestra en la Figura 29, al agregarse 6 equivalentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N, alrededor de los 560 nm aparece una nueva banda.

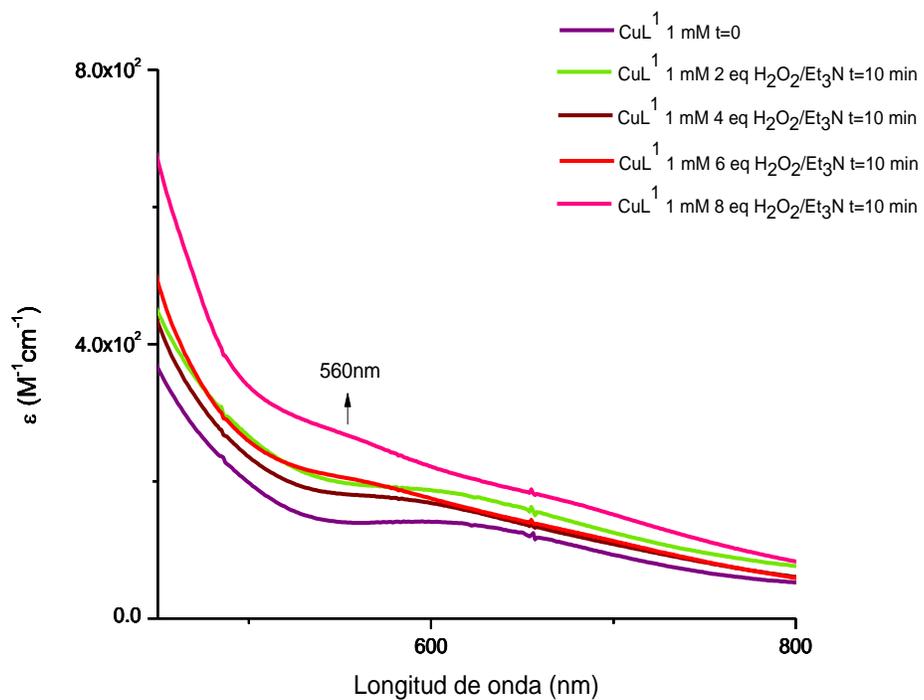


Figura 29. Espectros UV-vis del complejo CuL<sup>1</sup> con concentración 1 mM en disolución de CH<sub>3</sub>CN A -30°C

Para el complejo con concentración 30  $\mu\text{mol}$ , en la figura 30 se observa la desaparición de la banda en 230 nm y la formación de un hombro alrededor de los 200 nm, igualmente la banda que aparece en 272 nm tiene un desplazamiento al rojo. Estas bandas corresponden a las transiciones  $\pi$ - $\pi$  de los bencimidazoles del ligante, los cambios descritos posiblemente se deban a un cambio en la coordinación del complejo.

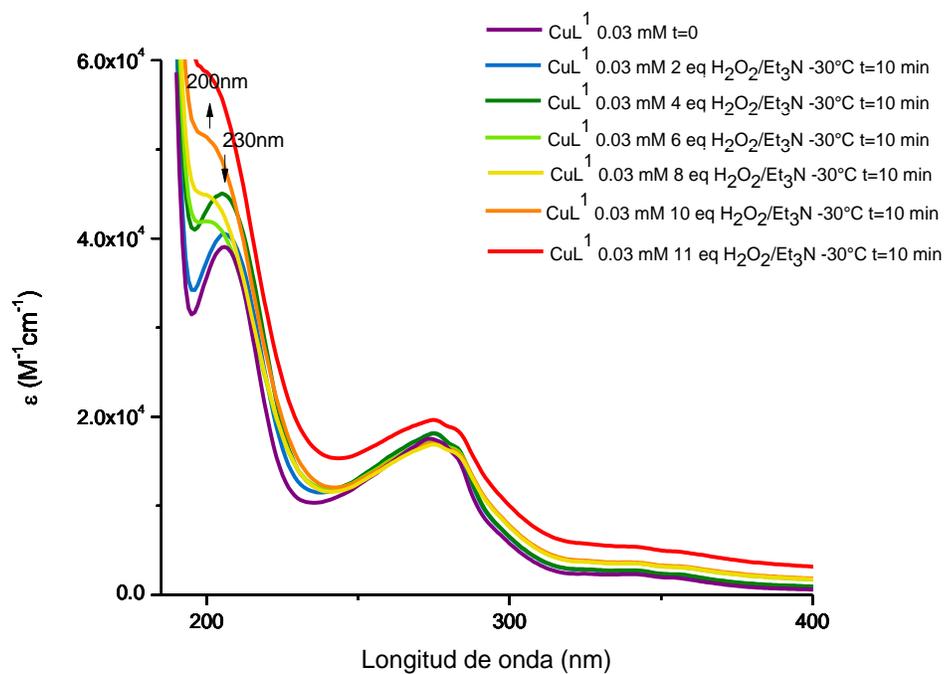
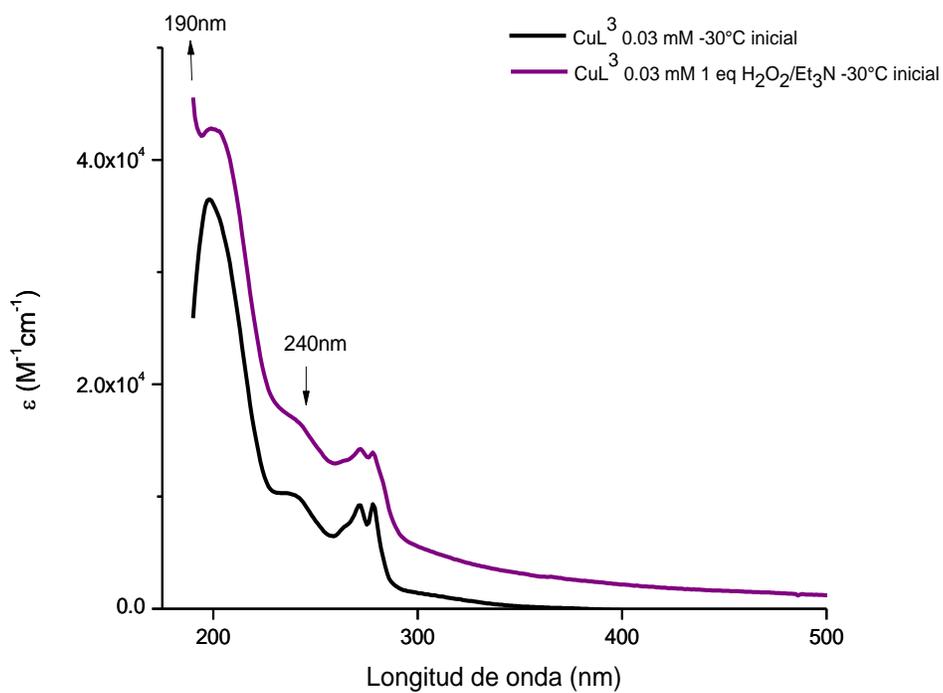


Figura 30. Espectros UV-vis del complejo CuL<sup>1</sup> con concentración 30 μmol en disolución de CH<sub>3</sub>CN a -30°C

En el caso del complejo CuL<sup>3</sup>, el monitoreo fue difícil tanto en la disolución concentrada como en la diluida ya que la señal se satura en ambos casos. En la Figura 31 se muestra el espectro de la disolución menos concentrada en donde se identifica de nuevo la formación del hombro ya mencionado alrededor de los 200 nm, mientras que también se observa la reducción de una banda cerca de los 240 nm.



**Figura 31.** Espectros UV-vis del complejo CuL<sup>3</sup> con concentración 30  $\mu$ mol en disolución de CH<sub>3</sub>CN a -30°C

Para el complejo CuL<sup>4</sup> se observa en la Figura 32 un desplazamiento hipsocrómico de la banda de absorción *d-d* en 650 nm, posiblemente debido a cambios en el entorno de coordinación del complejo.

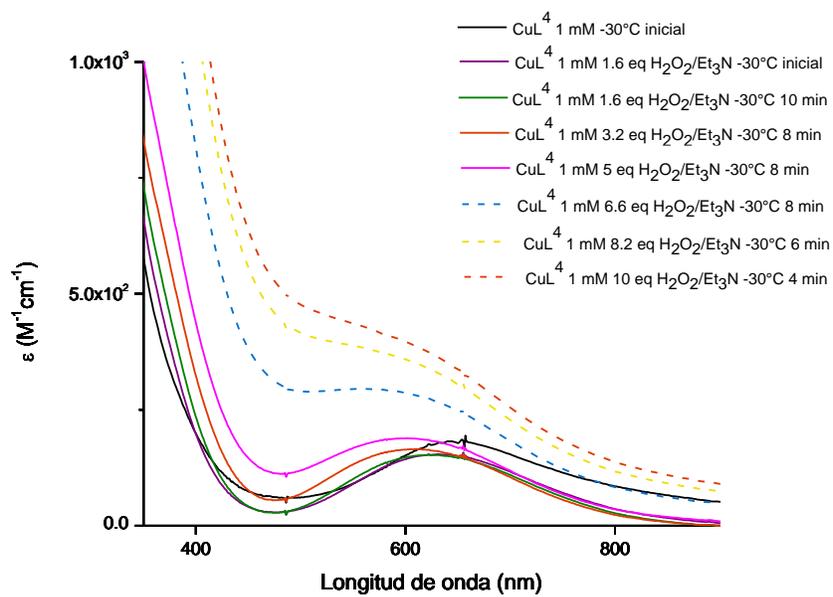


Figura 32. Espectros UV-vis del complejo CuL<sup>4</sup> con concentración 1 mM en disolución de CH<sub>3</sub>CN a -30°C

Adicionalmente en la Figura 33, se muestra la formación del mismo hombro cerca de los 200 nm.

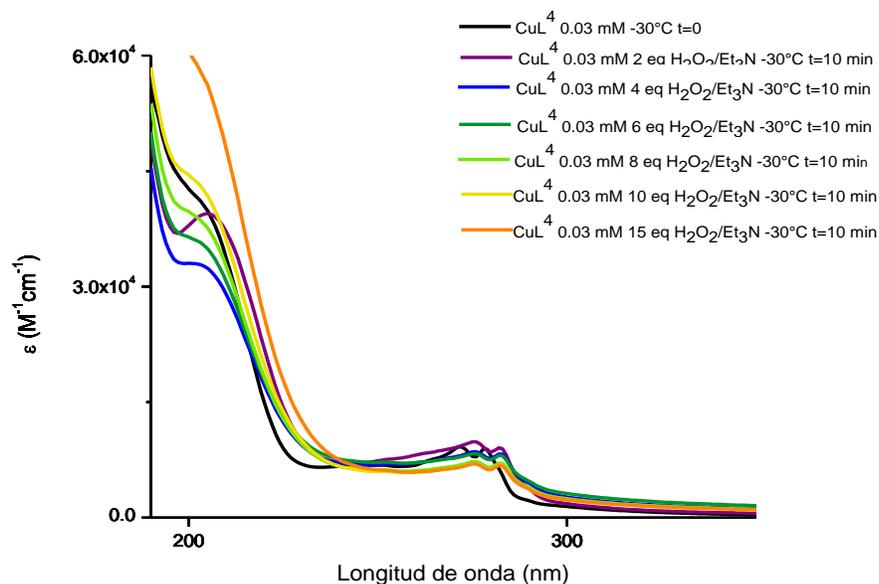


Figura 33. Espectros UV-vis del complejo  $\text{CuL}^4$  con concentración  $30 \mu\text{mol}$  en disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}$  a  $-30^\circ\text{C}$

Debido a que los cambios observados en los experimentos realizados con acetonitrilo a  $-30^\circ\text{C}$  son muy sutiles, se propuso realizar los mismos experimentos en metanol como disolvente, para de este modo poder trabajar a temperatura más baja, y potencialmente estabilizar los intermediarios que puedan formarse.

En la Figura 34, antes de adicionar la disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$  en acetonitrilo a una concentración de  $30 \mu\text{mol}$ , se observa una banda en  $715 \text{ nm}$ , la cual desaparece y da lugar a la formación de otra banda en  $546 \text{ nm}$ ; se realizó también un experimento a una concentración más baja, sin embargo, no se detectaron cambios.

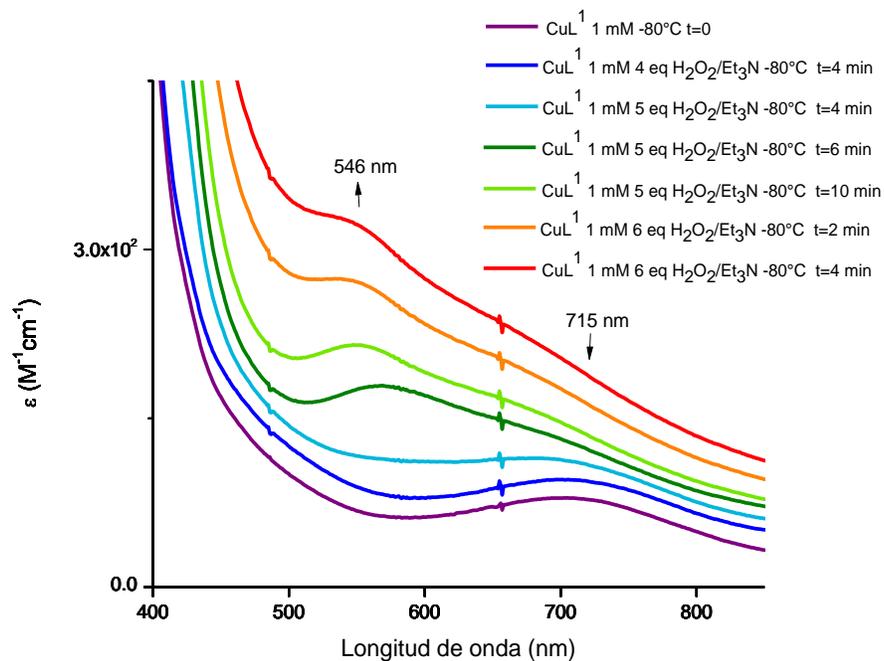


Figura 34. Espectros UV-vis del complejo  $\text{CuL}^1$  con concentración 1 mM en una disolución de MeOH a  $-80^\circ\text{C}$

Para el complejo  $\text{CuL}^2$  a  $-80^\circ\text{C}$  (Figura 35) el espectro se mantiene sin cambios hasta la adición de 4 equivalentes de agente oxidante; a partir de esta adición se observa la desaparición de las bandas en 372 y 393 nm y aparece una banda adicional en 382 nm.

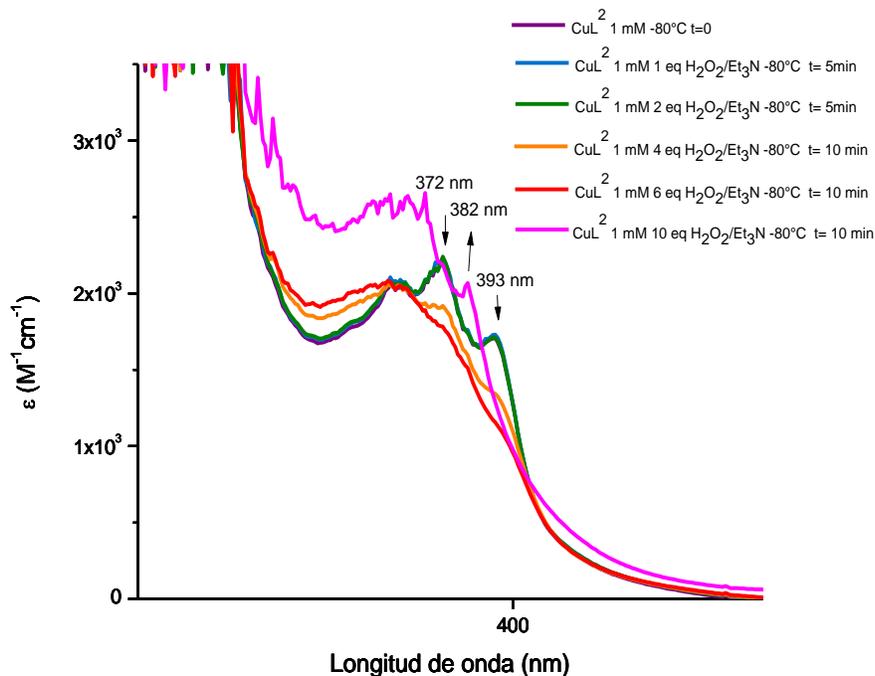


Figura 35. Espectros UV-vis del complejo CuL<sup>2</sup> a una concentración 1 mM en una disolución de MeOH a -80°C

En los espectros correspondientes al complejo CuL<sup>3</sup> (Figuras 36 y 37), se observan 3 bandas, una en 197 nm, un hombro en 238 nm y otra en 700 nm. Después de agregar 6 equivalentes de mezcla oxidante, se observan las desapariciones de las tres señales y la formación de una banda en 203 y otra en 604 nm. Esta última bien puede corresponder al desplazamiento hipsocrómico de la banda original en 700 nm.

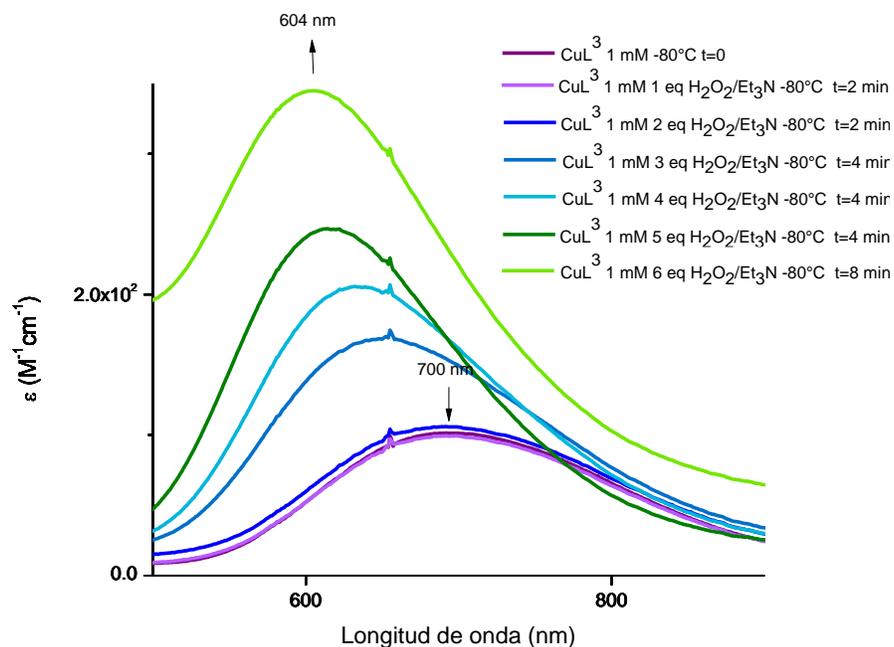


Figura 36. Espectros UV-vis del complejo  $\text{CuL}^3$  con concentración 1 mM en disolución de MeOH a  $-80^\circ\text{C}$

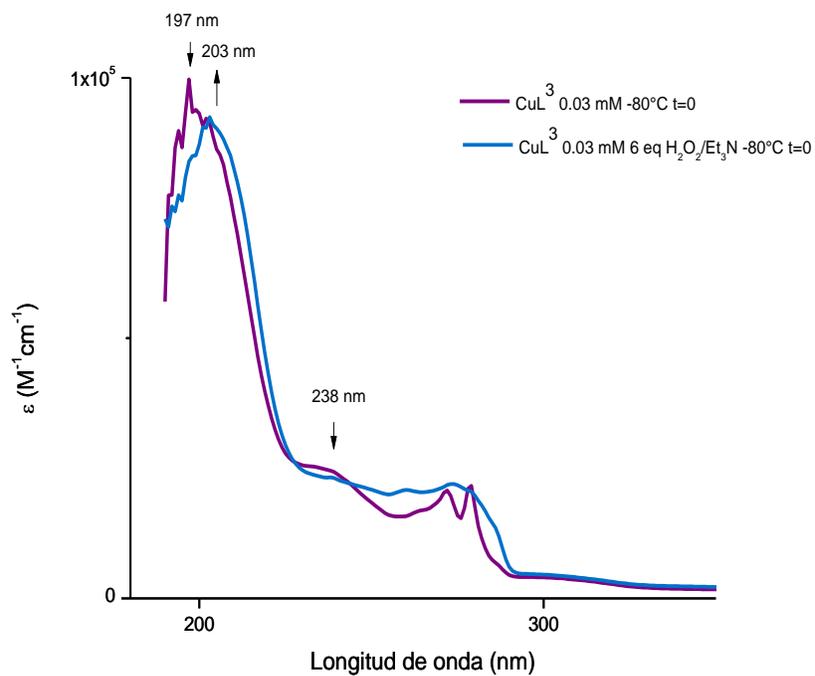


Figura 37. Espectros UV-vis del complejo  $\text{CuL}^3$  con concentración 30  $\mu\text{mol}$  en disolución de MeOH a  $-80^\circ\text{C}$

En el espectro del complejo  $\text{CuL}^4$  de igual forma se observa un desplazamiento a menores longitudes de onda, que da como resultado la banda en 611 nm y la aparición de un hombro en 347 nm.

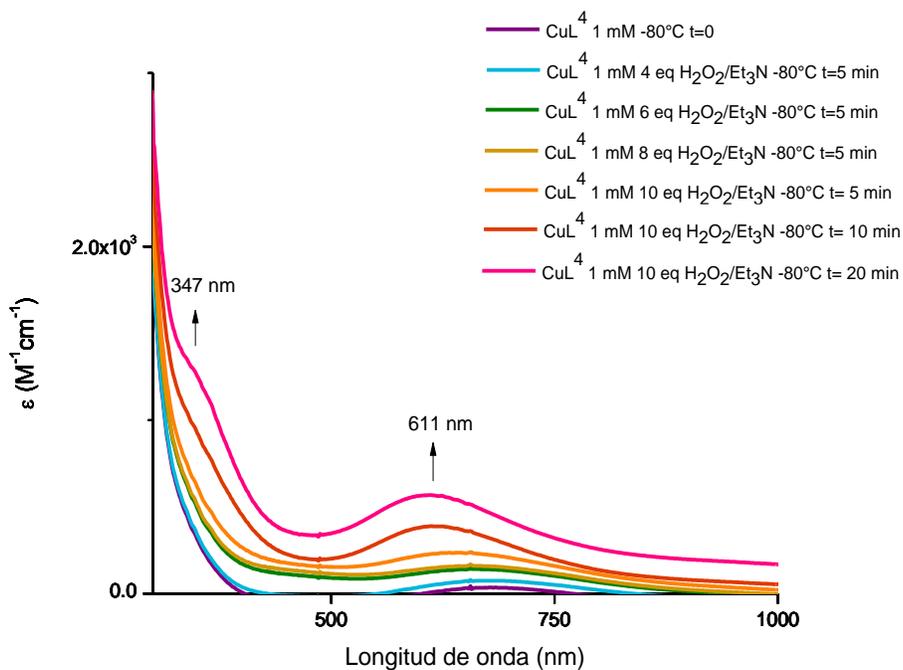


Figura 38. Espectros UV-vis del complejo  $\text{CuL}^4$  con concentración 1mM en disolución de MeOH a  $-80^\circ\text{C}$

En todos los casos, al agregar más de 10 equivalentes de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$  el espectro se satura. En la Tabla 9 se resumen los cambios observados para todos los complejos.

Tabla 10. Bandas de absorción en UV-vis de los complejos antes y después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$

	Bandas iniciales		Después de la adición de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$	
$\text{CuL}^1$	715 nm		546 nm	
$\text{CuL}^2$	372 nm	393 nm	382 nm	
$\text{CuL}^3$	197 nm, h238 nm	700 nm	203 nm	604 nm
$\text{CuL}^4$	690 nm		347 nm	611 nm

Existen reportes de complejos de Cu(II) con ligantes tripodales N<sub>2</sub>S que presentan bandas similares a las descritas, cercanas a los 350 nm y 600 nm<sup>47,48</sup> y que han sido caracterizados con diferentes métodos espectroscópicos. Dichos complejos son efectivamente aductos mononucleares de cobre-oxígeno, siendo la especie identificada Cu(II)-hidroperoxo terminal. En estos casos la banda cercana a 350 nm se asigna como la transferencia de carga de la especie hidroperoxo al cobre; no obstante, existen también reportes de especies dinucleares de cobre de forma LCu(μ-η<sup>2</sup>:η<sup>2</sup>-O<sub>2</sub>)CuL<sup>49</sup>, en donde se asigna una banda intensa en 395 nm a la especie dimérica.

### 5.2.2 Pruebas de Resonancia Paramagnética Electrónica

Se realizaron pruebas de resonancia paramagnética electrónica para descartar o confirmar la presencia de dímeros y para elucidar cambios en la geometría de los complejos después de la adición de la mezcla oxidante.

Los complejos de Cu(II) presentan una señal en RPE congruente con una geometría axial distorsionada, con  $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$  para todos los casos. En la Figura 39, se muestra el espectro de RPE del complejo CuL<sup>1</sup>, los valores de  $g$  y de la constante de acoplamiento antes de adicionar algún agente oxidante, son  $g_{\parallel} = 2.380$ ,  $g_{\perp} = 2.053$  y  $|A_{\parallel}| = 15.3455$  mT. Después de la adición de 10 equivalentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N en acetonitrilo, existe un cambio evidente en la geometría, ya que pasa de ser un octaedro distorsionado o una pirámide de base cuadrada a ser isotrópica.

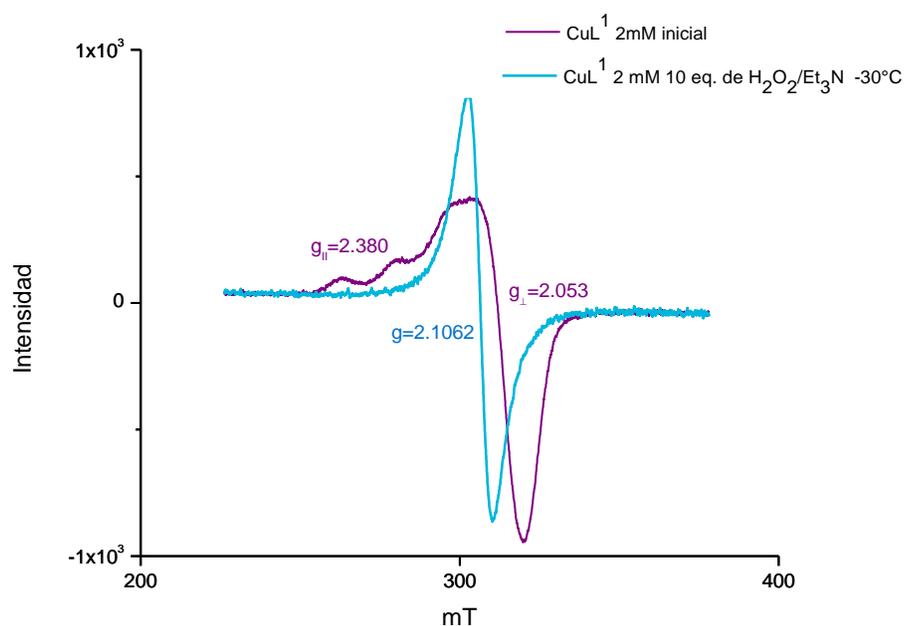


Figura 39. Espectros de RPE del complejo CuL<sup>1</sup> antes y después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N

El hecho de que exista señal a pesar de haber agregado la mezcla oxidante es una prueba de que no existe acoplamiento antiferromagnético entre dos núcleos de cobre, por lo que se descarta que existan especies diméricas. El comportamiento en general de los cuatro complejos es similar al del complejo CuL<sup>1</sup>, sin la formación de dímeros en ninguno de los casos. En la Tabla 11 se enlistan los parámetros determinados para todos los complejos, antes y después de la adición de peróxido de hidrógeno.

Tabla 3. Parámetros estructurales en RPE de los complejos CuL<sup>1</sup>, CuL<sup>2</sup>, CuL<sup>3</sup> y CuL<sup>4</sup> antes y después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N

	CuL <sup>n</sup> en MeCN a 77K			CuL <sup>n</sup> en presencia de
	g <sub>  </sub>	g <sub>⊥</sub>	A <sub>  </sub> (mT)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Et <sub>3</sub> N en MeCN a 77K
				g
CuL <sup>1</sup>	2.380	2.053	15.346	2.1062
CuL <sup>2</sup>	2.529	2.076	12.500	2.1072
CuL <sup>3</sup>	2.369	2.069	16.777	2.1017
CuL <sup>4</sup>	2.275	2.060	14.645	2.1028

### 5.2.3 Espectrometría de masas

Adicionalmente, se realizaron análisis de espectrometría de masas con ionización por electrospray de algunos de los complejos en presencia de la mezcla oxidante. Se eligieron los complejos que presentaron mayor definición en las bandas formadas observadas por espectroscopía UV-visible. Estas pruebas se realizaron en disolución de metanol con una concentración 2 mM, la mezcla oxidante se agregó a baja temperatura en un baño de hielo seco/acetona ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) y la medición se realizó al momento. Se adicionaron 15 equivalentes del agente oxidante para asegurar que la formación de la especie reactiva se llevara a cabo.

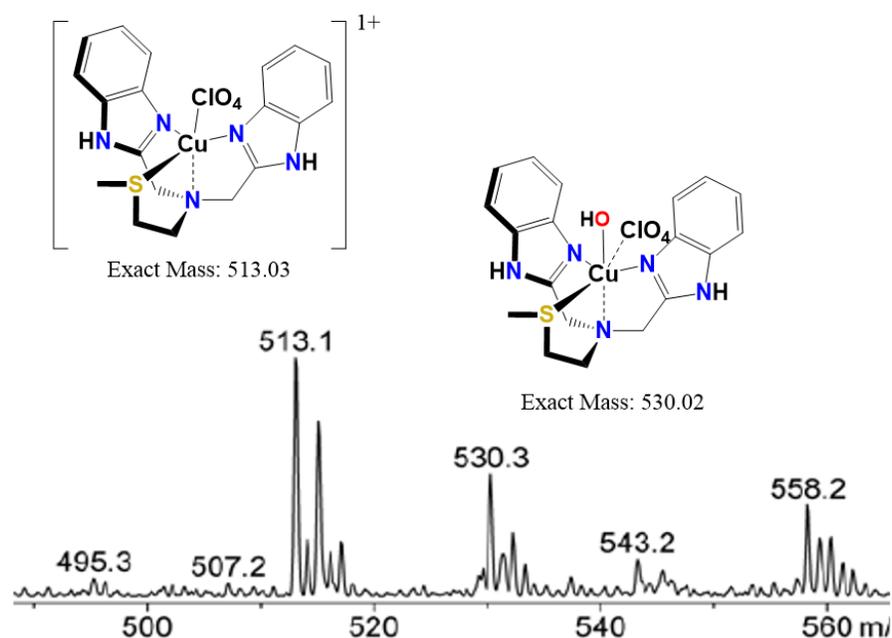


Figura 40. Espectro de masas ESI<sup>+</sup> del complejo CuL<sup>1</sup> en presencia de 15 equivalentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N a  $-78^{\circ}\text{C}$

En la Figura 40 se observa el espectro obtenido de la reacción de CuL<sup>1</sup> donde, de acuerdo a las masas y los patrones isotópicos observados, se identificaron dos especies de cobre. Para el pico en  $m/z = 530$  se propone una especie Cu-OH con el átomo de cobre en un estado de oxidación +2, mientras que para el pico en  $m/z = 513$  se propone el complejo con un perchlorato únicamente. En cuanto a los resultados obtenidos con el resto de los complejos, no se lograron observar masas que coincidieran con alguna especie Cu-O, por lo que se

buscará cambiar de método de ionización, o de condiciones de reacción para obtener resultados más favorecedores.

### 5.3 PRUEBAS DE DEGRADACIÓN

Se realizaron también pruebas de degradación con celulosa como sustrato para comprobar que los compuestos de Cu(II) propuestos son una buena alternativa a los procesos de pretratamiento de biomasa para su degradación oxidativa, y de igual forma identificar cuál de los cuatro complejos propuestos es la mejor opción para tal objetivo.

Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente en medio acuoso. De igual forma se hicieron pruebas blanco con celulosa para diferenciar los posibles productos que no corresponden a la degradación realizada por los complejos. A continuación, se enumeran las pruebas realizadas en total.

- Celulosa (10 eq)
- Celulosa (10 eq) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N (10 eq)
- Celulosa (10 eq) + CuSO<sub>4</sub> (1 eq)
- Celulosa (10 eq) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N (10 eq) + CuSO<sub>4</sub> (1 eq)
- Celulosa (10 eq) + CuL<sup>n</sup> (1 eq)
- Celulosa (10 eq) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N (10 eq) + CuL<sup>n</sup> (1 eq)

Inicialmente las pruebas se dejaron en agitación durante 24 h, después de este periodo se pesó la cantidad de celulosa sobrante para determinar la cantidad de materia sólida degradada. La disolución resultante se filtró sobre celita para remover las especies de cobre e identificar únicamente los productos orgánicos. Las mismas pruebas se realizaron por segunda vez, pero esta ocasión, al terminar las 24 h se agregó un equivalente más de complejo de cobre y de mezcla oxidante y se dejó en agitación para un tiempo total de 72 h. Una vez filtradas las disoluciones, se realizaron análisis por HPLC-MS para identificar los productos. En la Tabla 12 se muestra la cantidad de materia degradada al termino de los experimentos.

**Tabla 4.** Porcentajes de la masa de celulosa consumida para cada complejo CuL<sup>n</sup> (n = 1, 2, 3 y 4) y la mezcla de complejo y agente oxidante, al término de 24 y 72 h

	<b>% consumido después de 24*</b>	<b>% consumido después de 72*</b>
<b>CuL<sup>1</sup></b>	1.6	9.2
<b>CuL<sup>1</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N</b>	7.9	26.9
<b>CuL<sup>2</sup></b>	6.6	10.0
<b>CuL<sup>2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N</b>	12.3	14.0
<b>CuL<sup>3</sup></b>	15.9	22.5
<b>CuL<sup>3</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N</b>	30.6	67.4
<b>CuL<sup>4</sup></b>	19.5	35.0
<b>CuL<sup>4</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N</b>	17.6	36.2

*\*Las mezclas de reacción en ambos casos se pusieron en agitación constante a temperatura ambiente en un medio acuoso*

Como puede observarse, en todos los casos se consumió celulosa, inclusive cuando no se agregó agente oxidante. No se descarta por ello la posibilidad de que dentro de la mezcla de reacción existan azúcares reductores que podrían reducir Cu(II) a Cu(I). Los complejos de Cu(I) podrían estar reaccionando con O<sub>2</sub> del medio ambiente, activándolo para llevar a cabo la degradación oxidativa de la celulosa. No obstante, se observa una mayor actividad en casi todos los casos cuando se agrega peróxido de hidrógeno y trietilamina, y también cuando se agrega un equivalente más de complejo de Cu y de agente oxidante a la mezcla de reacción.

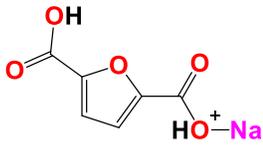
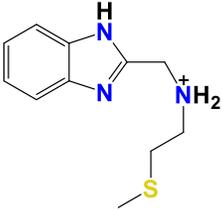
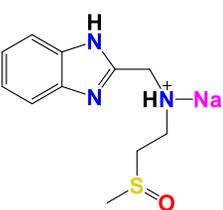
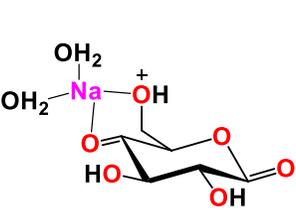
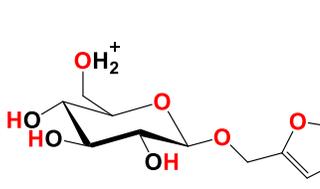
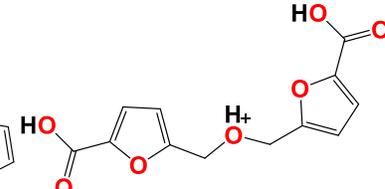
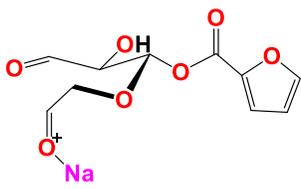
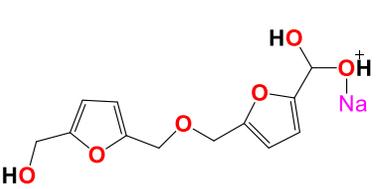
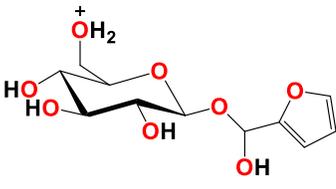
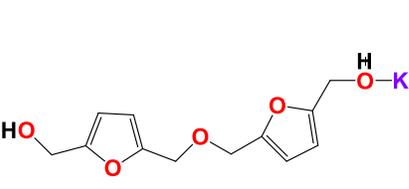
El complejo CuL<sup>1</sup> por si solo es el que muestra menor porcentaje de degradación después de 24 h, y es el complejo que tiene el potencial de onda más positivo (0.13 V) por lo que también es el más propenso a reducirse. La poca eficacia que tiene este compuesto hacia la degradación de celulosa podría explicarse con la coordinación que existe entre el átomo de cobre y el de azufre. El grupo de investigación de Tolman reportó que el residuo de metionina en las especies biomiméticas de la enzima PHM poseía la capacidad de estabilizar las especies de cobre I, haciéndolas menos reactivas hacia el oxígeno. Aunado a esto, la especie oxidante predominante en la mezcla de reacción es el peróxido de hidrógeno, el cual reacciona preferencialmente con especies de cobre en su estado oxidado, por lo que la reducción a Cu(I) puede ser un factor importante en el bajo porcentaje de degradación que se observa. Por otro lado, el complejo que mostró un mayor porcentaje de degradación por sí

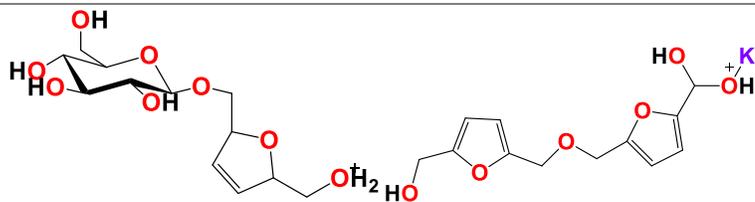
solo es el  $\text{CuL}^4$ ; este complejo tiene el segundo potencial de reducción más alto (-0.08 V) de los cuatro complejos, por lo que en comparación con las especies  $\text{CuL}^3$  y  $\text{CuL}^2$ , este es más propenso a reducirse, pero a diferencia del complejo  $\text{CuL}^1$ , el complejo  $\text{CuL}^4$  no tiene átomos de azufre en su composición, por lo que estos no disminuirán su reactividad frente a oxígeno molecular cuando se reduce a Cu(I). El complejo  $\text{CuL}^3$  es la especie que tuvo mejor rendimiento en presencia de la mezcla oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$  debido a que no se reduce tan fácilmente (-0.09 V) y a que el átomo de azufre forma parte del tiofeno no es coordinante hacia el átomo de cobre. No así el complejo  $\text{CuL}^2$ , cuyo átomo de azufre es más accesible a la coordinación con el cobre por lo que sí puede llegar a estabilizar las especies de Cu(I) e inhibir parcialmente su reactividad.

Los resultados obtenidos de las pruebas blanco en HPLC-MS muestran que no existe ningún tipo de descomposición en la celulosa, ya que no se ven ningún cambio en los tiempos de retención (ver anexo), a diferencia de los resultados obtenidos para los complejos y en presencia de la mezcla oxidante.

Para todos los complejos se observa que existen diferentes especies a diferentes tiempos de retención; se seleccionaron los picos más relevantes y se propusieron especies según las masas determinadas. Las especies propuestas son, ya sea fracciones de celulosa como celobiosa o celotriosa<sup>50</sup>, aldehídos y cetonas producto de la oxidación en las posiciones 1 y 4<sup>21,51</sup>, derivados de furanosas<sup>52</sup>, especies que ya han sido confirmadas como productos de degradación de celulosa<sup>53</sup> y sus posibles derivados.

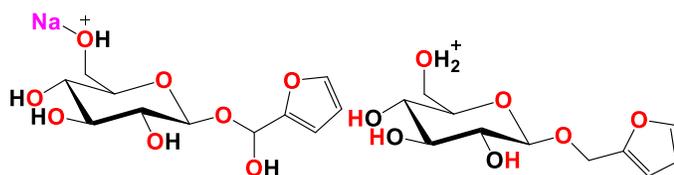
### 5.3.1 Resultados de los estudios de degradación para CuL<sup>1</sup>

$\approx m/z$	[Moléculas propuestas + H/Na/K] <sup>+</sup>
100-200	 <p>Exact Mass: 179.00</p>
200-300	 <p>Exact Mass: 222.11</p>  <p>Exact Mass: 260.08</p>  <p>Exact Mass: 235.04</p>  <p>Exact Mass: 261.10</p>  <p>Exact Mass: 267.05</p>  <p>Exact Mass: 265.03</p>  <p>Exact Mass: 277.07</p>  <p>Exact Mass: 277.09</p>  <p>Exact Mass: 277.05</p>



Exact Mass: 293.12

Exact Mass: 293.04

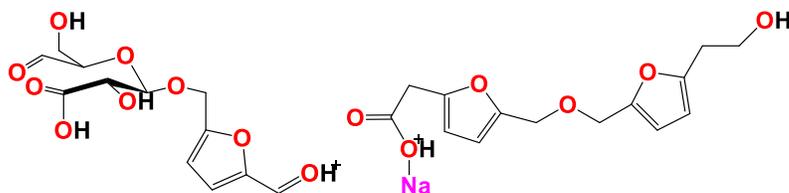


Exact Mass: 299.07

Exact Mass: 261.10

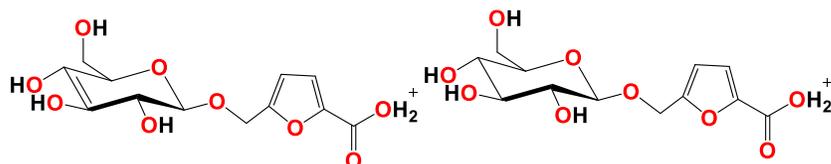
---

300-400



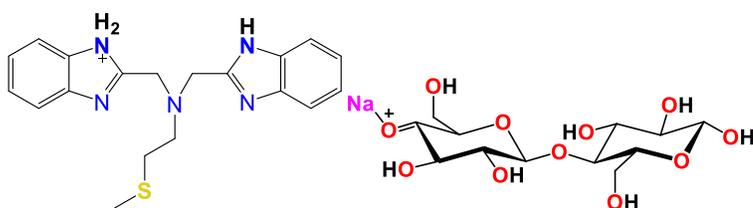
Exact Mass: 303.07

Exact Mass: 303.08



Exact Mass: 303.07

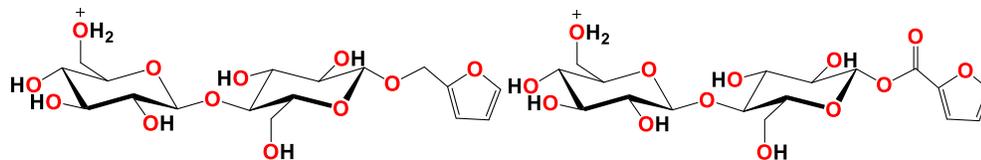
Exact Mass: 305.09



Exact Mass: 352.16

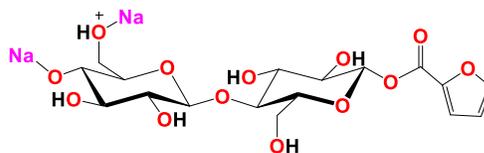
Exact Mass: 363.09

400-500



Exact Mass: 423.15

Exact Mass: 437.13



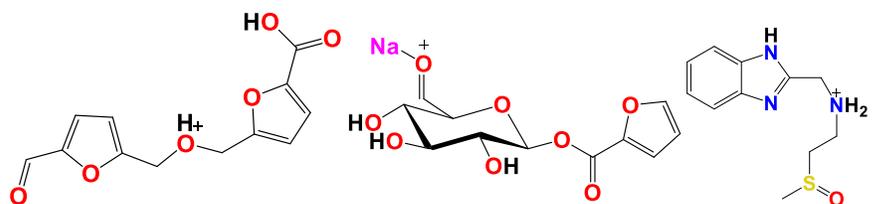
Exact Mass: 481.09

### 5.3.2 Resultados de los estudios de degradación para $\text{CuL}^1 + \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Et}_3\text{N}$

$\approx m/z$

[Moléculas propuestas + H/Na/K]<sup>+</sup>

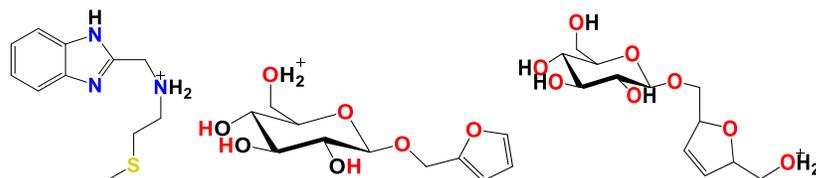
200-300



Exact Mass: 251.06

Exact Mass: 295.04

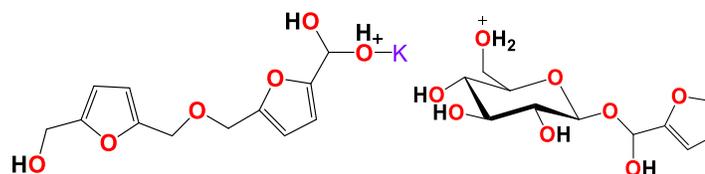
Exact Mass: 238.10



Exact Mass: 222.11

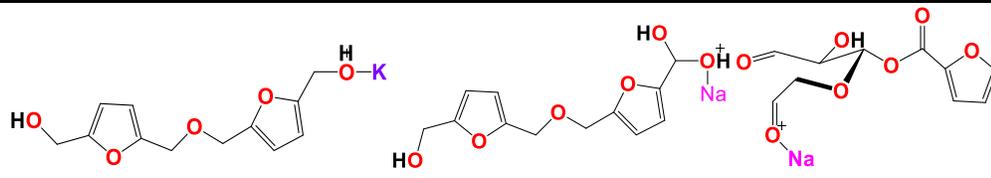
Exact Mass: 261.10

Exact Mass: 293.12



Exact Mass: 293.04

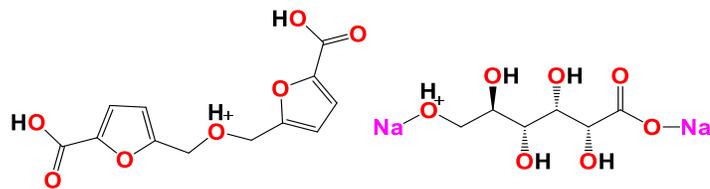
Exact Mass: 277.09



Exact Mass: 277.05

Exact Mass: 277.07

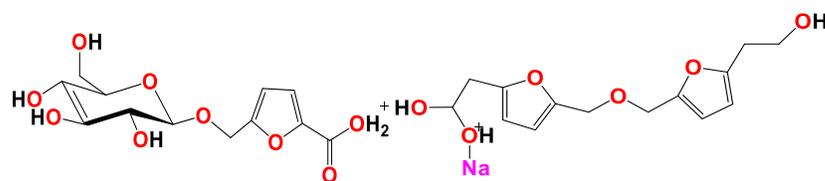
Exact Mass: 265.03



Exact Mass: 267.05

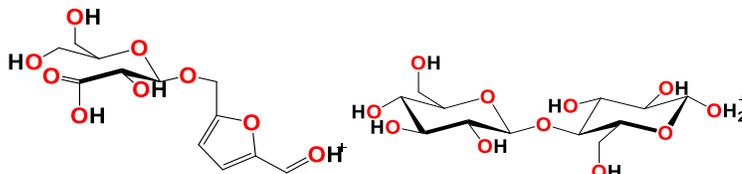
Exact Mass: 241.03

300-400



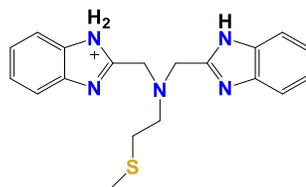
Exact Mass: 303.07

Exact Mass: 305.10



Exact Mass: 305.09

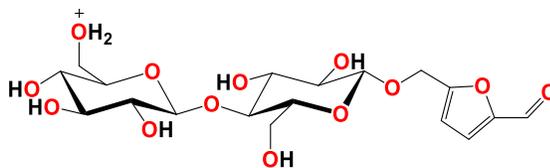
Exact Mass: 343.12



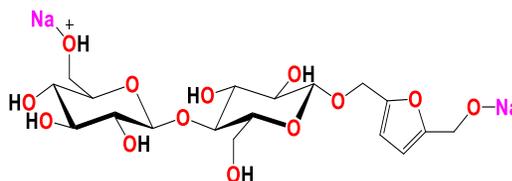
Exact Mass: 352.16

---

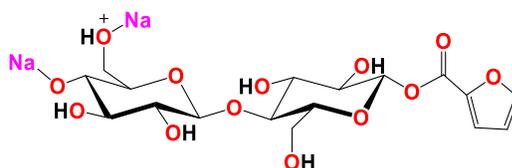
400-500



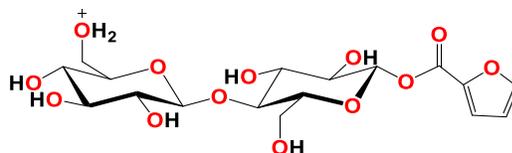
Exact Mass: 451.14



Exact Mass: 497.12



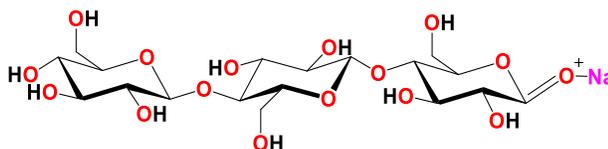
Exact Mass: 481.09



Exact Mass: 437.13

---

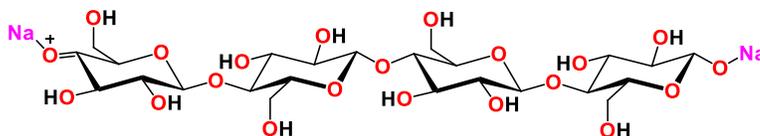
500-600



Exact Mass: 525.14

---

700-800



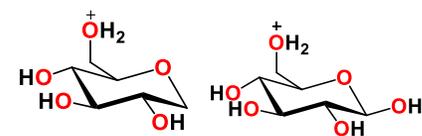
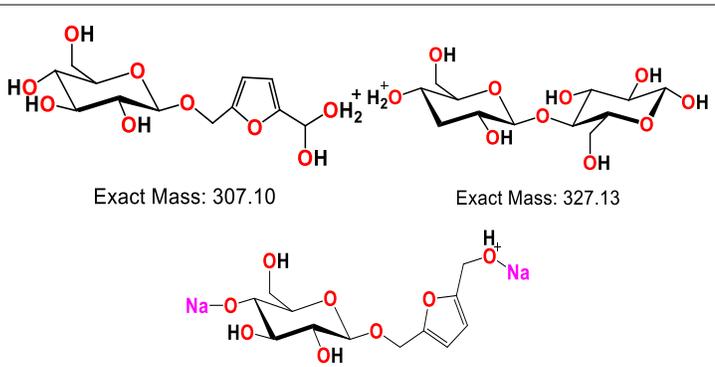
Exact Mass: 709.18

---

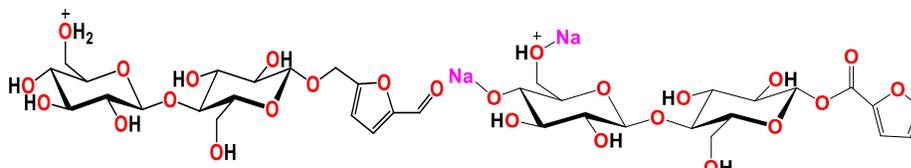
Además de las moléculas propuestas como productos de degradación de la celulosa, se detectaron también las masas correspondientes al ligante y a algunas fracciones de este. Esto puede deberse al pretratamiento dado a las mezclas de reacción, ya que se filtraron por C<sub>3</sub>A

(celita) lo que podría ocasionar la fragmentación de los ligantes, además de sufrir daño oxidativo después de prolongados tiempos de reacción. Según los resultados obtenidos para este complejo, se observa que ocurre más fragmentación en los experimentos realizados solo con el complejo y no con la combinación complejo/mezcla oxidante. También se hacen diferentes propuestas para la misma relación  $m/z$ , ya que sin más información (por ejemplo, RMN), no se puede tener certeza sobre su identidad.

### 5.3.3 Resultados de los estudios de degradación para $\text{CuL}^2$

$\approx m/z$	[Moléculas propuestas + H/Na/K] <sup>+</sup>
100-200	 Exact Mass: 165.08      Exact Mass: 181.07
200-300	 Exact Mass: 261.10      Exact Mass: 277.07      Exact Mass: 299.07
300-400	 Exact Mass: 307.10      Exact Mass: 327.13      Exact Mass: 335.07

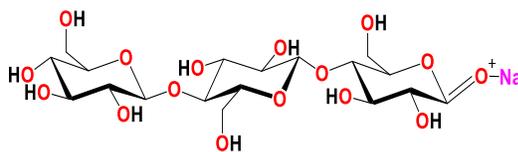
400-500



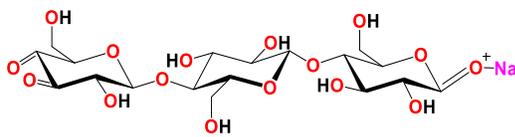
Exact Mass: 451.14

Exact Mass: 481.09

500-600

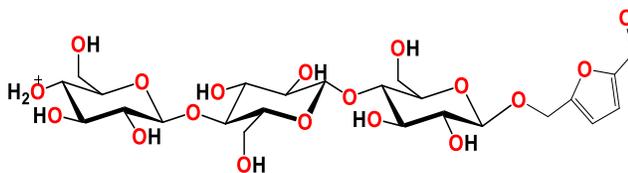


Exact Mass: 525.14

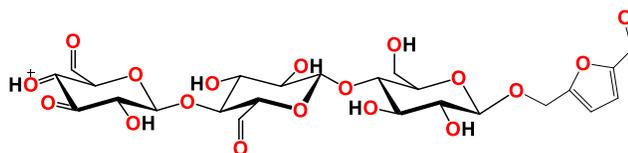


Exact Mass: 521.11

600-700

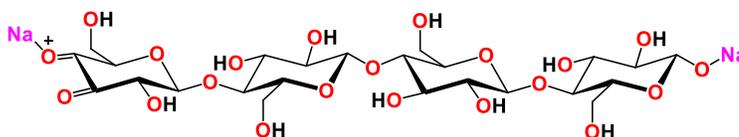


Exact Mass: 613.20

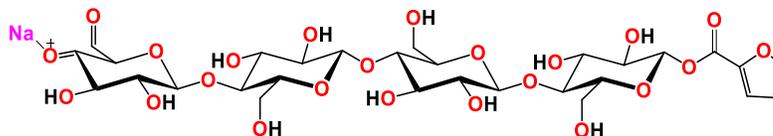


Exact Mass: 605.13

700-800

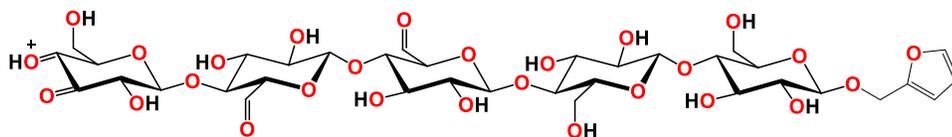


Exact Mass: 707.16



Exact Mass: 779.19

900-1000



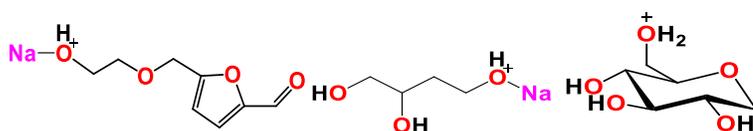
Exact Mass: 901.25

### 5.3.4 Resultados de los estudios de degradación para $\text{CuL}^2 + \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Et}_3\text{N}$

$\approx m/z$

[Moléculas propuestas + H/Na/K]<sup>+</sup>

100-200

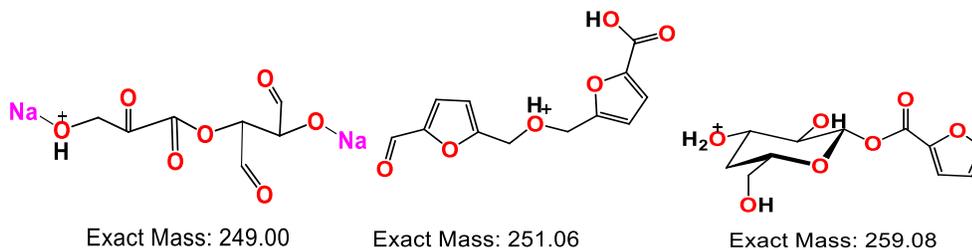


Exact Mass: 193.05

Exact Mass: 129.05

Exact Mass: 165.08

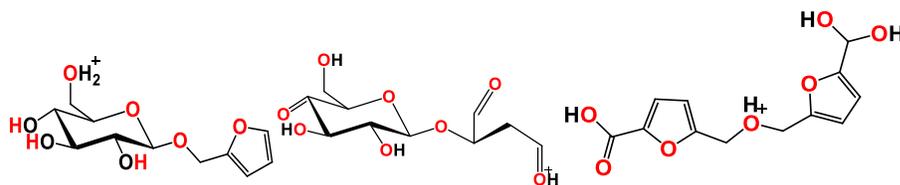
200-300



Exact Mass: 249.00

Exact Mass: 251.06

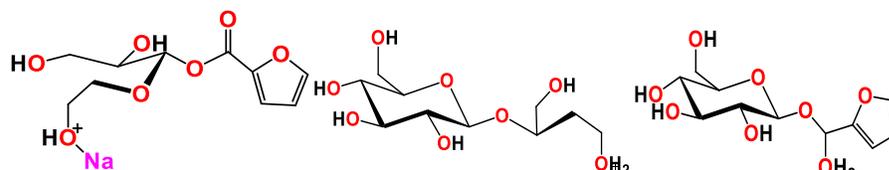
Exact Mass: 259.08



Exact Mass: 261.10

Exact Mass: 263.08

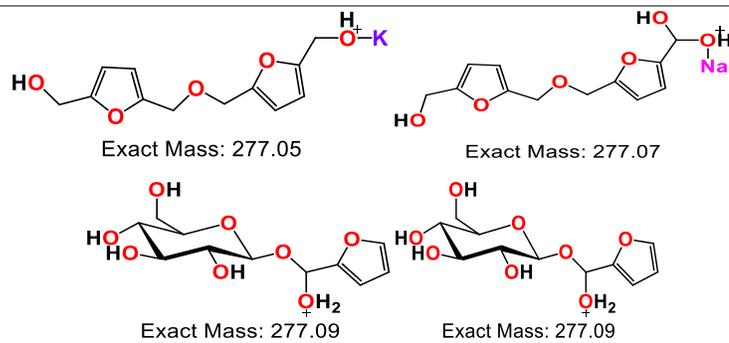
Exact Mass: 269.07



Exact Mass: 269.06

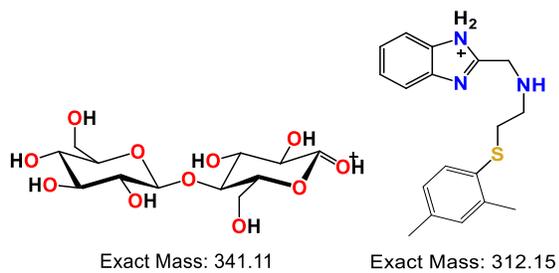
Exact Mass: 269.12

Exact Mass: 277.09



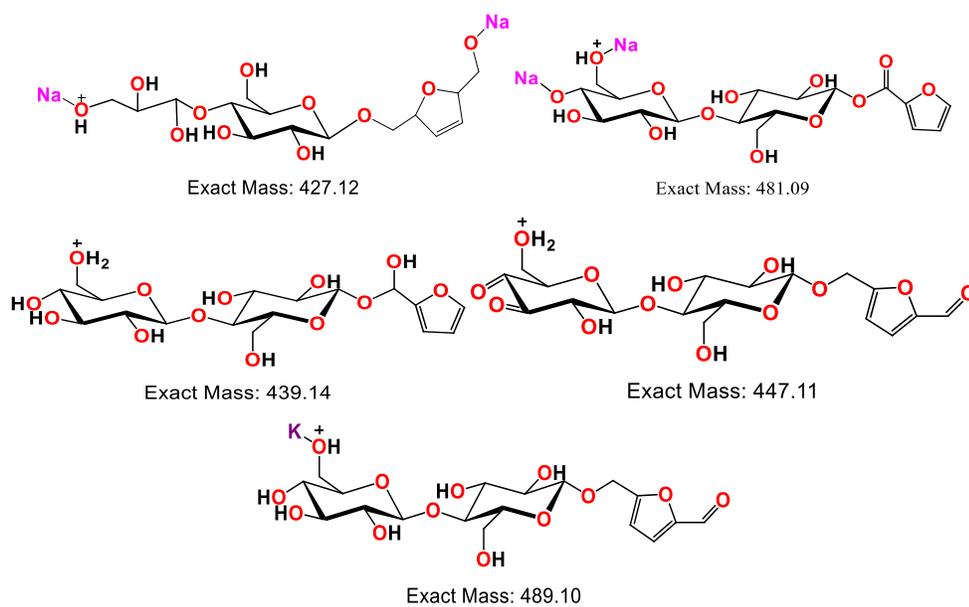
---

300-400



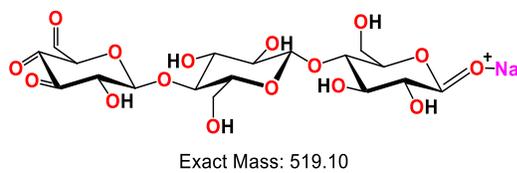
---

400-500



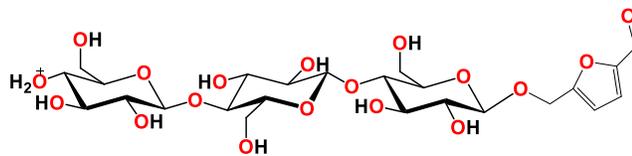
---

500-600



---

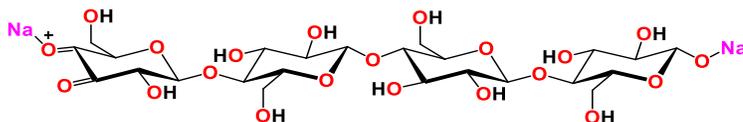
600-700



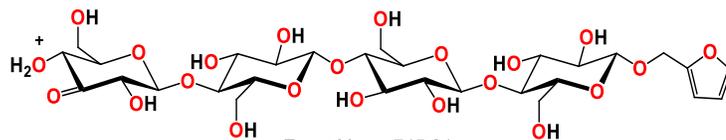
Exact Mass: 613.20

---

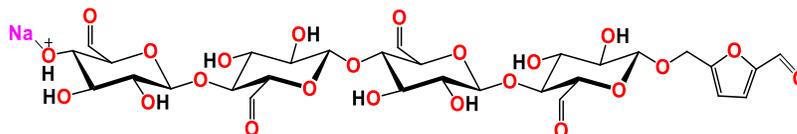
700-800



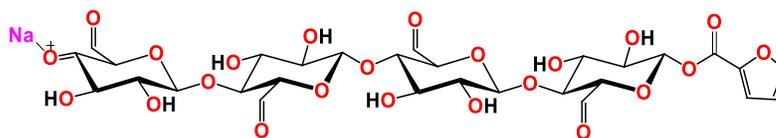
Exact Mass: 707.16



Exact Mass: 745.24



Exact Mass: 789.17

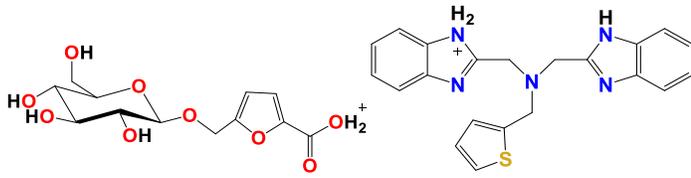
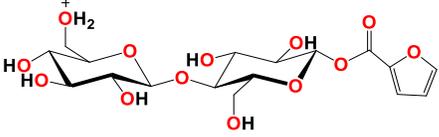
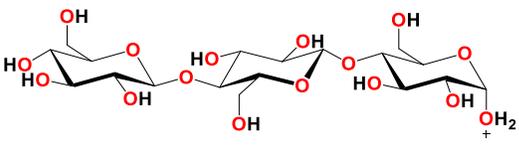


Exact Mass: 773.14

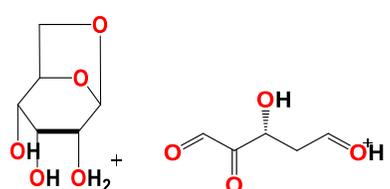
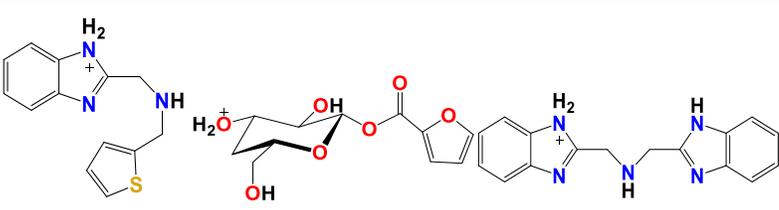
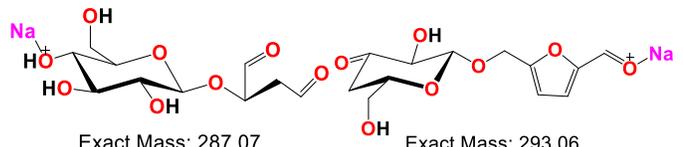
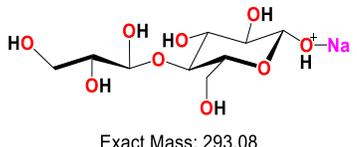
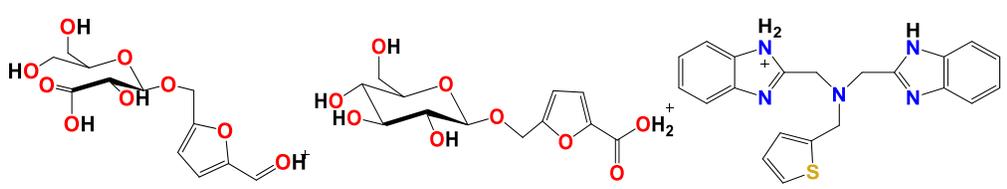
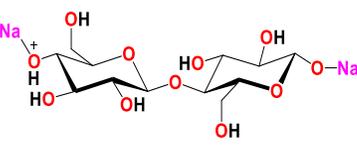
---

Para este complejo se puede observar mayor fragmentación en las pruebas con el complejo y la mezcla oxidante, comparado con la reacción con solo el complejo; además, casi todas las especies identificadas son cadenas de glucosa de hasta 5 miembros con derivados de furanosas.

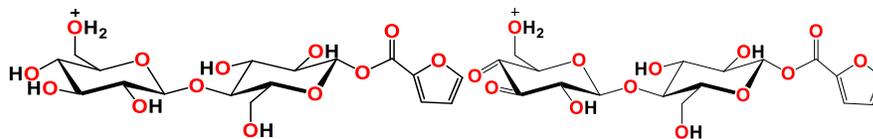
### 5.3.5 Resultados de los estudios de degradación para CuL<sup>3</sup>

$\approx m/z$	[Moléculas propuestas + H/Na/K] <sup>+</sup>
200-300	 <p>Exact Mass: 241.03      Exact Mass: 278.14</p>
300-400	 <p>Exact Mass: 305.09      Exact Mass: 374.14</p>
400-500	 <p>Exact Mass: 437.13</p>
500-600	 <p>Exact Mass: 505.18</p>

### 5.3.6 Resultados de los estudios de degradación para $\text{CuL}^3 + \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Et}_3\text{N}$

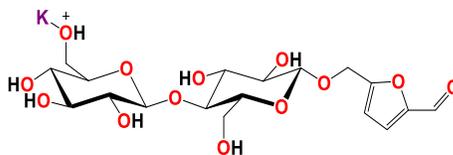
$\approx m/z$	[Moléculas propuestas + H/Na/K] <sup>+</sup>
100-200	 <p>Exact Mass: 163.06    Exact Mass: 131.03</p>
200-300	 <p>Exact Mass: 244.09    Exact Mass: 259.08    Exact Mass: 278.14</p>  <p>Exact Mass: 287.07    Exact Mass: 293.06</p>  <p>Exact Mass: 293.08</p>
300-400	 <p>Exact Mass: 305.09    Exact Mass: 305.09    Exact Mass: 374.14</p>  <p>Exact Mass: 387.09</p>

400-500



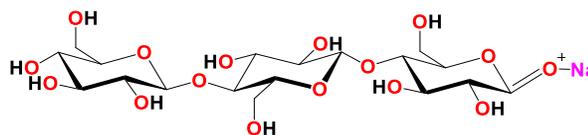
Exact Mass: 437.13

Exact Mass: 433.10



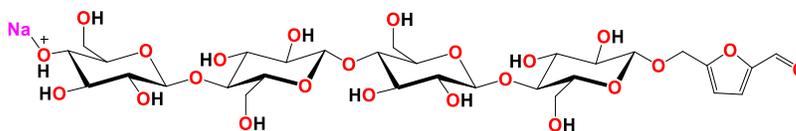
Exact Mass: 489.10

500-600



Exact Mass: 525.14

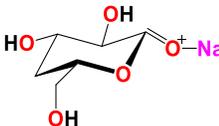
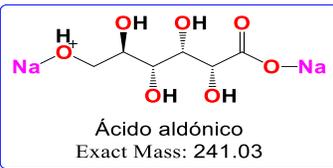
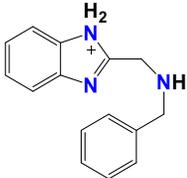
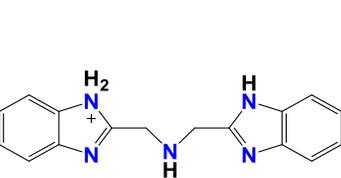
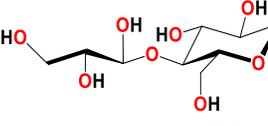
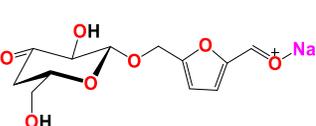
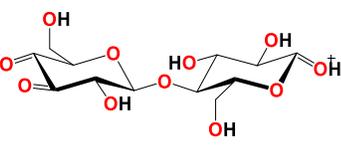
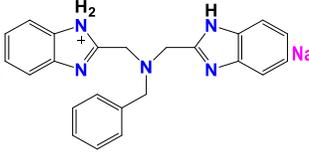
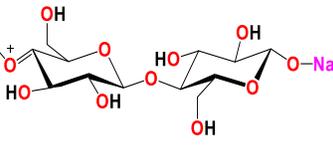
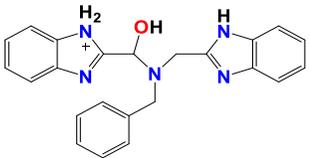
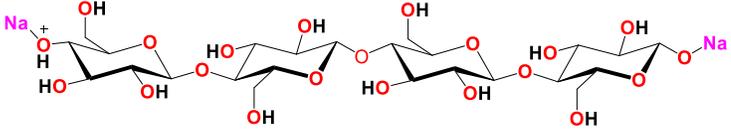
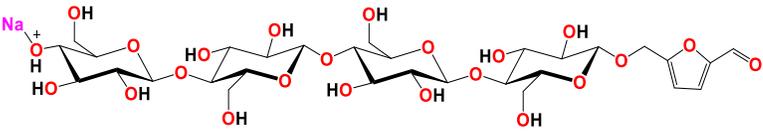
700-800



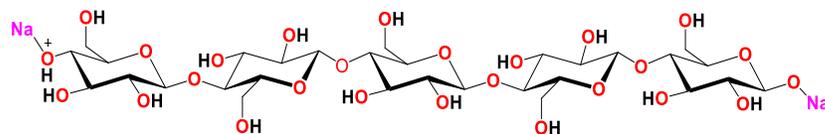
Exact Mass: 797.23

En este caso se puede observar un mayor número de especies en la degradación con complejo y  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ , además de asignar las masas en  $m/z = 241$  y  $163$  como ácido aldónico<sup>36</sup> y levoglucosano<sup>54</sup>, especies que han sido reportadas como productos de degradación oxidativa de celulosa.

### 5.3.7 Resultados de los estudios de degradación para CuL<sup>4</sup>

$\approx m/z$	[Moléculas propuestas + H/Na/K] <sup>+</sup>
100-200	 <p>Exact Mass: 185.04</p>
200-300	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="border: 1px solid blue; padding: 5px; text-align: center;">  <p>Ácido aldónico Exact Mass: 241.03</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 238.13</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 278.14</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 293.08</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 293.06</p> </div> </div>
300-400	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 337.08</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 368.19</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 385.07</p> </div> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 384.18</p> </div>
700-800	<div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;">  <p>Exact Mass: 711.19</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Exact Mass: 797.23</p> </div>

800-900



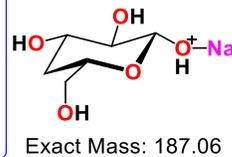
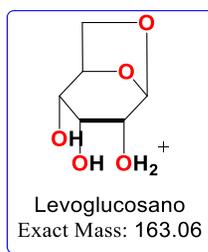
Exact Mass: 873.25

### 5.3.8 Resultados de los estudios de degradación para $\text{CuL}^4 + \text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$

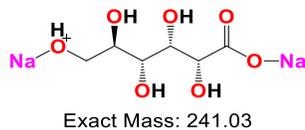
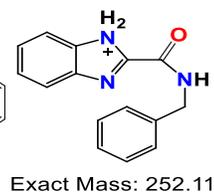
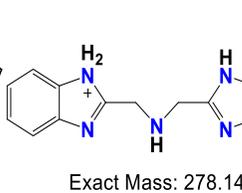
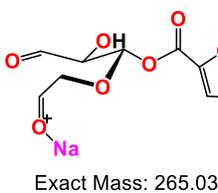
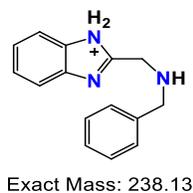
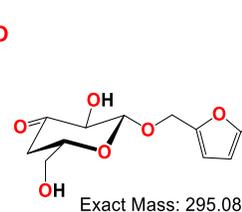
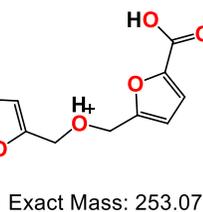
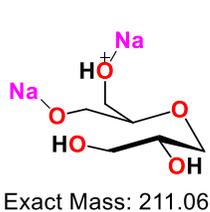
$\approx m/z$

[Moléculas propuestas + H/Na/K]<sup>+</sup>

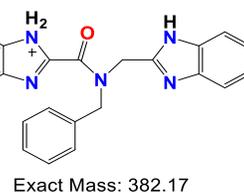
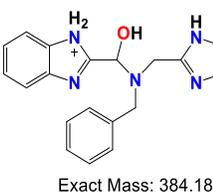
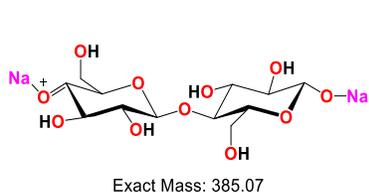
100-200



200-300

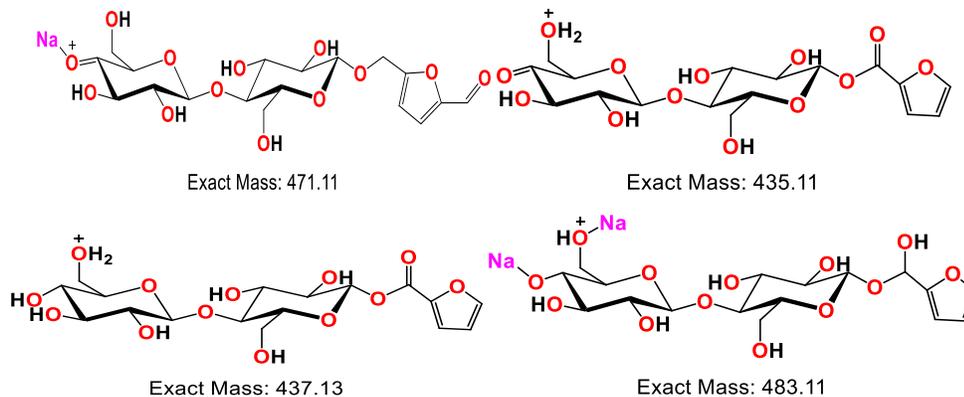


300-400

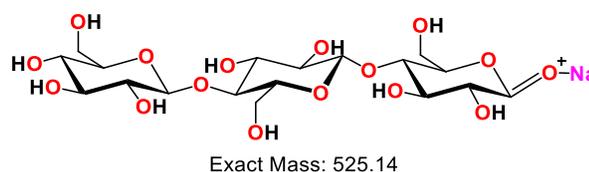


---

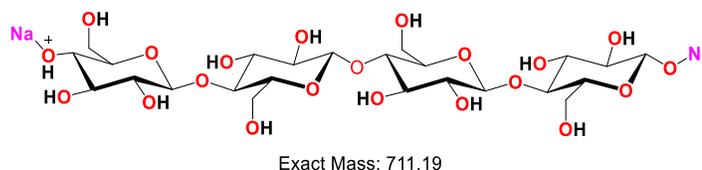
400-500



500-600



700-800



En el caso del complejo  $\text{CuL}^4$  se observa más fragmentación cuando solamente se utiliza el complejo y en el caso de la mezcla de reacción con  $\text{CuL}^4/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$  también se observan masas que coinciden con la oxidación del ligante, en mayor grado que en los casos anteriores.

Las estructuras aquí propuestas son un buen acercamiento basado en reportes previos en donde se han logrado identificar los productos de degradación de la celulosa. No obstante, es necesario hacer un análisis posterior más completo para lograr caracterizarlas inequívocamente.

Por último, se realizaron análisis de espectroscopía infrarroja en la masa que quedó sin consumir para cada uno de los experimentos para identificar productos de degradación insolubles. La comparación con celulosa se muestra en las Figuras 41 y 42.

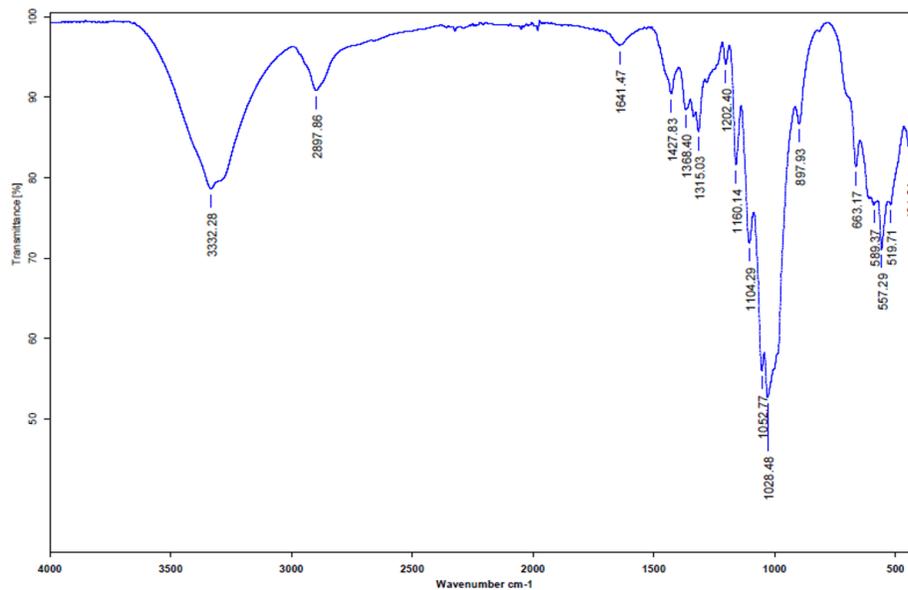


Figura 41. Espectro infrarrojo de la celulosa en pastilla de KBr

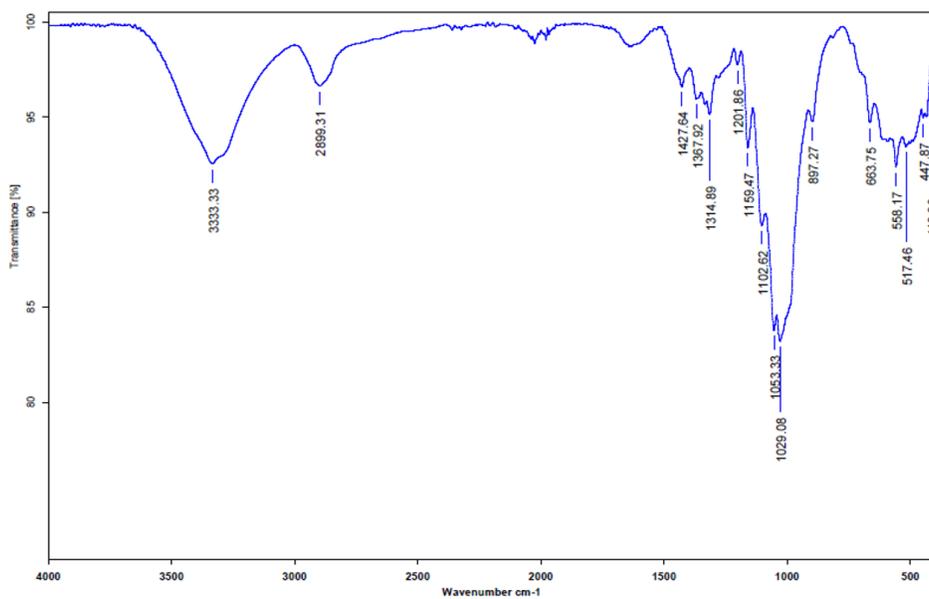


Figura 42. Espectro infrarrojo de la masa sobrante de la reacción de celulosa con el complejo CuL<sup>1</sup> y la mezcla oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N en pastilla de KBr

Las bandas observadas en ambos casos son prácticamente idénticas y corresponden al espectro de celulosa, por lo que se descarta la posibilidad de que haya productos de degradación insolubles y se puede aseverar que toda la masa sobrante de las reacciones descritas anteriormente es celulosa sin reaccionar.

## 6 CONCLUSIONES

---

- Se lograron sintetizar y caracterizar los cuatro compuestos de coordinación de Cu(II) con ligantes bencimidazólicos propuestos. También se realizaron los experimentos correspondientes en espectroscopia UV-visible para intentar identificar cambios en el ambiente de coordinación al hacer reaccionar los complejos con dos agentes oxidantes. No obstante, no se obtuvieron resultados concluyentes para determinar que especies reactivas se forman, particularmente cuando los experimentos se llevaron a cabo en disolución de CH<sub>3</sub>CN. Esto tal vez se deba a que la temperatura de las mediciones no es suficientemente baja para observar la formación de las especies reactivas, por lo que el disolvente se reemplazó por CH<sub>3</sub>OH que puede trabajar a -80°C. Esto se confirmó, ya que con el cambio de disolvente se observaron cambios lo suficientemente notorios como para asociar la formación de una nueva especie a la aparición de bandas de absorción distintas a las del complejo inicial, inclusive llegando a identificar una de ellas mediante espectrometría de masas. La especie Cu(II)-hidroxo detectada debe formarse por ruptura del enlace O-O, potencialmente de un precursor Cu(II)-hidroperoxo.
- Los resultados obtenidos de las mediciones realizadas en RPE muestran también que al adicionar peróxido de hidrógeno, las especies formadas en disolución son monoméricas, lo cual es congruente con la propuesta de un precursor Cu(II)-hidroperoxo. Se plantea realizar experimentos de espectroscopía IR en disolución a baja temperatura para identificar vibraciones correspondientes al enlace O-O, para reafirmar la presencia de una especie intermediaria de este tipo.
- Asimismo, se realizaron pruebas de degradación de un polisacárido recalcitrante, en este caso celulosa, con los complejos de cobre en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N. De estas pruebas se obtuvieron resultados interesantes ya que se observan porcentajes de degradación considerables, siendo los más favorecedores los obtenidos con el complejo CuL<sup>3</sup> y la mezcla oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N. El potencial de media onda de este complejo tiene un valor de -0.09 V, lo cual lo vuelve en un complejo resistente a la reducción y al estar en su forma oxidada interactúa más favorablemente con la mezcla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N, a diferencia de los complejos con potenciales más altos. Estos

favorecerían la formación de especies de Cu(I), disminuyendo la cantidad de especies reactivas y a su vez teniendo un pobre desempeño en la degradación de celulosa, tal es el caso del complejo CuL<sup>1</sup> cuyo potencial de 0.13 V es el más alto. Las masas observadas en los análisis de HPLC-MS coinciden con muchas especies derivadas de la degradación de celulosa reportadas con anterioridad, por lo que en efecto los complejos mimetizan la acción catalítica de las enzimas PHM y LPMO.

- Debido a los resultados positivos obtenidos de las pruebas de degradación, se propone realizar pruebas adicionales utilizando diferentes agentes oxidantes, como por ejemplo KO<sub>2</sub>, con diferentes tiempos de reacción y temperaturas para optimizar el proceso, y posteriormente realizar las pruebas ya no con celulosa pura, sino propiamente con biomasa obtenida de residuos sólidos con el fin de probar su posible utilización como alternativa a los procesos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica conocidos.

## 7 REFERENCIAS

---

1. Johnsson, F., Kjärstad, J. & Rootzén, J. The threat to climate change mitigation posed by the abundance of fossil fuels. *Clim. Policy* **19**, 258–274 (2019).
2. IEA, 2011, Key World Energy Statistics 2011. (2011). Available at: <http://www.iea.org>.
3. Curtis, F. Climate change, peak oil, and globalization: Contradictions of natural capital. *Rev. Radic. Polit. Econ.* **39**, 385–390 (2007).
4. Fantazzini, D., Höök, M. & Angelantoni, A. Global oil risks in the early 21st century. *Energy Policy* **39**, 7865–7873 (2011).
5. Höök, M. & Tang, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. *Energy Policy* **52**, 797–809 (2013).
6. Nigam, P. S. & Singh, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* **37**, 52–68 (2011).
7. Kar, Y. & Deveci, H. Importance of P-series fuels for flexible-fuel vehicles (FFVs) and alternative fuels. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* **28**, 909–921 (2006).
8. Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N. & Faruq, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **66**, 751–774 (2016).
9. IRENA. *Untapped Potential for Climate Change Action: Renewable Energy in Nationally Determined Contributions*. (2017).
10. Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A., Bochmann, M., & Grimes, R. *Advanced Inorganic Chemistry*. (Wiley, 1988).
11. Wilkinson, G., Gillard, R. D. & McCleverty, J. A. *Comprehensive coordination chemistry: the synthesis, reactions, properties & applications of coordination compounds*. (Pergamon Press, 1987).
12. Fawcett, T. G., Bernarducci, E. E., Krogh-jespersen, K. & Schugar, H. J. Charge-Transfer Absorptions of Cu( II)-Imidazole and Cu( II)-Imidazolate Chromophores. *Am. Chem. Soc.* **102(8)**, 2598–2604 (1980).
13. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Principles Of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2004).
14. Prigge, S. T. Amidation of Bioactive Peptides: The Structure of Peptidylglycine -

- Hydroxylating Monooxygenase. *Science* (80). **278**, 1300–1305 (1997).
15. Hatcher, L. Q. & Karlin, Æ. K. D. Oxidant types in copper – dioxygen chemistry : the ligand coordination defines the Cu n -O<sub>2</sub> structure and subsequent reactivity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 669–683 (2004).
  17. Quist, D. A., Diaz, D. E., Liu, J. J. & Karlin, K. D. Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **22**, 253–288 (2018).
  18. Bauman, A. T., Yukl, E. T., Alkevich, K., McCormack, A. L. & Blackburn, N. J. The hydrogen peroxide reactivity of peptidylglycine monooxygenase supports a Cu(II)-superoxo catalytic intermediate. *J. Biol. Chem.* **281**, 4190–4198 (2006).
  19. Kjaergaard, C. H., Qayyum M., Wong S. Spectroscopic and computational insight into the activation of O<sub>2</sub> by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8797–8802 (2014).
  20. Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18779–18784 (2012).
  21. Beeson, W. T., Vu, V. V., Span, E. A., Phillips, C. M. & Marletta, M. A. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 923–946 (2015).
  22. Phillips, C. M., Beeson, W. T., Cate, J. H. & Marletta, M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem. Biol.* **6**, 1399–1406 (2011).
  23. Chen, P., Bell, J., Eipper, B. A. & Solomon, E. I. Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine  $\alpha$ -Hydroxylating Monooxygenase. Spectroscopic Definition of the Resting Sites and the Putative Cu(II)-OOH Intermediate. *Biochemistry* **43**, 5735–5747 (2004).
  24. Cramer, C. J. & Tolman, W. B. Mononuclear Cu-O<sub>2</sub> Complexes: Geometries, Spectroscopic Properties, Electronic Structures, and Reactivity. *Accounts of Chemical Research* **40**, 601–608 (2007).
  25. Mirica, L. M., Ottenwaelder, X. & Stack, T. D. P. Structure and Spectroscopy of Copper-Dioxygen Complexes. *Chem. Rev.* **104**, 1013–1045 (2004).
  26. Edward I. Solomon, Jake W. Ginsbach, David E. Heppner, Matthew T. Kieber-Emmons, Christian H. Kjaergaard, Pieter J. Smeets, Li Tian, & J. S. W. Copper Dioxygen (Bio)Inorganic Chemistry. *Faraday Discuss* **148**, 11–108 (2011).

27. Himes, R. A. & Karlin, K. D. Copper-Dioxygen Complex Mediated C-H Bond Oxygenation: Relevance for Particulate Methane Monooxygenase (pMMO). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 119–131 (2009).
28. Spencer, D. J. E., Aboeella, N. W., Reynolds, A. M., Holland, P. L. & Tolman, W. B.  $\beta$ -Diketiminato Ligand Backbone Structural Effects on Cu ( I )/ O<sub>2</sub> Reactivity : Unique Copper - Superoxo and Bis (  $\mu$ -oxo ) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2**, 3–4 (2002).
29. Spencer, D. J. E., Reynolds, A. M., Holland, P. L., Jazdzewski, B. A., Duboc-Toia, C., Le Pape, L., Yokota, S., Tachi, Y., Itoh, S., Tolman, W. B. Copper chemistry of  $\beta$ -diketiminato ligands: Monomer/dimer equilibria and a new class of bis( $\mu$ -oxo)dicopper compounds. *Inorg. Chem.* **41**, 6307–6321 (2002).
30. Aboeella, N. W., Gherman, B., Hill, L M. R., York, J. T., Holm, N., Young, V. G., Cramer, C. J., & Tolman, W. B. Effects of Thioether Substituents on the O<sub>2</sub> Reactivity of  $\beta$ -Diketiminato - Cu ( I ) Complexes : Probing the Role of the Methionine Ligand in Copper Monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **128(10)** 3445–3458 (2006).
31. Kobayashi, Y., Ohkubo K., Nomura, T., Kubo, M., Fujieda, N., Sugimoto, H., Fukuzumi, S., Goto, K., Ogura, T., Itoh, S. Copper(I)-dioxygen reactivity in a sterically demanding tripodal tetradentate tren ligand: Formation and reactivity of a mononuclear copper(II) end-on superoxo complex. *Eur. J. Inorg. Chem.* **29**, 4574–4578 (2012).
32. Zhou, L., Powell, D., Nicholas, K. M. & Uni, V. Tripodal Bis ( imidazole ) Thioether Copper ( I ) Complexes : Mimics of the Cu ( B ) Site of Hydroxylase Enzymes. *Inorg. Chem.* **45**, 3840–3842 (2016).
33. Zhou, L. & Nicholas, K. M. Imidazole Substituent Effects on Oxidative Reactivity of Tripodal ( imid )<sub>2</sub>( thioether )Cu(I) Complexes. *Inorg. Chem.* **47**, 4356–4367 (2008).
34. Lozano, L. A. R. S. Tesis de Licenciatura. Síntesis y caracterización de complejos de cobre con ligantes bis(bencimidazolil)amina. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2011).
35. Edgcomb, S. P. & Murphy, K. P. Variability in the pKa of histidine side-chains correlates with burial within proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **49**, 1–6 (2002).
36. Neira, A. C., Martínez-Alanis, P.R., Aullón, G., Flores-Álamo, M., Zerón, P., Company, A., Chen, J., Kasper, J. B., Browne, W. R., Nordlander, E., & Castillo, I. Oxidative Cleavage of Cellobiose by Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO)-Inspired Copper Complexes. *ACS Omega.* **4** 10729-10740. (2019).
37. Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., & Lee, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.

*Bioresour. Technol.* **96**, 1959–1966 (2005).

38. Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N. & Faruq, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **71**, 475–501 (2017).
39. Crawford, J. B., Chen, G., Gauthier, D., Wilson, T., Carpenter, B., Baird, I. R., McEachern, E., Kaller, A., Harwig, C., Atsma, B., Skerlj, R. T., Bridger, & G. J. Laboratory Synthesis Abstract: AMD070, a CXCR4 Chemokine Receptor Antagonist: Practical Large-Scale Laboratory Synthesis. *Organic Process Research & Development.* **12**, 823–830 (2008).
40. Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals.* (Butterworth-Heinemann, 2003).
41. Inc. Irvine. Spartan'14 Wavefunction.
42. Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and. *Handb. Vib. Spectrosc.* 1872–1892 (2006).
43. Murphy, D. M. EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Spectroscopy of Polycrystalline Oxide Systems. *Metal Oxide Catalysis* **1**, (2009).
44. Maiti, D. Fry, H. C., Woertink, J. S., Vance, M. A., Solomon, E. I., & Karlin, K. D. A 1:1 copper-dioxygen adduct is an end-on bound superoxo copper(II) complex which undergoes oxygenation reactions with phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 264–265 (2007).
45. Robbins, M. H. & Drago, R. S. Activation of hydrogen peroxide for oxidation by copper(II) complexes. *J. Catal.* **170**, 295–303 (1997).
46. Pędziwiatr, P., Mikołajczyk, F., Zawadzki D., Mikołajczyk, K., Bedka, A. Decomposition of hydrogen peroxide- kinetics and review of chosen catalysts. *Acta Innov.* **26**, 45–52 (2018).
47. 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. Chemie - Int. Ed.* **37**, 798–799 (1998).
48. Kodera, 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 [2]. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7715–7716 (2001).
49. Chen, P., Fujisawa, K. & Solomon, E. I. Spectroscopic and theoretical studies of mononuclear copper(II) alkyl- and hydroperoxo complexes: Electronic structure

contributions to reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 10177–10193 (2000).

50. Frandsen, K. E. H., Simmons, T. J., Dupree, P., Poulsen, J. N., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Johnston, E. M., Tovborg, M., Johansen, K. S., Freiesleben, P., Marmuse, L., Fort, S., Cottaz, S., Driguez, H., Henrissat, B., Lenfant, N., Tuna, F., Baldansuren, A., Davies, G. J., Leggio, L. L., & Walton, P. H. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*. **12**, 298–303 (2016).
51. Forsberg, Z., Bissaro, B., Gullesen, J., Dalhus, B., Vaaje-Kolstad, G., & Eijsink, V. G. H. Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monooxygenase functionality. *J. Biol. Chem.* **293**, 1397–1412 (2018).
52. Hill, D. J. T., Le, T. T., Darveniza, M. & Saha, T. A study of the degradation of cellulosic insulation materials in a power transformer. Part III: Degradation products of cellulose insulation paper. *Polym. Degrad. Stab.* **51**, 211–218 (1996).
53. Béguin, P. & Aubert, J.-P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 25–58 (1994).
54. Schwenker, R. F. & Pacsu, E. Pyrolytic Degradation Products of Cellulose. *Ind. Eng. Chem. - Chem. Eng. Data Ser.* **2**, 83–88 (1957).

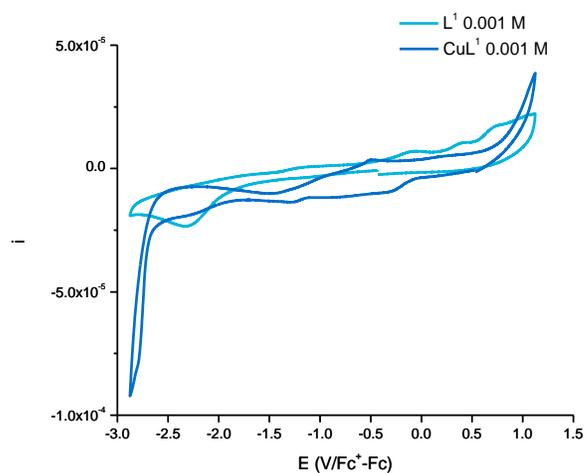
## 8 ANEXOS

---

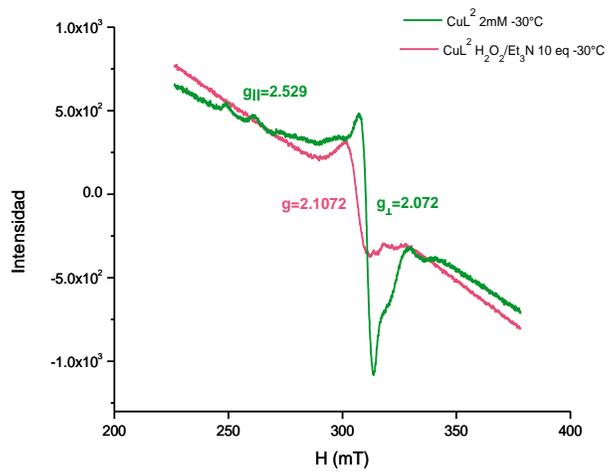
### 8.1 DATOS CRISTALOGRAFICOS DE $\text{CuL}^1$

Fórmula empírica	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> Cu N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S
Masa atómica	652.94
Temperatura	149(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	Pbca
Dimensiones de celda unitaria	a = 10.4488(6) Å $\alpha = 90^\circ$ . b = 18.4597(10) Å $\beta = 90^\circ$ . c = 26.6508(14) Å $\gamma = 90^\circ$ .
Volumen	5140.5(5) Å <sup>3</sup>
Z	8
Densidad (calculada)	1.687 Mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	1.198 mm <sup>-1</sup>
F(000)	2664
Tamaño de cristal	0.395 x 0.151 x 0.032 mm <sup>3</sup>
Intervalo de $\theta$ para la colección de datos	2.207 to 25.416°.
Intervalo de índices	-10<=h<=12, -22<=k<=22, -32<=l<=32
Reflexiones colectadas	56090
Reflexiones independientes	4738 [R(int) = 0.1798]
Total a $\theta = 25.242^\circ$	100.0 %
Corrección por absorción	Semi empírico para equivalentes
Máximo y mínimo de transmisión	0.7452 and 0.5490
Método de refinamiento	Matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>

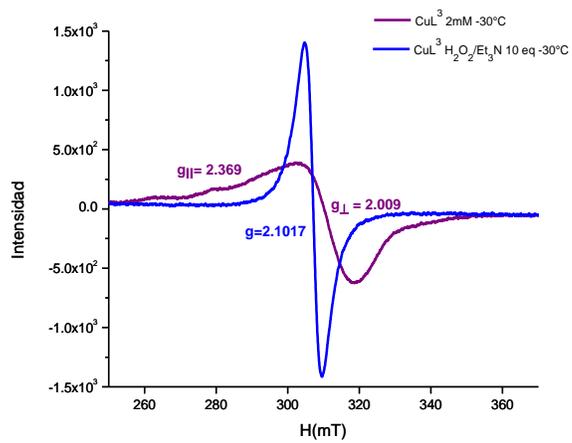
Datos / restricciones / parámetros	4738 / 0 / 354
Bondad en el ajuste de $F^2$	1.069
Índices finales [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R1 = 0.0875$ , $wR2 = 0.1596$
Índices de R (Todos los datos)	$R1 = 0.1417$ , $wR2 = 0.1835$
Diferencia mayor entre pico máx. y min.	0.818 and -0.634 e.Å <sup>-3</sup>



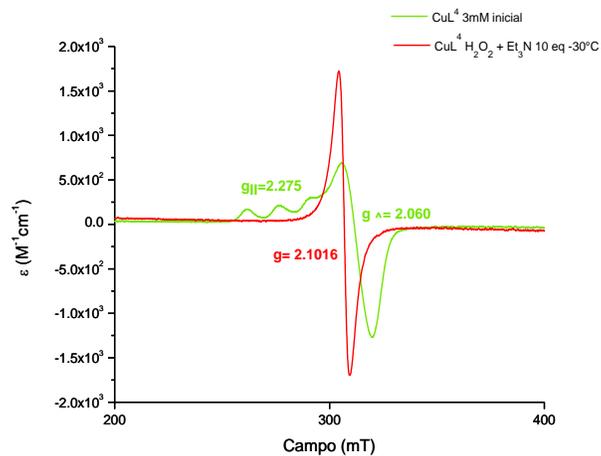
**Ilustración 1.** Voltamperogramas anódicos de  $L^1$  y  $CuL^1$  (vs  $Fc^+/Fc$ ) a una concentración de  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$ , en  $CH_3CN$  electrodo de trabajo vítreo y electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, concentración  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$



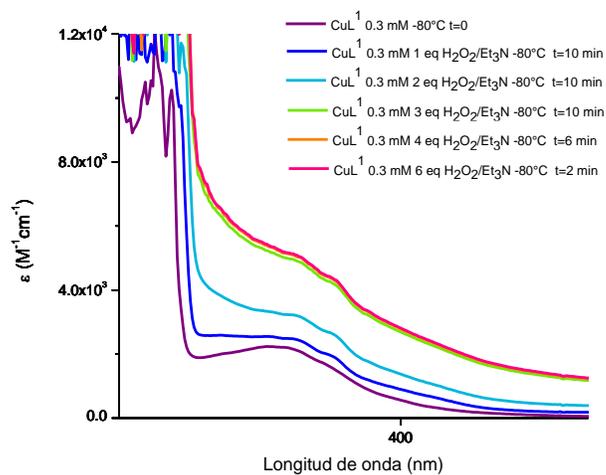
**Ilustración 2.** Espectros de RPE del complejo de  $\text{CuL}^2$  antes y después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$



**Ilustración 3.** Espectros de RPE del complejo  $\text{CuL}^3$  antes y después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$



**Ilustración 4.** Espectros de RPE del complejo  $\text{CuL}^4$  antes y después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$



**Ilustración 5.** Espectro UV-vis del complejo  $\text{CuL}^1$  con concentración 0.3 mM en disolución de MeOH a  $-80^\circ\text{C}$

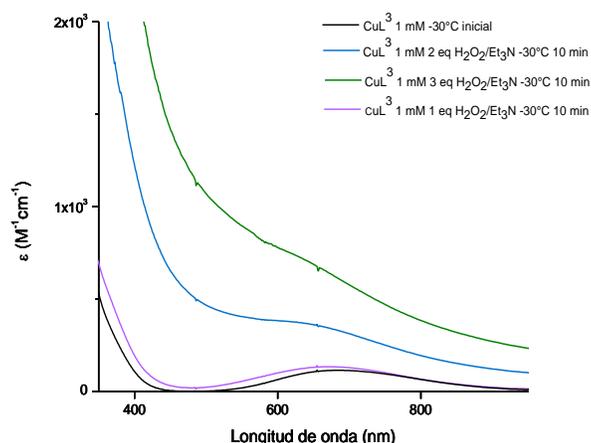


Figura 43. Espectro UV-vis del complejo  $\text{CuL}^3$  con concentración 1mM en disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}$  a  $-30^\circ\text{C}$

#### *Degradación de celulosa escala preparativa*

Las disoluciones blanco se dejaron en agitación durante 24 horas antes de medirse. Las disoluciones de las pruebas de degradación con todos los complejos y el agente oxidante se dejaron reaccionar durante periodos de 24 y 72 horas; en el primer caso se agregaron 30 mg de celulosa en todos los experimentos con 1 equivalente de complejo y 10 equivalentes de agente oxidante, mientras que para el segundo caso se doblaron las cantidades, agregando 2 equivalentes de complejo y 20 de agente oxidante. Los resultados obtenidos en los tiempos de retención y en los espectros de masas fueron virtualmente los mismos, cambiando únicamente el porcentaje de celulosa sobrante en cada experimento.

## Blancos

### 1. Celulosa

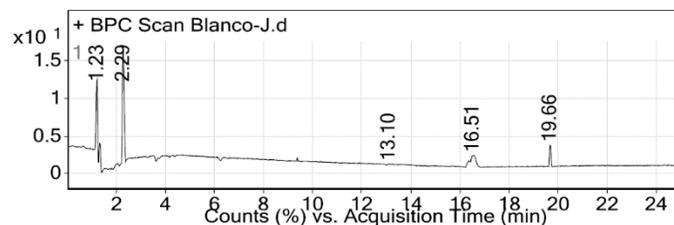
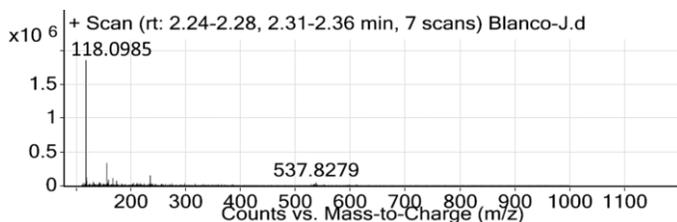


Ilustración 6. Cromatograma de la disolución de 30 mg de celulosa en 10 mL de agua destilada

Tabla 5. Tiempos de retención y áreas significativas en el cromatograma 1

No.	Tiempo de retención	Área
2	2.29	12479563.5

#### ■ No. 1



Pico asignado a la degradación de columna

### 2. Celulosa + CuSO<sub>4</sub>

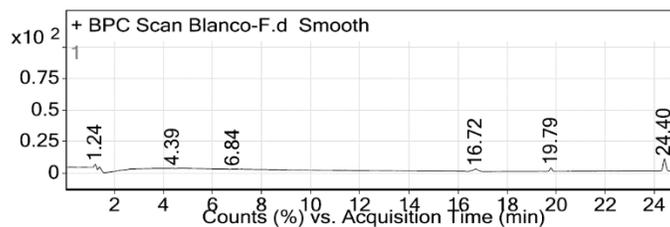
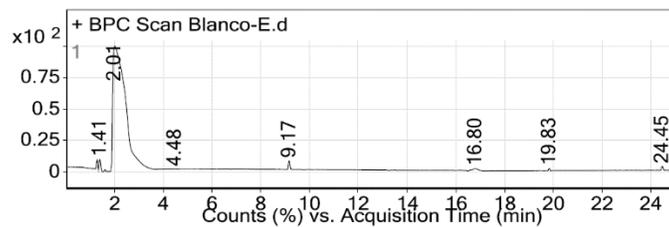


Ilustración 7. Cromatograma de la disolución de 30 mg de celulosa con 1 equivalente de CuSO<sub>4</sub>

### 3. Celulosa + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N

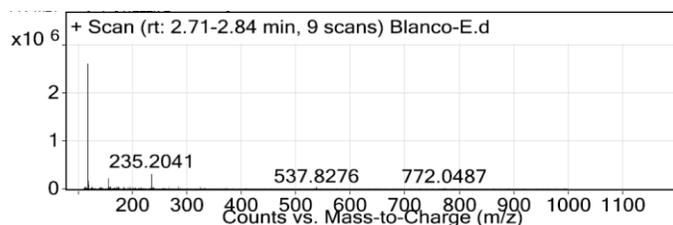


**Ilustración 8.** Cromatograma de la disolución de 30 mg de celulosa con 10 equivalentes de la mezcla oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N

**Tabla 6.** Tiempos de retención y áreas significativas en el cromatograma 3

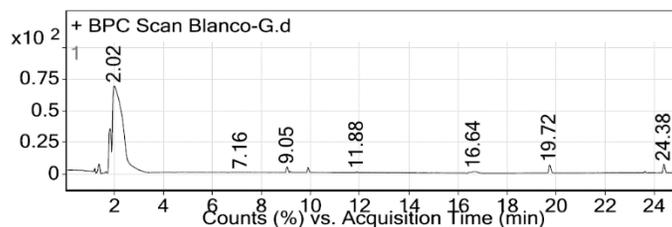
No.	Tiempo de retención	Área
1	2.01	596932110

#### ▪ No 1



Pico asignado a la degradación de la columna

### 4. Celulosa + CuSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N

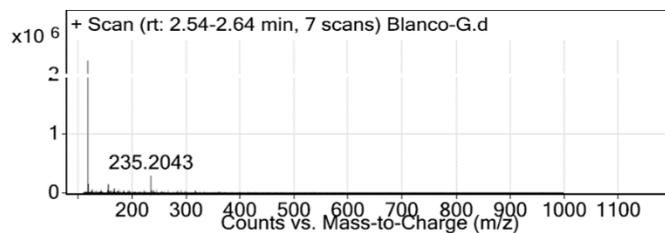


**Ilustración 9.** Cromatograma de la disolución de 30 mg de celulosa con 1 equivalente de CuSO<sub>4</sub> Y 10 equivalentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N

**Tabla 7.** Tiempos de retención y áreas significativas del cromatograma 4

No	Tiempo de retención	Área
1	2.01	589762123

- No. 1



Pico asignado a la degradación de la columna