



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DEGRADACIÓN DE BIOMASA RECALCITRANTE CON COMPLEJOS DE COBRE
BIOINSPIRADOS EN MONOOXIGENASAS LÍTICAS DE POLISACÁRIDOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. Diego Fernando Abad Aguilar

Dr. Iván Castillo Pérez

INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2021



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 BIOMASA RECALCITRANTE CON COMPLEJOS DE COBRE
BIOINSPIRADOS EN MONOOXIGENASAS LÍTICAS DE POLISACÁRIDOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Quím. Diego Fernando Abad Aguilar



Ciudad de México, Junio 2021.

Miembros del Jurado

Presidente	Dra. Laura María Gasque Silva	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Verónica García Montalvo	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Nazario López Cruz	UAE-Morelos
Vocal	Dra. Karen Ochoa Lara	Universidad de Sonora
Secretario	Dra. Susana Porcel García	Instituto de Química, UNAM

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 2-2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Iván Castillo y el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría (CVU. 997517) y el proyecto FALTA AQUÍ NOMBRE TIPO DE PROYECTO A1-S-8682



Quím. Diego Fernando Abad Aguilar

Sustentante



Dr. Ivan Castillo Pérez

Tutor

AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM
- Al proyecto DGAPA-PAPIIT IN217020
- A CONACyT por la beca 997517 y proyecto A1-S-8682
- Al Dr. Ivan Castillo Pérez por su guía y apoyo incondicional y a todos los integrantes del laboratorio 2-2 por brindarme su apoyo y compartir momentos estelares de nuestra ciencia.
- Al equipo técnico y académico del Instituto de Química
- 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.
- M. en C. Virginia Gómez Vidales por la obtención y asesoramiento en resonancia paramagnética electrónica.
- A mis padres que me han brindado siempre su apoyo incondicional
- A Hugo Hernández, Armando Berlanga y Cristina García por todas las conversaciones de química y otros temas que tuvimos que me ayudaron a comprender mucho más esta hermosa ciencia.
- A Michelle Peñaherrera, porque a pesar de todas las dificultades de este camino ha estado allí siempre a mi lado para darme su apoyo y su amor incondicional.

Contenido

Glosario.....	VII
Resumen.....	IX
Introducción.....	X
Antecedentes.....	1
Enzimas y Catálisis.....	1
Metaloenzimas.....	2
Metaloenzimas de Cobre.....	2
Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos.....	5
Estructura.....	6
Unión de Sustrato y Regioselectividad de Oxidación.....	8
Mecanismo de Reacción y Activación de Enlaces C-H.....	9
Biomasa y Biocombustibles.....	10
Complejos Biomiméticos de LPMO.....	12
Planteamiento del Problema.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Metodología.....	19
General.....	19
Equipos.....	19
Degradación de Biomasa Recalcitrante a Escala Preparativa.....	19
Pruebas de Captura de Radicales.....	20
Síntesis y Caracterización.....	21
Resultados y Discusión.....	24
Pruebas de Degradación.....	27
Pruebas con Catalizador Cu ₂ BB + Agente Oxidante a T ambiente durante 24 horas:.....	27
Prueba de trampa de radicales.....	31
Efecto del tiempo de reacción en la degradación de Biomasa:.....	32
Análisis de los productos de degradación por HPLC-MS.....	33
Estudio Morfológico usando Microscopía de Barrido Electrónico:.....	38
Conclusiones.....	40
Perspectivas.....	40
Anexos.....	41
Referencias.....	48

Glosario

- DG: Energía Libre de Gibbs
- FMN: Mononucleótido de Flavina
- FAD: Dinucleótido de Adenina Flavina
- PEO: Proceso de Evolución de Oxígeno
- RPE: Resonancia Paramagnética Electrónica
- LPMO: Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos
- ADN: Ácido Desoxiribonucleico
- GH61: Hidrogenasa de Glucosa 61
- CBP21: Proteína de anclaje a Celulosa 21
- CDH: Celobiosa Deshidrogenasa
- DFT: Teoría de Funcionales de la Densidad
- TEMPO: 2,2,6,6-Tetrametilpiperidil-1-Oxil
- DMF: Dimetil Formamida
- [emim][ABS]: 1-etil-3-metilimidazolio xileno sulfonato

- EEH: Electrodo Estándar de Hidrógeno

- TBP: Trigonal Bipiramidal

- pMMO: Monooxigenasa de Metano Particulada

- 2BB: bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina

- Abreviaturas para interpretación de señales FT-IR en inglés traducidas al español:
 - ❖ w: weak = débil
 - ❖ m: médium = mediano
 - ❖ s: strong = fuerte
 - ❖ sh: sharp = agudo
 - ❖ br: broad = ancho

Resumen

En los últimos años ha existido la permanente búsqueda de una manera para obtener una forma más eficiente y barata de conseguir biocombustibles a partir de biomasa recalcitrante, siendo para este fin necesario el desarrollo de catalizadores que permitan aprovechar de mejor manera este sustrato que generalmente se desecha en la industria. Nuestro grupo de investigación ha logrado sintetizar catalizadores de cobre bioinspirados en las enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos generadas por hongos para llevar a cabo la degradación oxidativa de celulosa, quitina y lignocelulosa hacia azúcares fermentables que posteriormente podrían ser aprovechados para la generación de bioetanol. En el presente trabajo se ha demostrado que nuestro catalizador Cu₂BB puede llevar a cabo la degradación oxidativa de biomasa recalcitrante tanto en condiciones en las que el agente oxidante es el oxígeno molecular atmosférico como también cuando se tiene una cantidad de 15% masa/volumen de H₂O₂, con un porcentaje de degradación de aproximadamente 20% para esta última.

Introducción

La crisis climática actual demanda la investigación e implementación de nuevas tecnologías que permitan una transición rápida y sostenible de la dependencia que tienen nuestras sociedades y nuestra economía en los derivados de petróleo y combustibles fósiles. La biomasa recalcitrante como celulosa, quitina y lignocelulosa son sustratos con un gran potencial debido a su alto contenido de azúcares fermentables que podrían aprovecharse por un proceso de fermentación en la obtención de bioetanol.

La biomasa recalcitrante presenta un gran reto al momento de ser aprovechada para la generación de biocombustibles debido a su gran estabilidad termodinámica proveniente de sus enlaces b-glicosídicos y su alta cristalinidad. Existen en la naturaleza hongos y bacterias que han logrado aprovechar estos sustratos a través de la producción de enzimas conocidas como monooxigenasas líticas de polisacáridos cuyo objetivo es la degradación oxidativa de sustratos como celulosa o quitina.

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos son metaloenzimas de cobre que en su ambiente de coordinación se encuentran rodeadas de dos residuos histidínicos, un residuo de alanina y un residuo de tirosina, nuestro grupo de investigación ha logrado sintetizar catalizadores de cobre bioinspirados en estas enzimas, su evaluación en reacciones de degradación oxidativa de biomasa recalcitrante es prometedora como se muestra a continuación en el presente trabajo.

Antecedentes

Enzimas y Catálisis

La Naturaleza es un laboratorio inmenso tanto si hablamos en términos de espacio como en términos de tiempo. Es un gran laboratorio que lleva realizando experimentos desde hace 4 mil millones de años, desde los rincones más nobles hasta los más inhóspitos del planeta, un laboratorio impulsado por la selección natural. De este gran laboratorio podemos dar vida a una nueva forma de hacer química y llevar a cabo reacciones que por el momento son imposibles de alcanzar por manos humanas.¹ Este tipo de química tiene una gran relevancia debido a los problemas que enfrentamos como humanidad y puede llegar a tener un gran impacto en la sociedad actual.

En términos termodinámicos una reacción ocurre espontáneamente si $\Delta G < 0$, el valor de la energía libre de Gibbs nos indica si la reacción es viable pero no nos dice nada sobre qué tan rápida o lenta es. Cuando obtenemos una respuesta a esta pregunta encontramos que existen reacciones que aunque la evidencia termodinámica indique que son viables, el tiempo que tomarían para completarse sería de muchos años debido a una alta barrera energética que debe ser rebasada para que se lleve a cabo. La forma más fácil de rebasar esta barrera es añadir un catalizador a la reacción que puede estar en cantidades $< 5\%$ mol o incluso en cantidades $< 1\%$ mol. Esta sustancia que se añade como catalizador sufre cambios durante el curso de la reacción y regresa a su forma inicial al final. La ruptura y formación de enlaces con ayuda del catalizador es lo que permite que el camino de reacción se vea modificado y que la barrera energética se vea disminuida.

Las enzimas son macromoléculas formadas por cadenas de polipéptidos, clasificadas como proteínas globulares debido a la forma esférica que toman en su estructura terciaria, dirigida principalmente por la interacción de las porciones hidrofóbicas hacia el centro de la molécula, mientras que las porciones hidrofílicas apuntan hacia la superficie de la molécula. Debido a la naturaleza polar que tienen las enzimas en su superficie esto les confiere un cierto nivel de solubilidad en agua.²

Las enzimas son estructuras dinámicas en las que se pueden encontrar cofactores de tipo orgánico como flavinas FMN y FAD, cofactores fuertemente unidos a las proteínas por medio de dominios de enlace de cofactores,³ así como también podemos encontrar cofactores de tipo inorgánico como Zn^{+2} , Fe^{+2} o Fe^{+3} , Cu^{+} o Cu^{+2} , K^{+} o Mg^{+2} , entre otros. A las enzimas que tienen sitios activos con cofactores en los que el catión metálico lleva a cabo alguna reacción importante se las conoce como metaloenzimas y representan entre un tercio y la mitad de todas las enzimas encontradas hasta la fecha con actividad catalítica.

Metaloenzimas

Un gran número de metales se encuentran formando parte de las diferentes estructuras de los organismos vivos, Na^+ , K^+ , son elementos extremadamente móviles que forman complejos solamente con ligantes que forman cavidades del tamaño perfecto del radio atómico de estos cationes, pero cuando el tamaño de esta cavidad no es el adecuado, la estabilidad de los complejos de estos dos metales disminuye drásticamente.

El Mg^{+2} es parte esencial del proceso de fotosíntesis en las moléculas de clorofila. El Zn^{+2} se encuentra en un sin número de enzimas formando parte ya sea en el sitio activo o como un ion que ayuda a mantener la estructura enzimática.⁴ El Ca^{+2} forma parte de estructuras biominerales en huesos y dientes de los vertebrados y como parte esencial de las corazas de muchos invertebrados, es también un señalador biológico en el proceso de coagulación sanguínea y esencial en el proceso de neurotransmisión; también ha sido descrito como uno de los metales que juegan un papel relevante durante el proceso de evolución de oxígeno en el fotosistema II.⁵

Los metales de transición son los elementos que mayor relevancia tienen dentro de los procesos biológicos, como es el caso del Fe que gracias a su facilidad para adoptar diversos estados de oxidación, que van desde el -1 hasta +4, puede llevar a cabo reacciones como la fijación de nitrógeno, el transporte de oxígeno y la degradación de otras enzimas para el reciclaje de sus componentes.⁶ Otros metales de transición como Ni ayudan en el proceso de degradación de urea,⁷ así como también en la síntesis de la Acetil Coenzima A⁸ y en procesos redox a través de la enzima superóxido dismutasa.⁹

Metaloenzimas de Cobre

El presente trabajo está enfocado en Cu, un metal de transición activo en reacciones redox, que adopta estados de oxidación +1 y +2, asumiendo configuraciones electrónicas d^{10} y d^9 respectivamente.¹⁰ Cu(I) puede adoptar geometrías lineales, trigonales planas y tetraédricas dependiendo del número de ligantes que se encuentren en la esfera de coordinación, siendo 2, 3 y 4 respectivamente. Cu(II) prefiere adoptar la geometría cuadrada plana con un número de 4 ligantes en la esfera de coordinación, con 5 ligantes puede adoptar la geometría trigonal bipyramidal o piramidal de base cuadrada, cuando tenemos 6 ligantes en la esfera de coordinación la geometría adoptada es un octaedro distorsionado axialmente debido a la distorsión de Jahn-Teller.^{11,12}

El Cu encuentra su ambiente de coordinación en los residuos de los aminoácidos que forman parte de las cadenas polipeptídicas de las enzimas a las que pertenecen, los aminoácidos más comunes a los que se coordina Cu(II) están representados en la Tabla 1, estos son histidina, cisteína y

metionina.¹³ El ion Cu(I) al tener un gran tamaño y una carga relativamente pequeña, tiene las características de un ácido de Lewis blando y tendrá interacciones más estables en su esfera de coordinación a ligandos blandos como átomos de azufre, que por su tamaño tienen un mejor traslape con los orbitales del Cu(I). Los iones Cu(II) se encuentran en el límite de ácidos blandos y por lo tanto tendrán una mejor afinidad por átomos de nitrógeno en sistemas aromáticos donde la densidad electrónica es dispersa, esto contrastado con la poca afinidad que tiene este metal por los grupos que contienen en las cadenas laterales como son los grupos hidroxilo, carboxilo en la tirosina o serina respectivamente, o los átomos de nitrógeno alifáticos primarios que se encuentran en la glutamina o arginina.

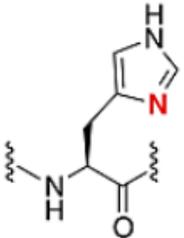
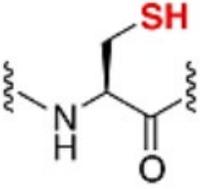
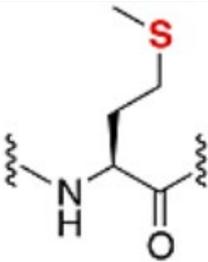
Aminoácido	Propiedades
 <p>Histidina</p>	<p>Preferencia por Cu⁺² Enlazante Fuerte Donador de Protones (pKa ≈ 6) Neutro o Aniónico Hidrofílico</p>
 <p>Cisteína</p>	<p>Preferencia por Cu⁺¹ Enlazante Fuerte Donador de Protones (pKa ≈ 8) Aniónico Hidrofílico Fácilmente Oxidado</p>
 <p>Metionina</p>	<p>Preferencia por Cu⁺¹ Enlazante Débil No Dona Protones Neutro Hidrofóbico</p>

Tabla 1. Aminoácidos representativos en ambientes de coordinación de Cu y sus propiedades.

Los centros activos en los que se encuentra coordinado Cu poseen un número de ligandos entre 4 y 5 con el fin de no perder el metal durante el ciclo redox,¹⁴ estas enzimas pueden tener en su sitio activo uno o múltiples átomos de Cu, lo cual tiene un efecto directo en el tipo de reactividad que la enzima desempeña.

Existen tres tipos de centros de Cu en los que se ha clasificado a las cuproproteínas de acuerdo a su ambiente de coordinación; sus propiedades espectroscópicas electrónicas han sido determinadas usando técnicas como espectrofotometría de UV-Visible y Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) y se encuentran resumidas en la Tabla 2.

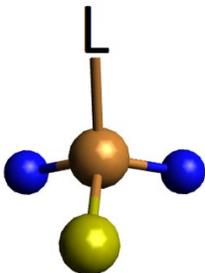
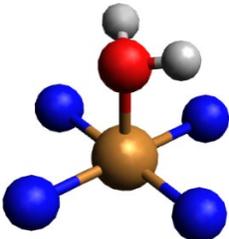
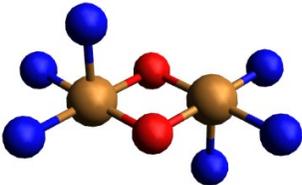
Tipo de Cu	Entorno del Cu	Propiedades Espectroscópicas
<p>Tipo I (Ej: Plastocianina)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Potenciales Redox: mayores de 0.25 V vs. SHE a pH 7. • UV-Vis: Absorción intensa en la región visible ($\lambda_{\text{máx}}$: 600 nm; $\epsilon > 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) • RPE: Desdoblamiento hiperfino pequeño en la región g_1
<p>Tipo II (Ej: Cu, Zn Superóxido Dismutasa SOD)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Potenciales Redox: cercanos a 0.4 V vs. SHE a pH 7. • UV-Vis: Prácticamente incoloros, débil espectro de absorción (sólo transiciones prohibidas ya que carecen de ligandos de azufre). • RPE: Activos, presentan parámetros normales para Cu^{+2}
<p>Tipo III (Ej: Hemocianina)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Potenciales Redox: cercanos a 0.54 V vs. SHE a pH 7. • UV-Vis: Absorciones intensas en UV cercano ($\lambda_{\text{máx}}$: 300 nm). • RPE: Silencioso por acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones Cu^{+2}, con $S = 1/2$.

Tabla 2. Clasificación de Tipos de Cu en Metaloproteínas (Clave de Colores Cu: café, S: amarillo, N: azul, O: rojo, H: blanco).

Monooxigenasas Líticas de Polisacáridos

Las enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO por sus siglas en inglés), son enzimas que promueven la ruptura de enlaces b-glicosídicos, a través de la abstracción de un átomo de hidrógeno en la posición C1 o C4 de los polisacáridos que conforman la cadena polimérica. Fueron descubiertas por primera vez a principios de 1990, como parte de estudios de bibliotecas de ADN complementario durante la búsqueda de enzimas secretadas extracelularmente involucradas en la degradación de celulosa.^{15,16} Fueron identificadas en primera instancia por su actividad hidrolítica en celulosa recibiendo la clave GH61 (Glucose Hydrolase 61).

La primera pista de que estas enzimas no son hidrolasas vino de la estructura cristalina,¹⁷ esto reveló una superficie plana altamente conservada que contrasta con los sitios activos tipo túnel o hendiduras encontrados en las celulasas. También reveló que no hay residuos carboxilato que catalicen la ruptura hidrolítica, en su lugar en la superficie plana se encuentra un sitio activo enlazado a metal que contenía un ion de níquel derivado de la solución buffer de cristalización. Se concluyó a través de estos análisis que la estructura tiene un ligero parecido con una proteína enlazante de quitina conocida como CBP21, proveniente de la bacteria *Serratia marcescens*.

Posterior a estos descubrimientos en el 2010 Vaaje-Kolstad et al.¹⁸ reportaron que la proteína bacteriana CBP21 posee actividad quitinolítica cuando está en presencia de oxígeno molecular y un reductor químico, este mismo grupo reportó la incorporación de un sólo átomo de oxígeno en el producto de oxidación, además propusieron que la identidad del ion metálico era Mg^{+2} y Zn^{+2} , dos metales incapaces de formar una especie de oxígeno reactiva. No fue hasta un año después en el 2011 que el grupo de Quinlan et al.¹⁹ logró obtener la primera estructura cristalina de una proteína con el ion Cobre en el sitio activo perteneciente a *Thermoascus aurantiacus* (TaGH61A). A su vez el mismo año Phillips et al.²⁰ en la proteína GH61 de *Neurospora crassa* reportaron que la reacción se lleva a cabo sólo y únicamente cuando un ion de Cu se encuentra unido en el sitio activo. Estas enzimas se pueden encontrar tanto en bacterias como en hongos teniendo diferencias estructurales claves que afectan su eficiencia y las diferencian una de otras.

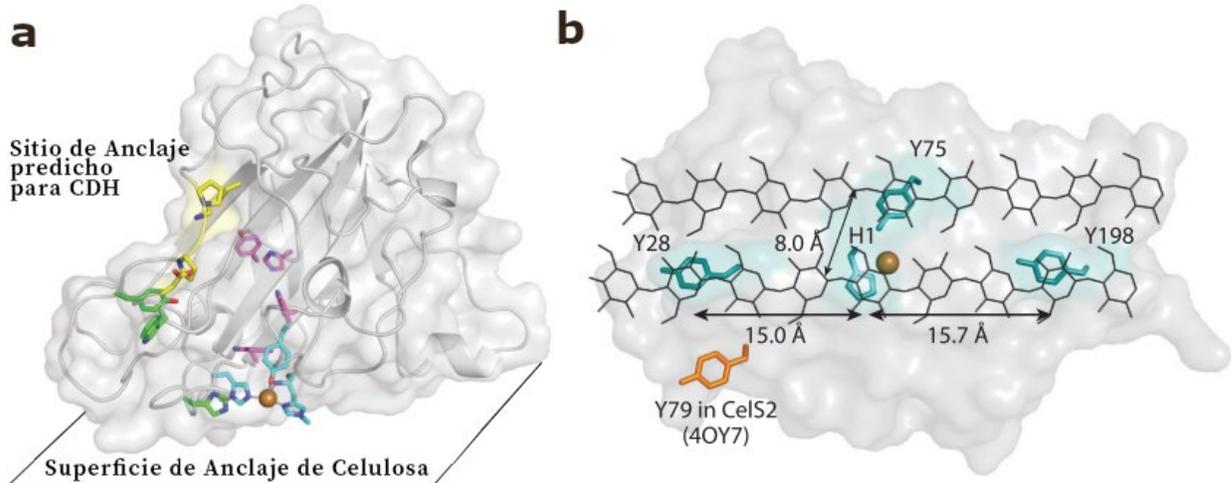


Figura 1. a) Estructura de LPMO de *Neurospora crassa* con el sitio de anclaje de CDH (amarillo) y la superficie de anclaje de celulosa. b) Representación de la LPMO GH61D de *Phanerochaete chrisosporium* con los residuos aromáticos mostrados en azul junto con el sitio activo y dos cadenas del oligómero de celulosa cristalina en negro.²¹

Estructura

El empaquetamiento general de las LPMO ha sido descrito como inmunoglobulina o fibronectina tipo III y consiste en una estructura “sandwich” tipo b que comprende entre 8 a 10 hebras. Series de pequeños bucles entre hebras forman una punta cónica en el final opuesto al sitio activo, los bucles más grandes frecuentemente contienen hélices pequeñas y forman el plano del sitio activo. Dichos bucles grandes juegan un papel importante en el reconocimiento del sustrato. Una de las diferencias claves entre las enzimas de origen fúngico y las de origen bacteriano es la presencia del sitio de anclaje de CDH el cual solo está presente en las de origen fúngico.^{22,23}

La esfera de coordinación del Cu observada en las LPMO (ver Figura 2) incluyen claramente tres ligantes nitrogenados, de los que forman parte dos residuos histidínicos y una amina N-terminal, a este arreglo se lo conoce con el término de “abrazadera de histidina”.¹⁹ Estos tres ligantes forman un plano de coordinación en forma de “T” rotada $\approx 30^\circ$ al plano de la superficie de anclaje de celulosa.²²

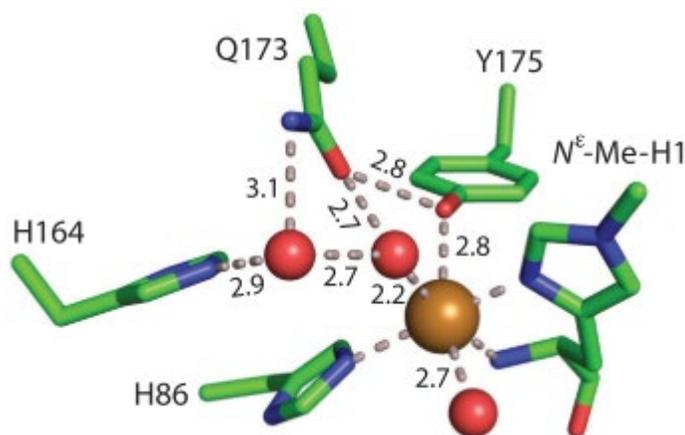


Figura 2. Ambiente de Coordinación de Cu(II) en *TaGH61A* LPMO.²¹

Las LPMO de origen fúngico contienen un residuo de tirosina en una posición axial, contribuyendo con un ligante de oxígeno que se encuentra a una distancia más grande que la esperada (mayor a 2.7 Å), debido a la distorsión de Jahn-Teller propia de una configuración electrónica d^9 del Cu(II).²⁴ Este sitio activo con tirosina puede ser el motivo por el cual esta familia de enzimas ha mostrado mayor afinidad por los sustratos,²⁵ en contraste a las enzimas LPMO bacterianas en donde la posición axial está ocupada por un residuo de fenilalanina.²⁶

Se conoce de antemano que cuando el fenol se encuentra como ligante en la esfera de coordinación de un metal de transición, como Fe o Cu, funciona como ligante no inocente debido a sus propiedades redox, siendo el par fenoxilo/fenolato fuente de un electrón. A su vez también es un gran difusor del espín electrónico,²⁷ muchas enzimas usan este par redox como auxiliar en reacciones de oxidación, por ejemplo en el caso de la galactosa oxidasa, el citocromo P450²⁸ y la catecol oxidasa.²⁹ Las enzimas son maquinarias moleculares muy complejas y dinámicas, muchas veces para la optimización de los cálculos teóricos de las reacciones deben ser tomados en cuenta los cambios conformacionales durante la interacción con el sustrato,³⁰ también se debe tomar en cuenta las interacciones que pueden existir en la esfera externa de coordinación.³¹

El experimento realizado por Van V. Vu et al.³² se apoya en cálculos de DFT para diferentes mutaciones en la esfera externa de coordinación del centro metálico para la enzima LPMO perteneciente a *Myceliophthora thermophila*; las mutaciones van desde el reemplazo del residuo de glutamina por alanina (Q167A), lo que hace que se pierdan los enlaces de hidrógeno tanto al residuo de tirosina (Y169) como a la molécula de agua ecuatorial, esto conlleva a una elongación del enlace Cu-O_{Tyr} (2.64 - 3.69 Å) lo que indica un debilitamiento del enlace. También se reemplaza el residuo Q167 por glutamato (Q167E), en donde se observa que la distancia del enlace Cu-O_{Tyr} decrece hasta una distancia de 2.42 Å. Esto indica un incremento en la fuerza de este enlace, en ambos casos se han realizado experimentos de actividad y ambas mutaciones, tanto Q167A como Q167E, exhiben una caída de varios órdenes de actividad en relación a la enzima original.³¹ Es

evidente que hay un balance fino que debe existir en el ambiente de coordinación del sitio activo, incluso en la segunda esfera de coordinación para tener una reactividad eficiente.

Otra de las diferencias que llaman mucho la atención con respecto a las LPMO bacterianas, consiste en que las histidinas *N*-terminales nunca han sido observadas metiladas,³³ esto contrasta con las enzimas LPMO fúngicas ya que en ellas se observan siempre histidinas metiladas en el nitrógeno 1. El estudio realizado con la enzima perteneciente a la familia AA9, producida por la bacteria *Thermoascus aurantiacus*, consiste en llevar a cabo la producción de la enzima antes mencionada en una bacteria (*Pichia pastoris*) que no tiene la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo las modificaciones post-traduccionales como la metilación *N*-terminal de la histidina, y en un hongo (*A. oryzae*) conocido por tener la maquinaria enzimática necesaria para poder llevar a cabo la metilación *N*-terminal de la histidina.³⁵ Esta diferencia es un error de expresión en el organismo hospedador bacteriano como son *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, que no cuentan con la enzima metiltransferasa requerida para esta modificación.³³ Se ha demostrado experimentalmente que esta modificación ayuda a la protección de la autoinactivación, que puede sufrir el sitio activo de la enzima, al no poder ser reducido a su forma activa Cu(I) durante la interacción con H₂O₂, dentro del ciclo catalítico de degradación de celulosa.

Unión de Sustrato y Regioselectividad de Oxidación

La cara plana de las enzimas LPMO funciona como sitio de anclaje al sustrato, las interacciones p entre los anillos aromáticos y los carbohidratos son las que predominan durante el anclaje a la celulosa.²¹ En las enzimas LPMO de hongos activas para celulosa conservan los residuos aromáticos (tirosinas) a lo largo de toda la cara plana.³⁶



Figura 3. Posiciones de oxidación por parte de LPMO en una cadena de polisacárido. La oxidación en C1 resulta en la formación de una lactona que al hidrolizarse genera el extremo reductor como ácido aldónico y la oxidación en C4 conduce a la formación de una cetoaldosa en el extremo no reductor.³⁷

La distancia que existe entre las subunidades de piranosa, que componen la celulosa, son de 5.2 Å y la distancia entre los residuos de tirosina es de aproximadamente el doble: entre 10.5 a 10.6 Å, estos datos sugieren que los residuos de tirosina podrían unirse a todas las demás unidades de

glucosa en un tramo corto del polímero de celulosa. En varias LPMO las distancias entre los residuos aromáticos tienden a ser el doble o triple que las unidades de glucosa individuales en la misma cadena (10 - 15 Å). Alternativamente, el espacio entre los residuos aromáticos en algunas LPMO coincide aproximadamente con la distancia entre las cadenas de celulosa cristalina (8.2 Å) esto sugiere una orientación perpendicular a través de dos o más polímeros.²² En cuanto a la regioselectividad de las LPMO se pueden clasificar en 3 tipos de enzimas como se indica en la Figura 3: las tipo 1 que oxidan exclusivamente la posición C1, las tipo 2 que oxidan exclusivamente la posición C4 y las tipo 3 que pueden oxidar ambas posiciones.²⁵

Mecanismo de Reacción y Activación de Enlaces C-H

El mecanismo de reacción propuesto por Beckham et al.³⁸ describe como las LPMO rompen los enlaces b-glicosídicos, el mecanismo involucra especies de Cu en alto estado de oxidación (Cu^{+3}) y la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de activar la ruptura de los enlaces C-H altamente energéticos en polisacáridos, se puede describir brevemente este mecanismo como una abstracción de hidrógeno (activación del enlace C-H) y reanclaje del grupo hidroxilo.

Dentro de este mecanismo se conoce que se genera la especie Cu-OOH (hidroperóxido), se ha demostrado que esta especie tiene el potencial para activar enlaces C-H³⁹ pero es mucho más plausible que esta lleve a la formación de especies más reactivas y que tienen un mayor potencial de oxidación como lo es la especie Cu(II)-O· (oxilo).

Las especies más importantes en este mecanismo y las responsables de la oxidación de las cadenas de polisacáridos son principalmente^{38,40-44} conocidas como Cu(II)-O· así como también la especie Cu(III)-O· la cual es estabilizada por un residuo de tirosina ubicado en una de las posiciones axiales del ambiente de coordinación, esta especie es responsable de la abstracción de hidrógeno en el mecanismo de reacción, la especie Cu(III)-OH (hidroxilo) es responsable del paso de reanclaje de hidroxilo^{40,42,44,45} dentro del mecanismo de reacción, esta especie también se encuentra estabilizada por el residuo de tirosina en la posición axial dentro de la esfera de coordinación.

Existe evidencia⁴⁶ clara de que el reactivo oxidante puede ser H_2O_2 en lugar de O_2 , esto pone en duda el paradigma de que la activación de los enlaces C-H solo se puede llevar a cabo en la presencia de O_2 , siendo necesario para esta reacción 2 electrones y 2 protones ($\text{R-H} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O}$). La facilidad que representa el uso de H_2O_2 para esta reacción se ve reflejada al usar solo 1 electrón y 1 protón que pueden proveerse fácilmente del fenol coordinado en la posición axial al centro metálico ($\text{R-H} + \text{H}_2\text{O}_2 + 1\text{e}^- + 1\text{H}^+ \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O}$). A pesar de ello, también se ha demostrado que el uso de H_2O_2 puede llegar a inactivar la propia enzima, debido a daños estructurales dentro de la misma por acción oxidativa del H_2O_2 .

El residuo de tirosina que se encuentra coordinado de manera axial al Cu es una de las características que más llaman la atención de estas enzimas, es también motivo de preguntas sobre el rol que este desempeña en la reactividad de las LPMO. Se han realizado estudios espectroscópicos y cinéticos en los que se ha logrado detectar la especie Cu(II)-Tirosilo.⁴⁷⁻⁴⁹ A través de estudios de DFT realizados por el grupo de Hedegård et al.⁵⁰ con la especie cis-[TirO·Cu(III)OH]⁺ y un sustrato polisacárido, se ha logrado demostrar que esta especie no es capaz de funcionalizar la posición C4 debido a una pendiente termodinámica muy grande (50-60 kJ mol⁻¹). La evidencia tanto experimental como teórica indica que el rol que tiene el residuo de tirosina es el de proteger el centro metálico de su auto-inactivación, debido a daño oxidativo en presencia de H₂O₂ a través de un mecanismo de “salto de hueco”.⁵¹⁻⁵³

Biomasa y Biocombustibles

La cantidad de biomasa generada por los organismos vivos en nuestro planeta se estima en alrededor de 10¹¹ toneladas por año, divididas en 60% biomasa terrestre y 40% biomasa acuática, pero tan solo el 3% de todo esto es cultivado, cosechado y usado en la industria alimenticia y no alimenticia.⁵⁴ La biomasa está compuesta por 75% hidratos de carbono, 20% lignina, y el 5% restante triglicéridos (grasas y aceites), proteínas y terpenos.⁵⁵ El grupo de hidratos de carbono puede ser dividido en carbohidratos de almacenamiento como el almidón, la inulina o la sacarosa, así como también en polisacáridos estructurales como la quitina, la celulosa y la hemicelulosa. De todos los tipos de biomasa antes mencionados, la lignocelulosa es la más difícil de aprovechar y su procesamiento por medios naturales o sintéticos sigue siendo todavía un reto muy grande a nivel industrial. Este material es considerado un desecho por no ser comestible y por lo tanto no compete con las fuentes de alimentos, como lo hacen el uso de azúcares, almidones y aceites vegetales,⁵⁶ convirtiéndolo en un gran candidato para la producción de biocombustibles y productos químicos de alta demanda en el mercado actual.

El departamento de energía de los Estados Unidos estima que cerca de 1.3 mil millones de toneladas de biomasa vegetal podrían ser procesadas de manera sostenible para producción de biocombustible, lo suficiente para cubrir cerca del 30% de los combustibles usados por EE.UU. para transporte.^{57,58} Se han realizado diferentes esfuerzos a nivel de laboratorio e industria⁵⁹ para escalar el proceso de degradación de materia celulósica, usando en un primer paso del proceso un coctel de enzimas con una cantidad de 20% de materia seca en el reactor, necesaria para que el proceso pueda ser rentable. Posteriormente a la degradación de esta mezcla, es necesario añadir levaduras modificadas genéticamente que llevan a cabo el proceso de fermentación de los azúcares para la generación de bioetanol, el cual se concentra por destilación para su venta al público.

Dentro de los sistemas con moléculas modelo simple, uno de los ejemplos de degradación de biomasa más llamativos es el reportado por el grupo de Hanson et al.⁶⁰ en donde la molécula 1,2-difenil-2-metoxietanol y una mezcla de CuCl, TEMPO y piridina, es capaz de escindir el enlace C-C, dando como productos benzaldehído y metilbenzoato como se muestra en la Figura 4. Otro

ejemplo de depolimerización de lignina reportado por el grupo de Saito et al.⁶¹ con complejos de Cu y ligantes nitrogenados, realiza la comparación de la cantidad de degradación en dimetilformamida (DMF) y el líquido iónico 1-etil-3-metilimidazolio xileno sulfonato ([emim][ABS]); observaron un alto grado de depolimerización bajo las condiciones: 180°C durante 12 horas con flujo de oxígeno en [emim][ABS].

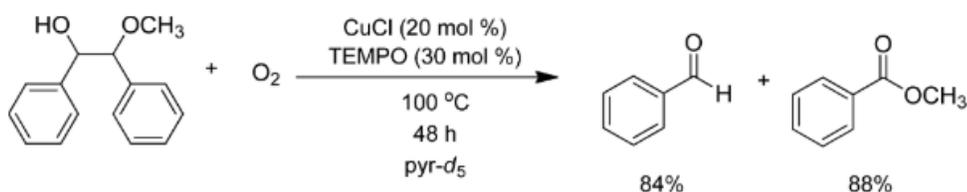


Figura 4. Sistema reportado por Hanson et al.⁶⁰ donde se observa la escisión del enlace C-C en 1,2-difenil-2-metoxietanol usando el sistema de Cu(I) y oxígeno molecular.

En el 2009 el grupo de Nelson et al.⁶² presentó tres complejos binucleares de Cu, como se muestra en la Figura 5, los cuales son capaces de hidrolizar los enlaces α -glicosídicos en *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido. Este estudio difiere con las intenciones del presente trabajo debido a que hidroliza enlaces α -glicosídicos en contraste con los enlaces β -glicosídicos más resistentes, en los que nuestro grupo de investigación trabaja. La relevancia de este estudio para nuestra investigación se debe a que confirma que los complejos de Cu con ligantes nitrogenados pueden llevar a cabo reacciones de hidrólisis de enlaces glicosídicos.

Existen escasos ejemplos en la literatura en los que se mencionen sistemas de sales o complejos de Cu con celulosa, quitina o lignocelulosa, la mayoría de los cuales se centran en catalizadores heterogéneos,⁶³ sin grandes resultados. En cuestión de catálisis homogénea, muchas veces los experimentos se realizan con moléculas modelo simples,^{64,65} que aunque puedan tener resultados positivos al extenderlos a sistemas más complejos, se pueden manifestar problemas de selectividad o eficiencia.

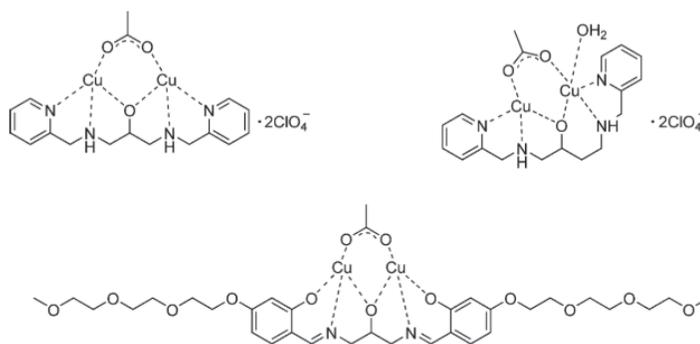


Figura 5. Complejos binucleares reportados por Nelson et al.⁶² capaces de llevar a cabo la hidrólisis de enlaces α -glicosídicos.

Complejos Biomiméticos de LPMO

Durante el transcurso de la última década se han reportado algunos complejos de Cu inspirados en el sitio activo de las LPMO (ver Figura 6). El primer complejo de este tipo fue reportado por nuestro grupo de investigación;⁶⁶ en esta primera etapa, el estudio estructural resultó en el complejo más fiel al sitio activo de las LPMO, ya que contiene los anillos heterocíclicos de los bencimidazoles y la metilación *N*-terminal en el anillo heteroaromático. Posee también dos unidades en el espaciador, que conecta los anillos bencimidazólicos con la amina alquímica que los une.

Los resultados sobre la capacidad de este complejo para degradar enlaces b-glicosídicos, en un sustrato modelo como celobiosa y las especies involucradas en el mecanismo de reacción, fueron publicados en un artículo independiente.⁶⁷ Este complejo posee un potencial del par redox Cu(I)/Cu(II) de 226 mV contra el electrodo estándar de hidrógeno (EEH) en un pH de entre 5.0 a 7.0. A través de experimentos de RPE se puede determinar que el complejo de $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ es monometálico en disolución, el átomo de Cu se encuentra en un ambiente de coordinación trigonal bipyramidal (TBP) con valores de g ($g_{\perp} = 2.021$ y $g_{\parallel} = 2.157$) propios de un estado basal dz^2 . Los valores de g reportados para LPMOs AA10 y AA11 ($g_{\perp} = 2.03$, $g_{\parallel} = 2.27$)^{34,68} corresponden a un estado basal dx^2-dy^2 , y presentan un ambiente de coordinación axial distorsionado, debido a la coordinación de moléculas de agua al centro metálico o la unión de un residuo de tirosina en una posición axial.

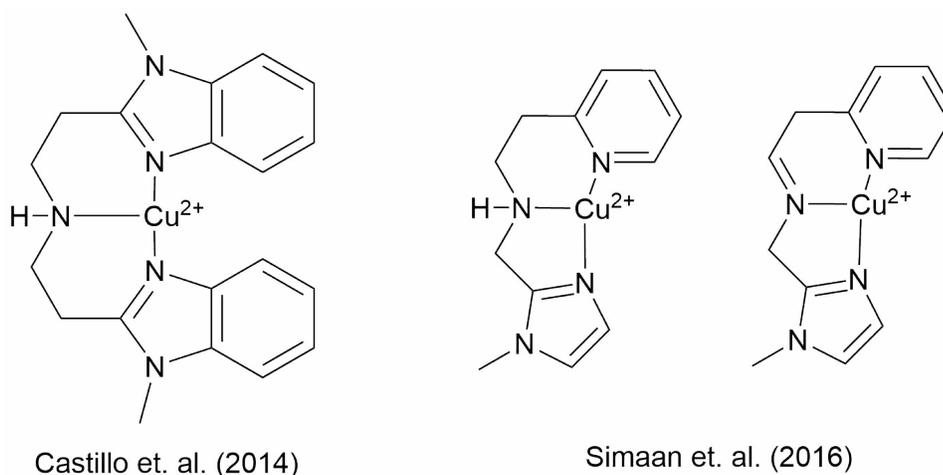


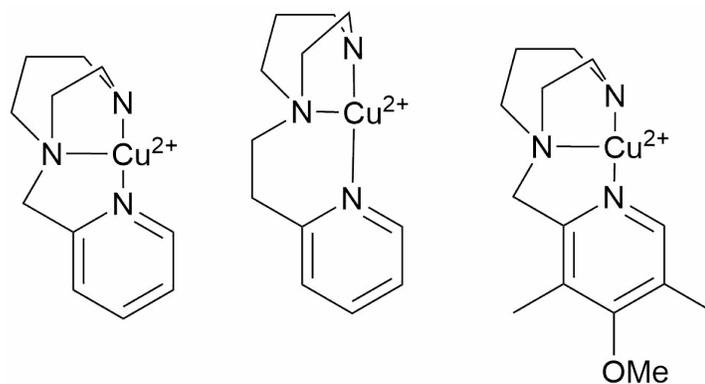
Figura 6. Complejos de Cu mononucleares biomiméticos o bioinspirados reportados por Castillo et al.⁶⁶ y Simaan et al.⁶⁹

Se realizaron algunos estudios de reactividad con O_2 y H_2O_2/NEt_3 para identificar los posibles intermediarios responsables de la reactividad de este complejo con celobiosa. Sin duda, una de las mayores contribuciones de este trabajo es la propuesta de una ruta por la cual se explica cómo

diferentes especies monoméricas y diméricas de Cu reaccionan entre ellas, con el disolvente o con el sustrato para formar la especie $[2BBCu(OH)(S)]^+$ o también conocida como Cu(II)-hidroxo. Esta especie fue caracterizada tanto por RPE ($g_{\perp} = 2.082$, $g_{\parallel} = 2.250$, $A_{\parallel} = 423$ MHz), como por espectroscopía UV/Vis ($\lambda_{Abs} = 300$ nm).

Unos años después a la primera publicación de este tipo de complejos, Simaan et. al.⁶⁹ reportaron un par de complejos de Cu inspirados en LPMO con ligantes cuya aproximación a la abrazadera de histidina consiste en que uno de los brazos de la pinza es un anillo imidazol *N*-metilado, y en el otro brazo un anillo piridínico, también describe la presencia o ausencia del grupo imina en la amina alquílica que une los dos brazos (ver Figura 6). Este complejo reportó actividad oxidativa frente a *p*-nitrofenil-b-D-glucopiranosido, ambos complejos reportaron un potencial del par redox Cu(I)/Cu(II) de 5 a 50 mV contra EEH en un pH de 6.0. Los valores *g* de los dos complejos reportados en este trabajo ($g_{\perp} = 2.059$, $g_{\parallel} = 2.260$, $A_{\parallel} = 530$ MHz; $g_{\perp} = 2.060$, $g_{\parallel} = 2.265$, $A_{\parallel} = 530$ MHz) se asemejan mucho a los de una geometría axial distorsionada como las de LPMO. En este trabajo se explora la reactividad de los dos complejos con H₂O₂ en agua, se detecta una especie reactiva hidróperóxido [Cu(II)-OOH], la cual presenta bandas de absorción en 265 y 305 nm así como también valores *g* ($g_{\perp} = 2.066$, $g_{\parallel} = 2.249$, $A_{\parallel} = 510$ MHz) propios de un estado basal dx^2-y^2 . La especie Cu-OOH no es un oxidante muy fuerte, pero se ha reportado que si posee una actividad oxidativa,³⁹ o que puede llevar a especies de Cu-oxo de alta valencia⁷⁰ los cuales pueden ser responsables de la reactividad observada.

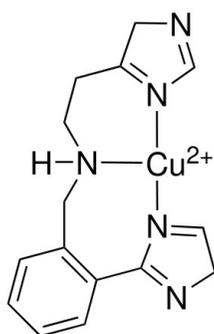
Tres complejos más fueron reportados en el 2019 por el grupo de Mayilmurugan et al,⁷¹ donde dos de los átomos de nitrógeno pertenecen a un anillo 1,4-diazepán, mientras que el tercer átomo de nitrógeno mantiene la capacidad de aceptor π , al pertenecer a una piridina (ver la Figura 7). Las diferencias entre los tres complejos consisten en la adición de una unidad más en el espaciador que conecta hacia el anillo piridínico, así como la adición de un grupo metóxido en posición *para* al átomo de nitrógeno donador en el anillo piridínico. Este complejo también reportó actividad oxidativa frente a *p*-nitrofenil-b-D-glucopiranosido y el potencial del par redox Cu(I)/Cu(II) se encuentra entre 8-112 mV contra EEH en agua. Los valores de *g* ($g_{\perp} = 2.02-2.08$, $g_{\parallel} = 2.25-2.37$ y $A_{\parallel} = 467-527$ MHz) para los tres complejos muestran una geometría de pirámide cuadrada y un estado basal dx^2-y^2 . También se detectó espectroscópicamente la formación de la especie Cu(II)-OOH, pero es muy probable que esta especie no sea la que lleve a cabo la activación del enlace C-H.



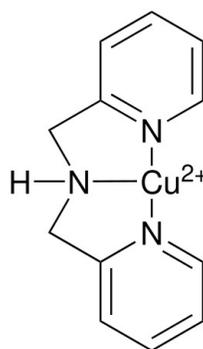
Mayilmurugan et. al. (2019)

Figura 7. Complejos de Cu mononucleares biomiméticos o bioinspirados reportados por Mayilmurugan et al.⁷¹

El grupo de Itoh et al.⁷² ha reportado un complejo mononuclear de Cu con dos histidinas rodeando al átomo de Cu, uno de los brazos que conecta las histidinas con la amina alquílica es un anillo bencénico (Ver Figura 8). Este complejo también reportó actividad oxidativa frente a *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido y un tipo de actividad muy llamativa, que biomimetiza a la enzima Metano Monooxigenasa Particulada (pMMO) activando enlaces C-H de alcanos, llevando a cabo la transformación de ciclohexano a ciclohexanol. El potencial del par redox Cu(I)/Cu(II) se encuentra entre 323 mV contra EEH en agua, el complejo muestra una geometría de pirámide cuadrada determinado por cristalografía de rayos X.



Itoh et. al. (2020)



Cowan et. al. (2020)

Figura 8. Complejos de Cu mononucleares biomiméticos o bioinspirados reportados por Itoh et al.⁷² y Cowan et al.⁷³

Finalmente, el grupo de Cowan et al.⁷³ reportó cuatro complejos de Cu con actividad para degradar polisacáridos, los ligandos usados les permiten obtener complejos mono, bi y tetrametálicos. Para fines prácticos de este trabajo y en vista de que no existe evidencia alguna de que el sitio activo de las LPMO's sea un sitio polimetálico, solo mencionaremos el complejo monometálico de este trabajo (Ver Figura 8). Este posee dos anillos piridínicos los cuales están conectados a una amina

alquílica a través de un espaciador con un solo grupo metileno (ver Figura 8). El complejo mononuclear presenta actividad para degradar enlaces b-glicosídicos como los que se encuentran en la celulosa, uno de los sustratos modelo utilizados en este estudio fue *p*-nitrofenil-b-D-glucopiranosido. El complejo presenta un potencial del par redox Cu(I)/Cu(II) de 230 mV contra EEH⁷⁴ a pH 4.0, no se reportaron estudios de RPE.

Planteamiento del Problema

El planeta entero está atravesando por una crisis climática. El mal llamado calentamiento global provocado por la alta emisión de gases de invernadero⁷⁵ como CO₂ y CH₄ debido a la dependencia de la sociedad actual en fuentes no renovables como son los combustibles fósiles para la generación de energía. Muchos grupos de investigación han volcado todos sus esfuerzos en la búsqueda de fuentes renovables para la producción de energía⁵⁴ y disminuir nuestra dependencia como sociedad en fuentes no renovables como el petróleo y el carbón.

Uno de los principales candidatos para esta transición hacia fuentes renovables es la producción de biocombustibles como etanol usando azúcares fermentables o biodiesel a través de ácidos grasos provenientes de plantas.⁷⁶ El mayor problema que tienen este tipo de biocombustibles llamados de primera generación es que su producción depende principalmente de biomasa alimenticia como maíz, soya y caña de azúcar. Esto pone en riesgo la seguridad alimentaria de muchas naciones y es la principal razón por la que no se ha popularizado a nivel mundial a pesar de que llevan ya algunos años en el mercado.

Existe también un tipo de biocombustibles llamados de segunda generación cuya dependencia de biomasa alimenticia es nula.⁷⁷ En su lugar se usa biomasa recalcitrante como lignina, quitina o celulosa, los cuales son polímeros de carbohidratos estructurales (azúcares fermentables) y que por su naturaleza recalcitrante no compiten directamente con fuentes de alimentos, esto se ilustra de mejor manera en la Figura 9.

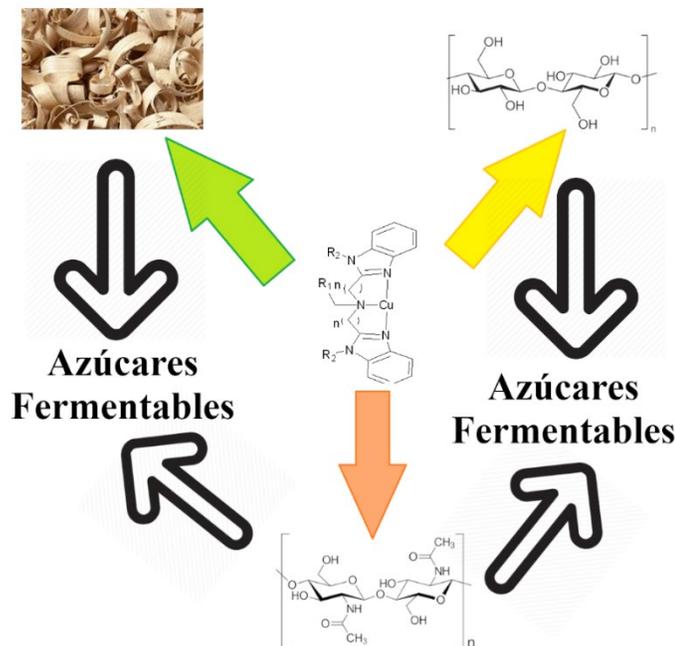


Figura 9. Complejos de Cu bioinspirados en LPMO utilizados para degradar biomasa recalcitrante.

Durante los últimos cinco años se han incrementado el número de complejos de Cu bioinspirados en las enzimas LPMO que han sido reportados en la literatura.^{66,67,69,71,72,73} Estos complejos han

demostrado actividad para activar enlaces C-H en moléculas modelo como *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. Nuestro grupo de investigación ha reportado el complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(2\text{BB})](\text{OTf})_2$ representado en la Figura 2; dicho complejo ha demostrado que puede activar los enlaces C-H de celobiosa siendo este dímero de glucosa el que más se acerca al sustrato real que es la celulosa. La evidencia previa sugiere que se pueden realizar pruebas con este complejo y sustratos reales para evaluar la capacidad de degradación de la biomasa recalcitrante como quitina, celulosa y lignina⁶⁷.

El desarrollo de nuevas metodologías para poder aprovechar de una manera más eficiente la biomasa recalcitrante y poder obtener azúcares fermentables que posteriormente se pueden convertir en biocombustibles es la principal motivación de este proyecto de investigación.

Hipótesis

La evaluación de la capacidad de degradación oxidativa de complejos de cobre que presenten un ambiente estructural, electrónico y funcional análogo al de las monooxigenasas líticas de polisacárido, a partir del ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina (2BB), permitirá obtener una ponderación sobre su potencial para degradar biomasa recalcitrante para la obtención de azúcares fermentables.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la capacidad de degradación oxidativa que tiene el complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(2\text{BB})](\text{OTf})_2$ con sustratos de biomasa recalcitrante como celulosa, lignina y quitina.

Objetivos Particulares

- Sintetizar y caracterizar los complejos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(2\text{BB})](\text{OTf})_2$ y $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(1\text{F}2\text{BB})](\text{ClO}_4)_2$.
- Evaluar la capacidad de degradación oxidativa que tienen los complejos de Cu bioinspirados en los sitios activos de LPMO con O_2 y H_2O_2 como agentes oxidantes.
- Encontrar las condiciones adecuadas para optimizar la degradación de biomasa recalcitrante con los complejos de Cu bioinspirados en los sitios activos de LPMO.

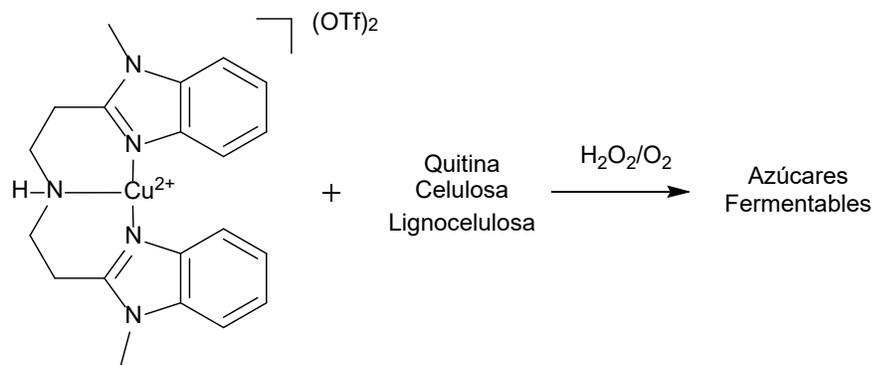


Figura 10. Reacción de los complejos de Cu bioinspirados en LPMO con el sustrato de biomasa recalcitrante y el agente oxidante respectivo.

Metodología

General

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico obtenidos de proveedores comerciales y se utilizaron sin tratamiento previo. El ligante *N,N*-bis[2-(1-metilbenzimidazol-2-il)-etil]amina (2BB) fue sintetizado según lo reportado en la literatura,⁷⁸ y el complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(2\text{BB})](\text{OTf})_2$ (Cu2BB) fue sintetizado con el procedimiento previamente reportado por el grupo de investigación.⁶⁶ Los disolventes se obtuvieron de proveedores comerciales y en los casos necesarios se destilaron por métodos convencionales.⁷⁹ Para los análisis de RMN se empleó como disolvente CDCl_3 99.8 %, obtenido de Sigma-Aldrich.

Equipos

Los puntos de fusión se tomaron un aparato Electrothermal Mel-Temp y no se corrigieron. Los espectros de RMN se obtuvieron a 300 MHz con un equipo Bruker Advance 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 ATR marca Perkin Elmer modelo Spectrum 3 en un rango de 4000 y 650 cm^{-1} . 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 experimentos de degradación de biomasa fueron analizados por HPLC-MS en un cromatógrafo Agilent 7890B usando el método de ionización de electrospray.

Degradación de Biomasa Recalcitrante a Escala Preparativa

Las pruebas de degradación con las condiciones enlistadas en la Tabla 1 y el complejo Cu2BB se dejó reaccionar durante períodos de 24 y 72 horas a temperatura ambiente en un volumen de 2.0 mL de agua destilada o la disolución con la cantidad de oxidante correspondiente. Para el caso en el que se usó como agente oxidante el oxígeno atmosférico se colocó una masa de 30 mg para quitina y celulosa, y 40 mg para lignocelulosa; cuando se usó H_2O_2 la masa de quitina añadida fue de 41 mg con el fin de mantener la relación catalizador/oxidante constante, celulosa 30 mg y lignocelulosa 40 mg. Se empleó una carga de 5 mol % de catalizador para cada uno de los sustratos, asumiendo un contenido de 75% de celulosa para lignocelulosa.

Posteriormente al tiempo de reacción se filtró la mezcla y se lavó el sustrato que quedó en el papel filtro con 2 mL de agua destilada, 2 mL de metanol y 2 mL de acetona. La fase acuosa se analizó por HPLC-MS cuando fue posible, mientras que el sólido fue transferido a un vial previamente pesado y se dejó en un desecador durante 72 horas previo al registro de su masa. Las disoluciones blanco se dejaron en agitación durante 24 horas antes de medirse.

Catalizador	Oxidante	Cantidad de Oxidante	Tiempo
Cu2BB	O ₂	Atmosférico	24/72 h
Cu2BB	H ₂ O ₂	10 Eq, 3% m/v, 15% m/v	24/72 h*
CuSO ₄	O ₂	Atmosférico	24 h
CuSO ₄	H ₂ O ₂	10 Eq, 3% m/v, 15% m/v	24 h
NA	O ₂	Atmosférico	24 h
NA	H ₂ O ₂	10 Eq, 3% m/v, 15% m/v	24 h

*Se evaluó la capacidad de degradación a 72 h sólo con las condiciones a 15% m/v H₂O₂.

Tabla 1. Condiciones de reacción utilizadas para los diferentes sustratos de biomasa recalcitrante a temperatura ambiente.

De igual manera se realizaron pruebas blanco con CuSO₄ como fuente de cobre y también pruebas con el sustrato más el agente oxidante sin ninguna fuente de cobre en la disolución. A continuación, se muestran las pruebas que se realizaron en total.

- Biomasa + O₂ + Catalizador
- Biomasa + 10 Eq H₂O₂ + Catalizador
- Biomasa + 3% m/m H₂O₂ + Catalizador
- Biomasa + 15% m/m H₂O₂ + Catalizador
- Biomasa + CuSO₄ + O₂
- Biomasa + CuSO₄ + 15% m/m H₂O₂
- Biomasa + O₂
- Biomasa + 10 Eq H₂O₂
- Biomasa + 3% m/v H₂O₂
- Biomasa + 15% m/v H₂O₂

Las pruebas se dejaron en agitación durante 24 h, después de este período se pesó la cantidad de biomasa 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. Previo al análisis por HPLC-MS para la identificación de los productos se filtró la muestra por una membrana de nylon 0.22 mm.

Pruebas de Captura de Radicales

En un vial en el que previamente se encuentra pesada una cantidad de sustrato: 4.4 mg Quitina, 3.3 mg Celulosa, 4.4 mg Lignocelulosa.

Se añadió 1.0 mL de una disolución 1 mM de Cu2BB o CuSO₄, se transfirió 0.5 mL de esta mezcla a un tubo eppendorf donde se añadió sucesivamente 1.3 µL de DMPO y 2.1 µL de H₂O₂ 30% m/v, la mezcla fue homogenizada posterior a la adición de cada reactivo. Esta mezcla se colocó en una celda de cuarzo apta para la medición en el equipo de RPE a temperatura ambiente.

Síntesis y Caracterización

La síntesis y caracterización de los ligantes 2BB y 1F2BB, y los complejos Cu2BB y Cu1F2BB ha sido reportado previamente.^{66,78} En este trabajo se propone un ligante completamente nuevo, con la adición de un tercer brazo fenólico.⁸⁰ El esquema de síntesis de presenta a continuación en la Figura 11.

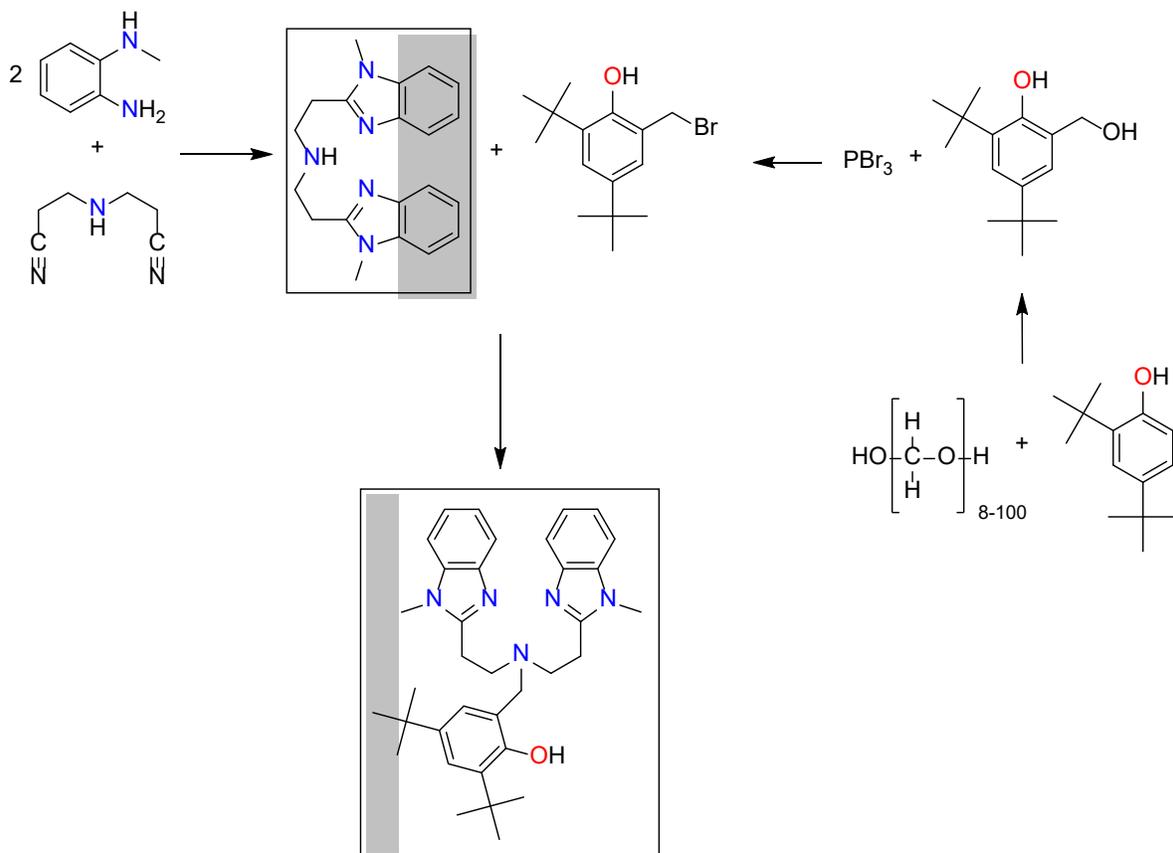


Figura 11. Diagrama de Síntesis de 2BB y 1F2BB.

Síntesis de *N,N*-Bis[2-(1-metilbenzimidazol-2-il)-etil]amina (2BB): En un matraz bola previamente recubierto con papel carbón y papel aluminio provisto de agitación se colocaron 3.10 g (23.37 mmol) de *N*-metil-*o*-fenilendiamina y 1.56 g (12.67 mmol) de 3,3'-iminodipropionitrilo, se añadieron lentamente 30 mL de HCl 6 M y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 100 h. Posteriormente se enfrió la mezcla en un baño de hielo y se añadió lentamente una disolución de NH_4OH hasta neutralizar. El precipitado verde pálido se filtró y lavó con un volumen de 200 mL de NH_4OH diluido 0.1 M. El sólido recuperado se recrystalizó en una mezcla etanol:agua (1:1), resultando en unos cristales color morado en forma de aguja. El rendimiento de esta reacción fue del 49% obteniendo 1.87 g del producto final con un p.f. 86-93 °C. Los valores de RMN coinciden con los reportados en la literatura: RMN 1H ($CDCl_3$) δ ppm 2.09 (m, 1H NH), 3.08 (t, 2H CH_2CH_2), 3.36 (t, 2H CH_2N),

3.69 (s, 1H NCH₃), 7.2-7.3 y 7.6-7.7 (m, 8H, H fenílicos y H benzimidazólicos). IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3201s, 1619w, 1511m, 1473m, 1442m, 1110m, 887w y 723s, DART-MS [2BB]⁺ 334 *m/z*.

Síntesis de 2,4-di-tert-butil-6-(hidroximetil)fenol (2,4-di-tBuMeOH): En un matraz bola provisto de agitador magnético se colocaron 3.5 g (16.96 mmol) de 2,4-di-terbutilfenol disuelto en 5.0 mL de metanol, sobre esta disolución se añadió gota a gota una suspensión de metanol (5.0 ml) que contiene 0.51 g (16.98 mmol) de paraformaldehído y 33.5 mg (1.40 mmol) de LiOH. La mezcla se calentó a reflujo durante 12 h y se retiró el disolvente con ayuda de un rotavapor, se añadieron posteriormente 15 mL de hexano y se filtró. Se deja reposar la mezcla de hexano a una temperatura de -20 °C durante 8 h y los cristales amarillo pálido formados fueron recuperados por filtración al vacío. El rendimiento de esta reacción fue de 38.4% obteniendo 1.54 g del producto final con un p.f. 97-98 °C. RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 1.29 (s, 3H tBu), 1.43 (s, 3H tBu), 4.86 (s, 2H ArCH₂OH), 5.30 (s, 1H OH), 6.90 (d, 1H HAr), 7.26 (d, 1H, HAr) 7.54 (s, 1H ArOH). p.f.. IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3201s, 1619w, 1511m, 1473m, 1442m, 1110m, 887w y 723s. DART-MS [2,4-di-tBuMeOH]⁺ 236 *m/z*.

Síntesis de 3,5-di-terbutil-2-hidroxibencilbromuro(3,5-di-tBuBr): En un matraz bola provisto de agitador magnético se colocaron 1.0 g (4.23 mmol) de 2,4-di-terbutil-6-(hidroximetil)fenol disueltos en 5.0 mL de CHCl₃, sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 5 mL de PBr₃ (1.69 mmol) en CHCl₃, la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 5.0 mL de agua y se lavó la fase orgánica con 15.0 mL de agua destilada, una vez realizados los lavados se añadió MgSO₄ a la fase orgánica para eliminar el agua residual. Posteriormente se eliminó el disolvente de la fase orgánica con ayuda de presión reducida y se dejó a -70°C durante dos días para obtener cristales incoloros y se obtuvo aproximadamente 1.1 g de 3,5-di-tBuBr con un rendimiento del 87.4% (p.f. 60-64 °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 1.29 (s, 3H tBu), 1.43 (s, 3H tBu), 4.59 (s, 2H ArCH₂Br), 5.30 (s, 1H OH), 7.11 (d, 1H HAr), 7.33 (d, 1H, HAr). IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3425m, 3179b, 2956s, 2867m, 1650w, 1481s, 1362s, 1227s, 996s, 879s.

Síntesis de 2-((bis(2-(1-metil-benzodimidazol-2-il)etil)amino)metil)-4,6-di-terbutilfenol (1F2BB): En un matraz bola previamente provisto de agitación se pesó 200.0 mg (0.60 mmol) de 2BB, 179.6 mg (0.60 mmol) de 3,5-di-tBuBr y 124.3 mg (0.90 mmol) de K₂CO₃ en acetonitrilo (5.0 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 8 horas. Posteriormente se filtró y el recipiente fue lavado dos veces con un volumen de 5.0 mL de CH₂Cl₂; los extractos orgánicos combinados fueron evaporados a presión reducida hasta que un sólido incoloro comenzó a precipitar. Se deja reposar la mezcla a -20°C durante toda la noche y mediante filtración se obtuvieron 116.9 mg de 1F2BB con un rendimiento del 35.3% (p.f. 154-155 °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 1.29 (s, 3H tBu), 1.40 (s, 3H tBu), 1.64 (s, 1H HOAr), 3.13 (t, 2H CH₂-CH₂), 3.30 (t, 2H CH₂-NR₃), 3.56 (s, 6H CH₃NAr), 4.01 (s, 2H CH₂ArN), 6.90 (s, 1H HAr), 7.22-7.28 (m, 5H HAr), 7.70 (m, 4H HAr), IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3425m, 3171b, 2956s, 2867m, 1648w, 1481s, 1227s, 995s, 879s, 674m. DART-MS [1F2BB]⁺ 552 *m/z*.

Síntesis de [Cu(H₂O)₂(2BB)](OTf)₂ (Cu2BB): En un matraz bola provisto de agitador magnético se colocaron 100.0 mg (0.30 mmol) de 2BB y 141.0 mg (0.30 mmol) de la sal de cobre Cu(OTf)₂·6H₂O. Se añadió 5.0 mL de metanol y la mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 4 h. Transcurrido el

tiempo de reacción se procedió a evaporar el disolvente a presión reducida y el sólido verde oscuro formado se lavó dos veces con 10 mL de dietiléter con el fin de eliminar cualquier residuo orgánico, fueron recuperados 192.0 mg con un rendimiento aproximado del 87%, p. desc. 237°C, IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3378b, 3228s, 1642w, 1613w, 1504s, 1461s, 1461s, 1414s, 1334s, 1284s, 1239s, 1224s, 1152s, 1028s, 747m.

Síntesis de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{1F2BB})](\text{ClO}_4)_2$ (Cu1F2BB): En un matraz bola provisto de agitador magnético se colocaron 80.0 mg (0.14 mmol) de 1F2BB y 53.7 mg (0.14 mmol) de la sal de cobre $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Se añadió 10.0 mL de acetonitrilo, la mezcla se dejó agitando durante 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción se procedió a evaporar el disolvente a presión reducida y el sólido verde oscuro que se forma se lavó dos veces con 10 mL de dietiléter con el fin de eliminar cualquier residuo orgánico, fueron recuperados 62 mg con un rendimiento aproximado del 50% p. desc. 193°C, IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3635b, 2954w, 2438b, 2160s, 2029s, 1977s, 1460m, 1100s, 1049s, 1010s, 749s.

Resultados y Discusión

Una vez obtenidos los ligandos y complejos de Cu se procedió a su caracterización. A continuación, se presentan los espectros de RMN, espectroscopía de masas DART e IR.

Para el ligante 2BB se asignaron las señales para el espectro de resonancia magnética de protón (RMN ^1H) las cuales pueden ser observadas en la Figura 12. La señal en 2.09 ppm se atribuye al protón restante en el átomo de nitrógeno central que une los dos brazos bencimidazólicos; la señal del grupo metileno que se encuentra próximo a la estructura bencimidazólica se encuentra en 3.08 ppm, mientras que la del grupo metileno próximo al grupo NH se encuentra en 3.36 ppm siendo ambos triplete. Un singulete asignado al grupo metilo del N-CH₃ en el anillo bencimidazólico se encuentra en 3.69 ppm, mientras que las señales correspondientes a los protones aromáticos del anillo bencimidazólico se encuentran entre 7.2-7.7 ppm.

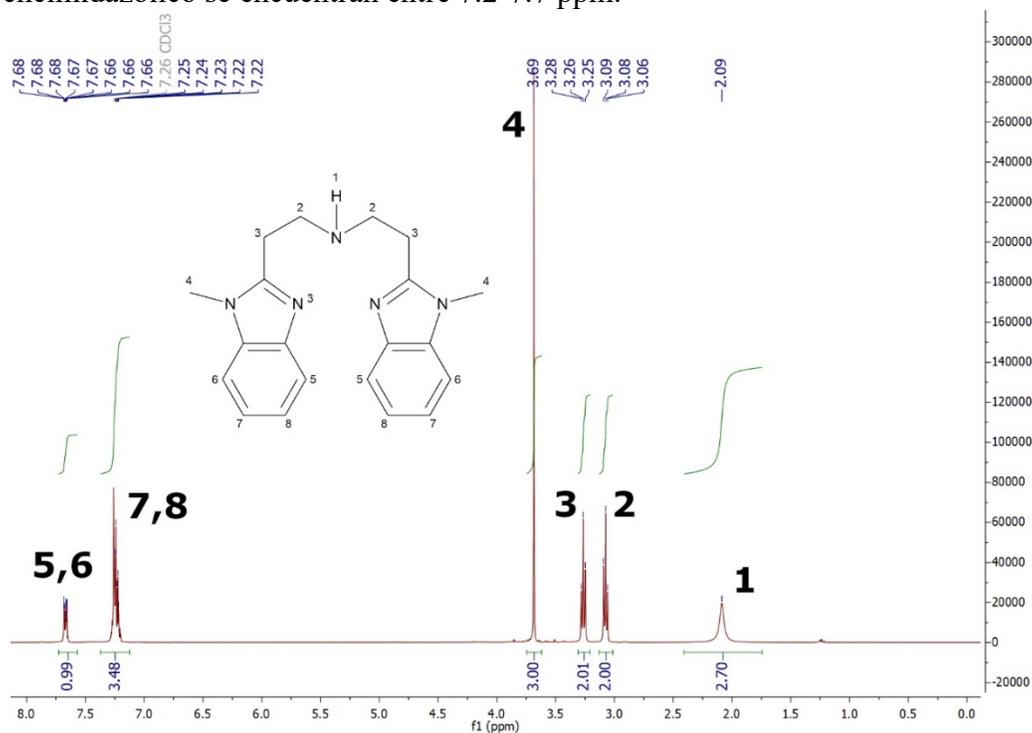


Figura 12. Espectro RMN ^1H del ligante 2BB en CDCl_3 .

La Figura 13 muestra el espectro de masas de 2BB, en donde se puede observar el pico correspondiente a la masa del ligante en 334 m/z . También en la Figura 13 se muestra el espectro de IR, la flexión del enlace N-H corresponde a la señal que se observa en 1619 cm^{-1} , los cuatro picos en 1473, 1442, 1110 y 723 cm^{-1} son característicos del anillo bencimidazólico.

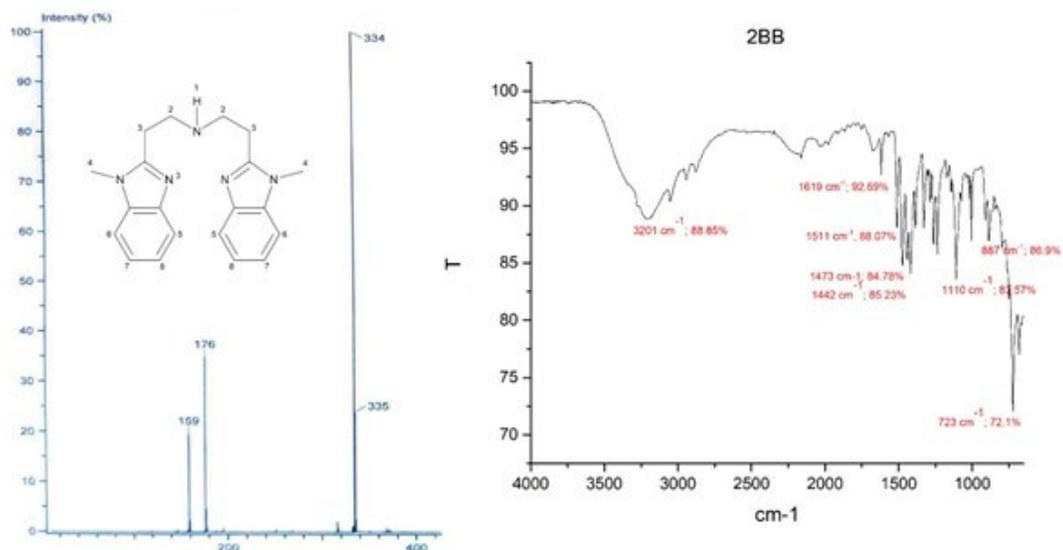


Figura 13. Espectro de masas DART-MS y ATR-IR del ligante 2BB.

Una vez el ligante 1F2BB ha sido obtenido se asignaron las señales para el espectro de resonancia magnética de protón (RMN ^1H) las cuales pueden ser observadas en la Figura 14. Las señales en 1.29 y 1.40 ppm se asignan a los dos grupos terbutilos que se encuentran en el anillo aromático del fenol, la señal pequeña y con forma ancha en 1.64 ppm se asigna al protón del grupo fenol, las dos señales tripletes en 3.13 y 3.30 ppm se asignan a la cadena que une los dos anillos bencimidazólicos a la amina terciaria de la estructura y la señal en 4.01 ppm se asigna al grupo metileno que conecta a la amina terciaria con el anillo fenólico. La señal en 3.56 ppm se asigna al grupo metilo que se encuentra unido a uno de los nitrógenos del anillo bencimidazólico.

Las señales en la zona aromática aparecen a partir de los 6.90 ppm, el cual se asigna a uno de los protones que se encuentran en el anillo aromático fenólico; mientras que las señales que se encuentran entre los 7.22 y 7.28 ppm son señales de ambos anillos aromáticos dentro de la molécula mientras que la señal en 7.70 ppm se asigna a los 2 protones que se encuentran en anillo bencimidazólico.

La Figura 5 muestra el espectro de masas del ligante 1F2BB en donde claramente se puede apreciar el pico que corresponde a la masa del ligante más una protonación en 552 m/z . También se muestra el espectro de IR en la Figura 15, los cambios más importantes con respecto al espectro de 2BB son importantes ya que el pico de 3201 cm^{-1} perteneciente a la extensión del enlace N-H se ve eliminado y los picos de los grupos C-H alquílicos de los grupos terbutilos se ven intensificados, lo que indica que el grupo amino se encuentra sustituido en la molécula.

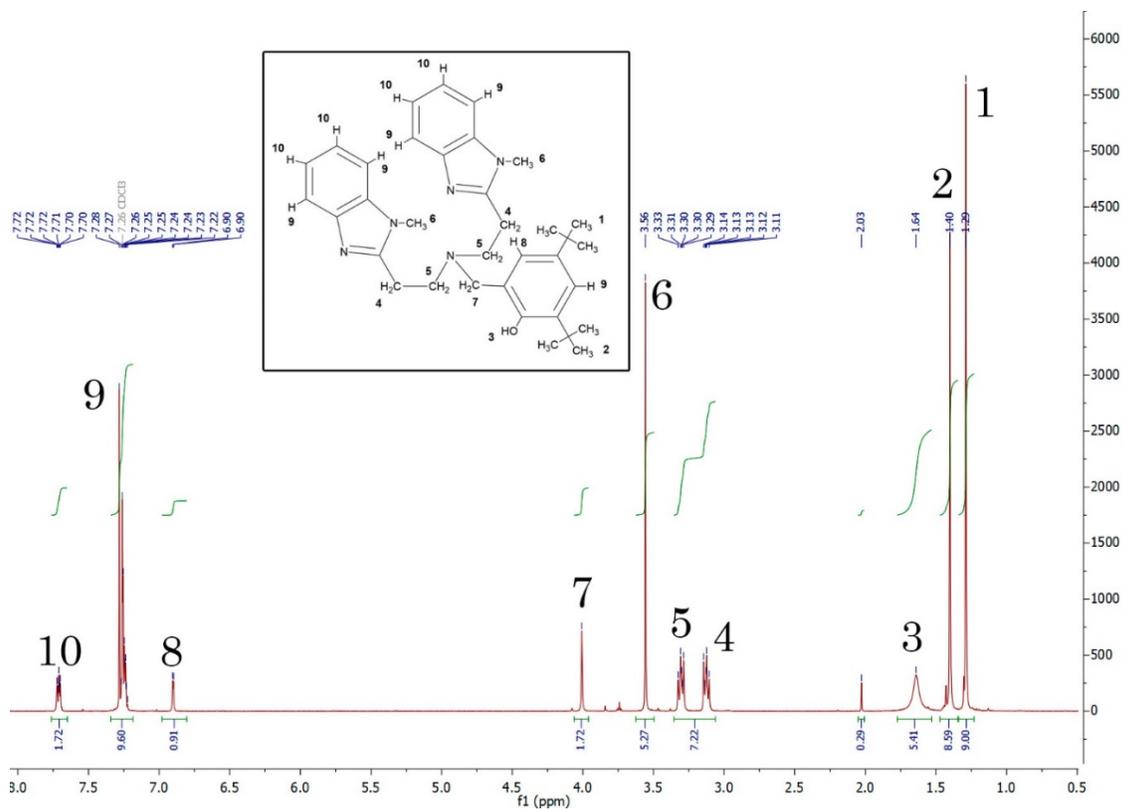


Figura 14. Espectro RMN ¹H del ligante 1F2BB en CDCl₃.

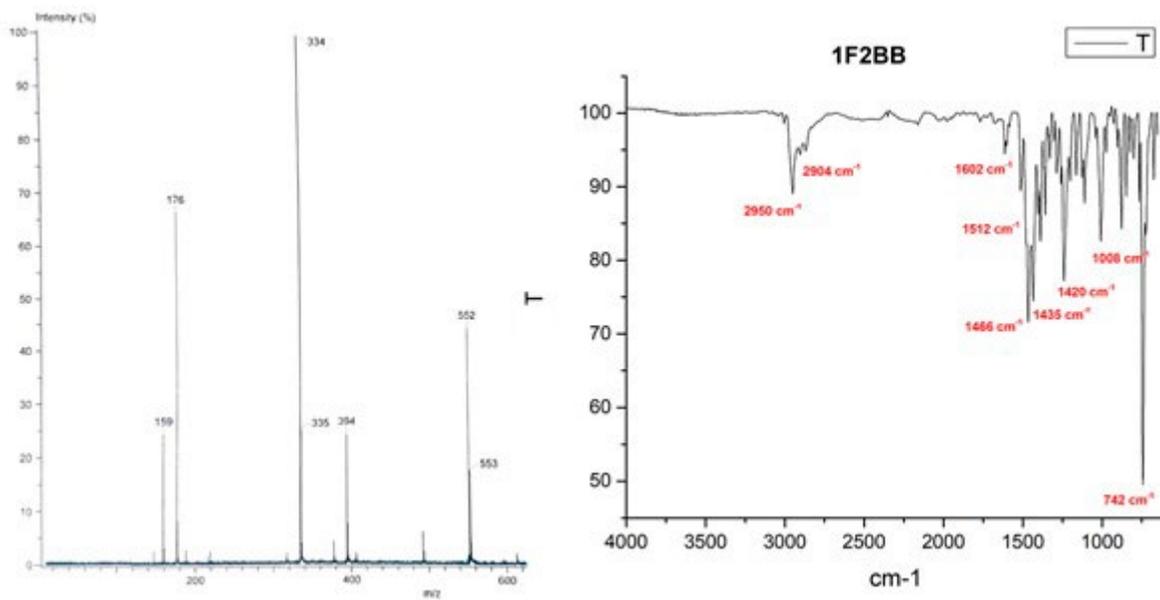


Figura 15. Espectro de masas DART-MS y ATR-IR del ligante 1F2BB.

Pruebas de Degradación

Se realizaron pruebas de degradación con los sustratos celulosa, quitina y lignocelulosa con el fin de evaluar las propiedades del complejo Cu₂BB en el proceso de pretratamiento de biomasa para la degradación oxidativa de los mismos. Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente en medio acuoso.

Pruebas con Catalizador Cu₂BB + Agente Oxidante a T ambiente durante 24 horas:

Se llevaron a cabo experimentos con diferentes cantidades y tipos de oxidante siendo el más fácil de usar el oxígeno atmosférico, los tres sustratos mostraron diferente comportamiento sobre todo la lignocelulosa, en la que se observa una disminución en la capacidad de degradación del catalizador.

Para todos los casos se observó degradación de biomasa, inclusive cuando no se agregó agente oxidante, esto podría deberse a que estos sustratos contienen azúcares reductores que pueden promover la reducción de Cu(II) a Cu(I). Los complejos de Cu(I) podrían reaccionar con O₂ atmosférico, activándolo para llevar a cabo la degradación oxidativa de los sustratos empleados. Se debe tomar en cuenta que la cantidad de oxidante dentro del medio de reacción puede llegar a afectar el ciclo catalítico evitando que Cu(II) se reduzca a Cu(I).

Las reacciones de Cu₂BB + O₂ y Cu₂BB + 15% m/v H₂O₂ fueron realizadas por triplicado mientras que las reacciones con cantidades de oxidante de 10 Eq y 3% m/v H₂O₂ fueron realizadas por duplicado, la Tabla 2 muestra el promedio y la desviación estándar del porcentaje de degradación de las respectivas pruebas.

Tabla 2. Porcentaje de degradación de biomasa a 24h y T ambiente con diferentes cantidades de oxidante. n=3 para O₂ y 15% H₂O₂; n=2 para 10 Eq H₂O₂ y 3% H₂O₂.

	O ₂			10 Eq H ₂ O ₂			3% H ₂ O ₂			15% H ₂ O ₂		
	Quit	Cel	Lig	Quit	Cel	Lig	Quit	Cel	Lig	Quit	Cel	Lig
Promedio	8.8	11.0	9.4	10.0	3.7	6.9	15.9	8.7	7.1	28.8	25.2	18.7
Desv. Est	2.5	1.9	2.5	6.5	4.2	8.0	0.6	1.9	9.1	4.7	10.4	6.2

Para quitina se puede observar una tendencia a incrementar el porcentaje de degradación del sustrato en la medida que incrementa la cantidad de agente oxidante como se muestra en la Figura 16, esto en contraste con los otros dos sustratos (celulosa y lignocelulosa) en donde se observa claramente que para los parámetros de 10 Eq y 3% m/v de H₂O₂ el porcentaje de degradación disminuye. Esta tendencia se puede explicar debido al proceso de autoinactivación del centro metálico debido a la presencia de H₂O₂, que mantienen al átomo de Cu en un estado de oxidación 2+ y no le permite regenerarse a su forma activa Cu(I) para poder continuar con el ciclo de degradación.

De este proceso también se puede destacar el alto porcentaje de degradación que existe para 15% m/v H₂O₂, en donde para todos los sustratos se excede el 15% de degradación. Esto puede deberse a varios factores, la hipótesis que se maneja es la existencia de una mayor cantidad de oxígeno disponible en disolución debido a la descomposición de H₂O₂ en O₂. Los productos mayoritarios para las condiciones de 15% H₂O₂ m/v se para celulosa y quitina se muestran a continuación en la Figura 17.

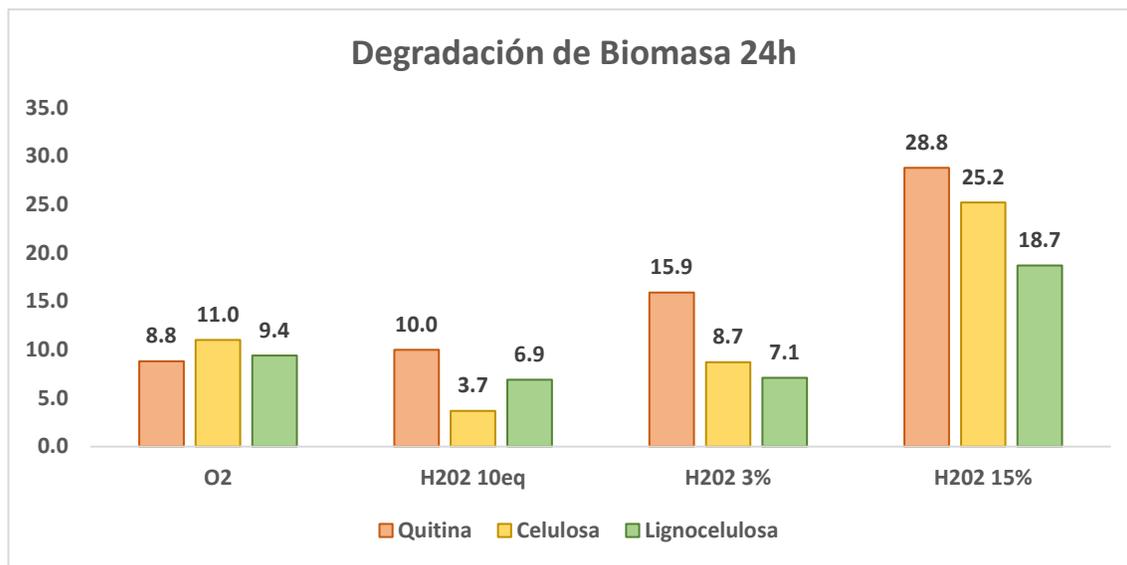


Figura 16. Degradación de biomasa aumentando la cantidad de oxidante.

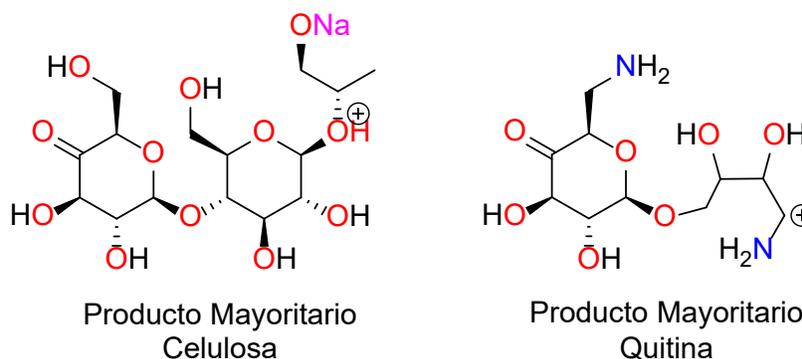


Figura 17. Productos mayoritarios determinados por HPLC-MS para la degradación de celulosa y quitina en condiciones de oxidación 15% H₂O₂ m/v

Las pruebas blanco realizadas ayudaron a determinar la influencia del oxidante en la degradación del sustrato así como también la influencia de la fuente de Cu en la reacción, la Tabla 3 muestra el porcentaje de degradación que se obtiene cuando se usa CuSO₄ como fuente de Cu usando O₂ atmosférico y 15% m/v H₂O₂ como agentes oxidantes, y a su vez el efecto que tiene por sí solo la cantidad de oxidante en la mezcla de reacción.

Tabla 3. Porcentaje de Degradación de Biomasa con blanco, CuSO₄ y catalizador Cu2BB.

	O ₂			15% H ₂ O ₂		
	Quit	Cel	Lig	Quit	Cel	Lig
Sin Cu	3.2	0.0	2.3	7.6	4.3	3.8
CuSO₄	0.0	4.1	7.0	25.1	23.3	6.0
Cu2BB	8.8	11.0	9.4	28.8	25.2	18.7

En la Figura 18 se observa que cuando se usa como oxidante el oxígeno atmosférico el porcentaje de degradación aumenta cuando se usa una fuente de Cu, también se observa claramente que el catalizador de Cu2BB logra degradar significativamente más biomasa que CuSO₄.

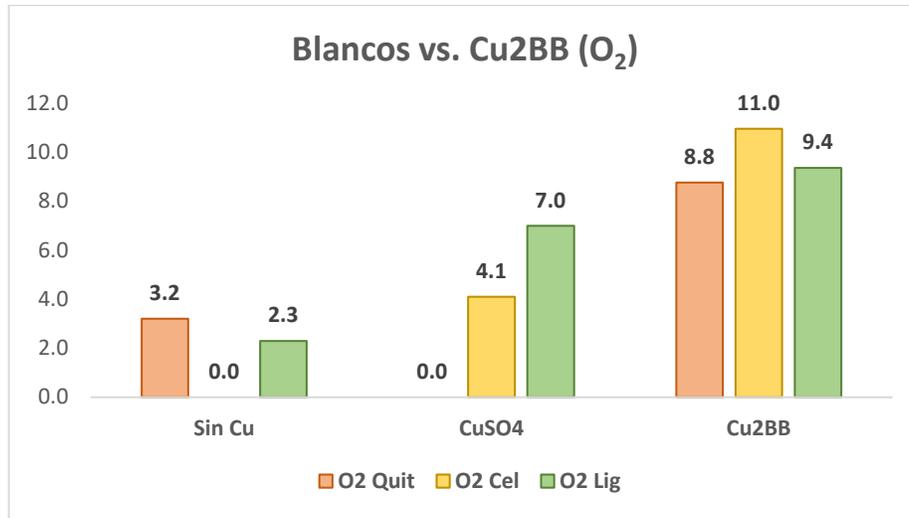


Figura 18. Degradación de Biomasa con blanco, CuSO₄ y Cu2BB usando O₂ como oxidante.

La Figura 19 muestra un incremento en el porcentaje de degradación de los sustratos al usar una fuente de Cu en el medio de reacción y se nota un ligero aumento en la cantidad de degradación al usar el catalizador Cu2BB. Al observar este resultado se puede concluir que el CuSO₄ también cataliza la reacción de degradación de biomasa, en este caso se presume que la degradación se esté dando debido a un sistema redox tipo Fenton catalizado por los iones Cu⁺, los cuales pueden generar radicales hidroxilo con un potencial de oxidación muy alto y podrían atacar al sustrato para degradarlo.

Con el fin de comprobar que la degradación del sustrato cuando la fuente de cobre es CuSO₄ es llevada a cabo por la generación de radicales hidroxilo en un sistema tipo Fenton, se llevaron a cabo pruebas de captura de radicales libres monitoreadas por RPE.

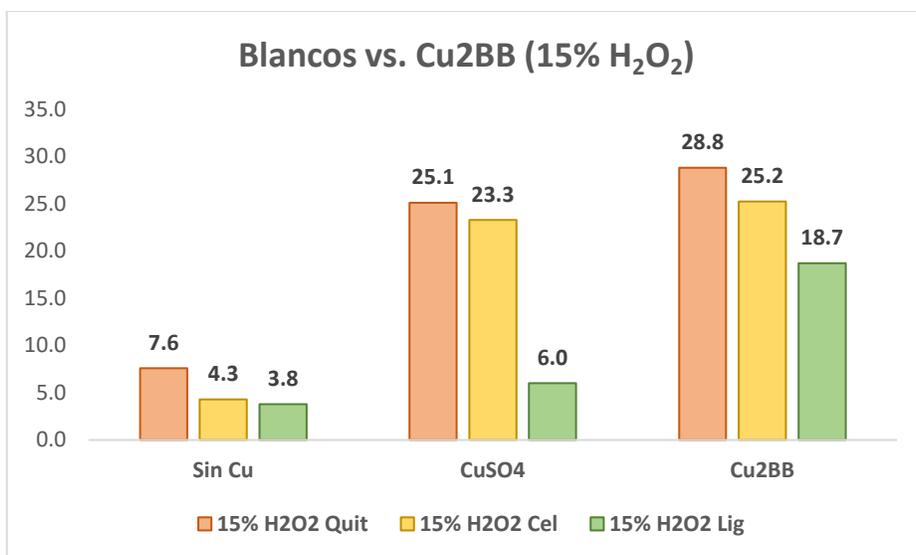


Figura 19. Degradación de Biomasa con Blanco, CuSO₄ y Cu2BB usando 15% m/v H₂O₂ como oxidante.

También se realizaron experimentos de control en atmósfera inerte como se muestra en la Figura 20. Para las condiciones en las que no existe oxidante en el medio de reacción se puede observar una pequeña degradación de aproximadamente 6% para todos los sustratos, esto podría deberse a compuestos solubles del sustrato o a degradación del mismo por un mecanismo de hidrólisis.⁸¹ Para 15% m/v H₂O₂ bajo atmósfera de N₂ los resultados muestran que la degradación ocurre sin necesidad de O₂; el cromatograma de HPLC-MS para estas condiciones muestra una gran similitud con el blanco del sustrato en el que no se usa catalizador alguno.

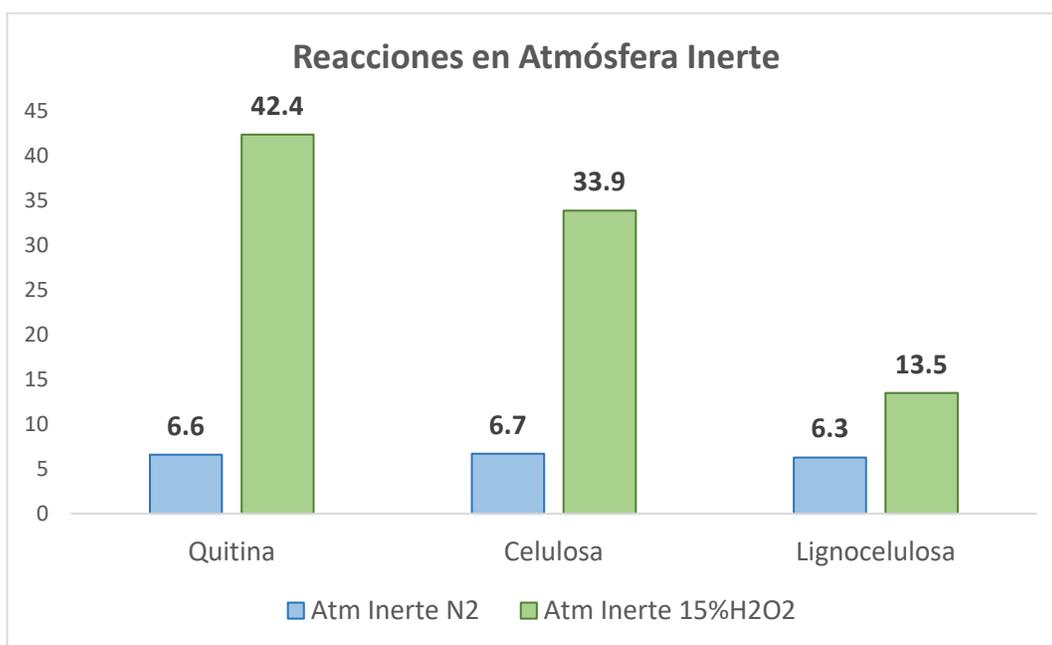


Figura 20. Comparativa de reacciones en atmósfera inerte en completa ausencia de oxidante y con 15% m/v de H₂O₂.

Prueba de trampa de radicales

El espectro de RPE esperado para DMPO-OH es el de un cuadruplete con intensidad 1:2:2:1. El espectro de RPE esperado para el aducto del radical superóxido con DMPO es el de un cuadruplete dobleteado con intensidad 1:2:2:1, estos dos espectros se muestran a continuación en la Figura 21.

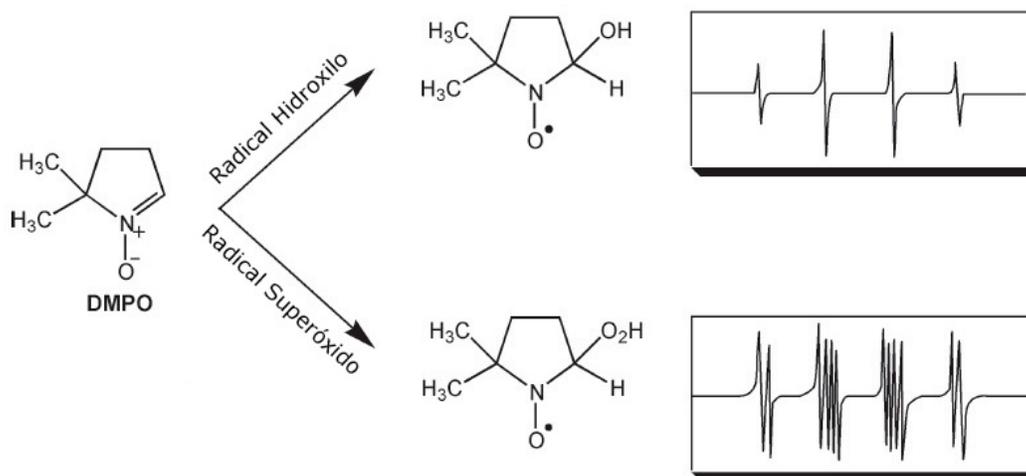


Figura 21. Espectros de RPE de los aductos de DMPO con especies activas de oxígeno.

La prueba de trampa de radicales libres realizada en el medio de reacción arroja resultados congruentes con lo observado experimentalmente en las pruebas de degradación de biomasa, se observa la generación del radical hidroxilo a través de la detección del radical DMPO-OH que tiene un espectro característico de RPE como un cuadruplete y que se muestra en la Figura 22 para el sustrato de celulosa (los espectros de RPE para esta prueba para los demás sustratos se encuentran en los Anexos 1 y 2). Este mismo espectro se observa con una intensidad considerablemente menor cuando el catalizador usado es Cu2BB, lo cual indica que en este último caso la generación del radical hidroxilo es mucho más controlada y no se encuentra en grandes cantidades libre en disolución. Con esta información, se puede plantear que en el caso del complejo Cu2BB las especies reactivas cobre-oxígeno son responsables de la mayor parte de la degradación de los polisacáridos.

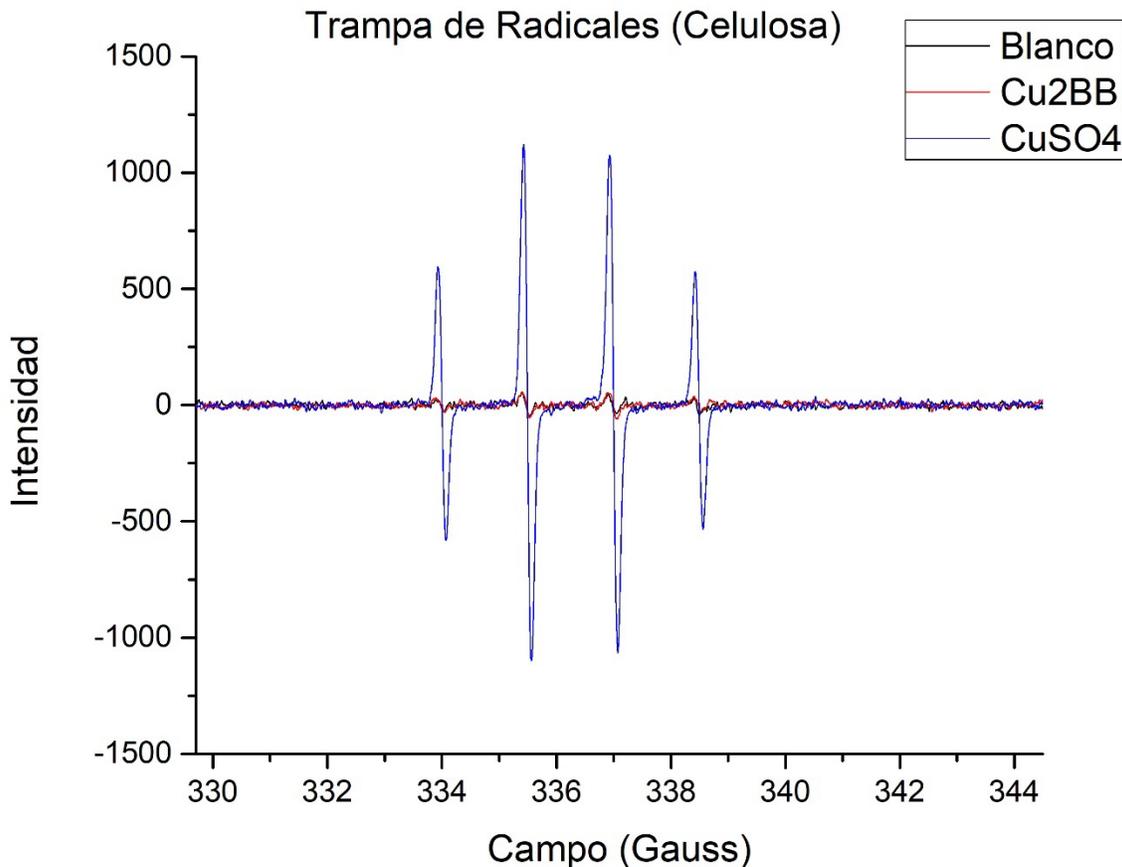


Figura 22. Espectro de RPE del sistema de degradación de celulosa y la trampa de radicales libres (DMPO).

La presencia del radical hidroxilo cuando el catalizador es CuSO_4 y la baja o casi nula detección del mismo cuando el catalizador es Cu_2BB indica que la degradación en el primer caso no es controlada y que el producto principal de esta reacción no necesariamente serán los productos de oxidación de los azúcares como se observa en el caso de las enzimas LPMO, que es el principal objetivo de este trabajo.^{82,83}

Efecto del tiempo de reacción en la degradación de Biomasa:

Con el fin de evaluar si la capacidad de degradación de Cu_2BB mejora a 72 h con relación a las condiciones iniciales de 24 h, se realiza un experimento usando la misma cantidad de catalizador y sustrato, tan solo el tiempo de reacción se ve modificado. Esta reacción se realiza bajo las condiciones que dieron los mejores resultados descritos anteriormente: biomasa + O_2 atmosférico y biomasa + 15% m/v H_2O_2 .

La Figura 23 muestra el porcentaje de biomasa degradada al cabo de un tiempo de reacción de 72 h con O_2 atmosférico como oxidante: para celulosa existe un incremento del 6.7% en degradación, mientras que para quitina y lignocelulosa el incremento es de aproximadamente el 3%.

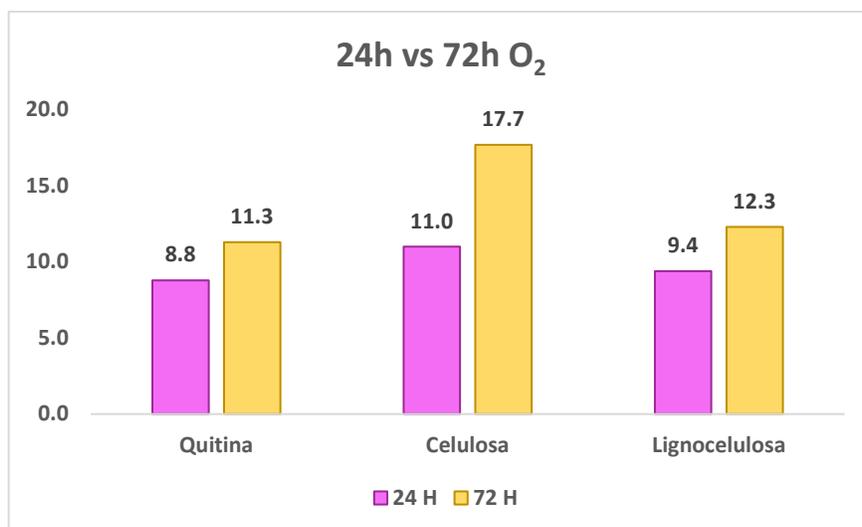


Figura 23. Comparativa entre las reacciones a 24 y 72 h usando O₂ atmosférico como oxidante.

La Figura 24 muestra los resultados cuando el oxidante es 15% m/v H₂O₂, no se observa un cambio significativo para quitina, mientras que para celulosa disminuye un 5% aproximadamente el porcentaje de degradación. Donde se ve una mejora sustancial en el porcentaje de degradación es para lignocelulosa, aumentando en un 12.7%. Esto puede deberse a que los compuestos fenólicos de la lignocelulosa facilitan la reducción del catalizador de Cu(II) a Cu(I) para activarlo.

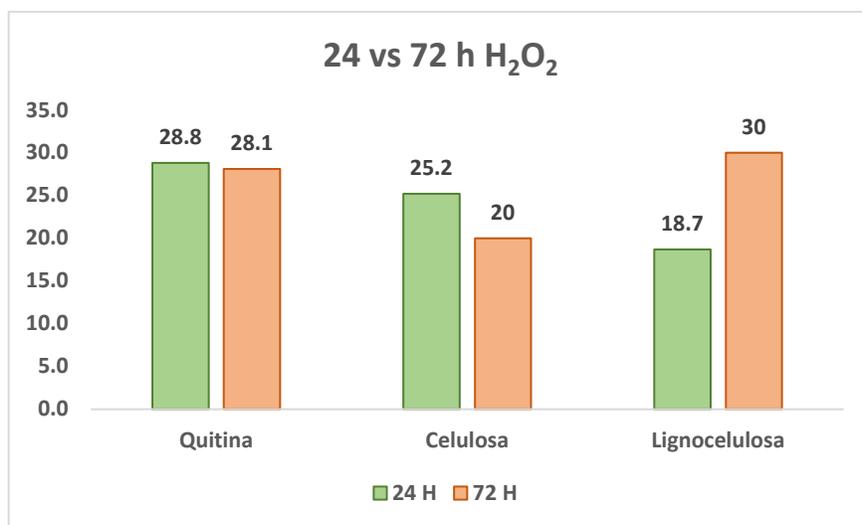


Figura 24. Comparativa entre las reacciones a 24 y 72 h usando H₂O₂ atmosférico como oxidante.

Análisis de los productos de degradación por HPLC-MS

Los resultados obtenidos del análisis por HPLC-MS de la mezcla de reacción muestran que existen diferentes especies en diferentes tiempos de retención. Los picos más relevantes en cada una de las condiciones reportadas se tomaron en cuenta para proponer una estructura coherente acorde a

su masa obtenida. Las especies propuestas son fracciones de celulosa, como celobiosa, celotriosa, u oligómeros de más unidades, además de aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos producto de la oxidación en las posiciones C1 y C4 del anillo piranósico del monómero de glucosa que conforma a la celulosa. Estas especies han sido reportadas previamente como productos de degradación de celulosa y sus posibles derivados.

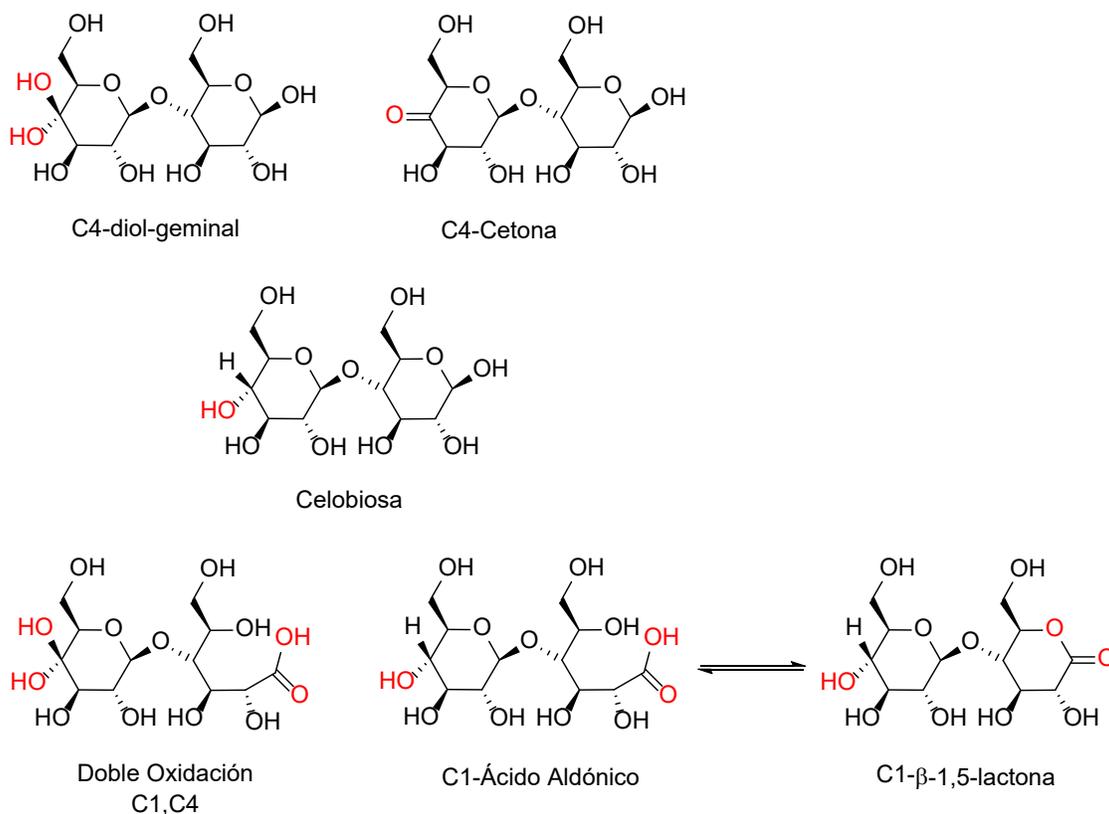
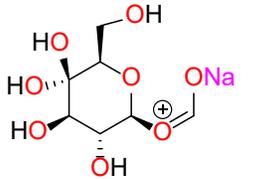
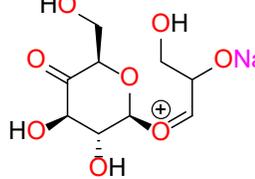
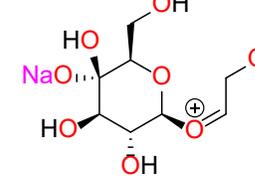
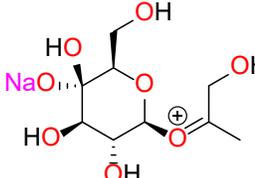
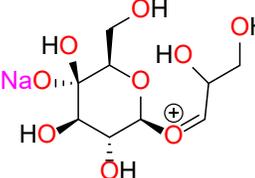
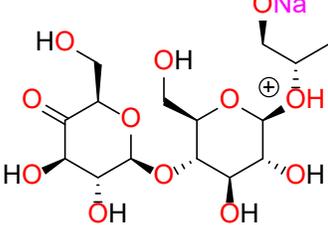
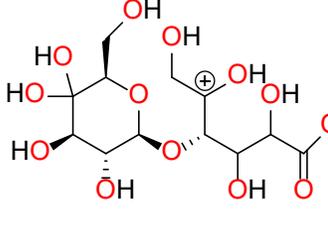
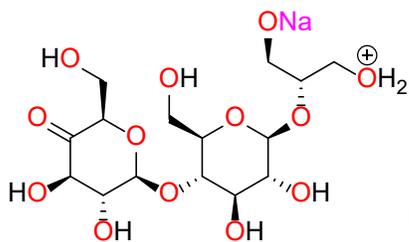
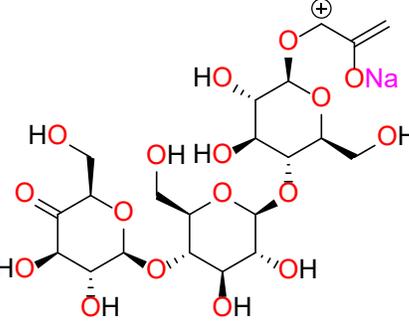


Figura 25. Productos de degradación oxidativa provenientes de un ataque C1 o C4 en el fragmento de celobiosa. El producto β-1,5-lactona que existe en pequeñas cantidades se encuentra en equilibrio con el ácido aldónico.

También se han propuesto estructuras para la degradación de quitina de igual manera con oxidación en las posiciones C1 y C4 del anillo piranósico. En la Figura 25 se ejemplifica cómo reconocer el ataque en posiciones C1 o C4, dependiendo del grupo funcional que se genera: un diol geminal, un aldehído, una cetona o un ácido carboxílico. Las estructuras aquí propuestas son un acercamiento muy plausible con base en las masas observadas y reportes previos en los que se ha logrado identificar los productos de degradación de quitina y celulosa.^{84,85} No obstante, será necesario hacer un análisis con técnicas complementarias para lograr caracterizarlas inequívocamente.

Tabla 4. Resultados de los estudios de degradación para celulosa usando Cu2BB

≈ m/z	[Moléculas Propuestas + H/Na] ⁺
200-300	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 247.15</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 273.19</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 261.18</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 275.21</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 291.21</p> </div> </div>
301-600	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 421.35</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 395.27</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 437.35</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Peso Molecular: 579.46</p> </div> </div>

700-850

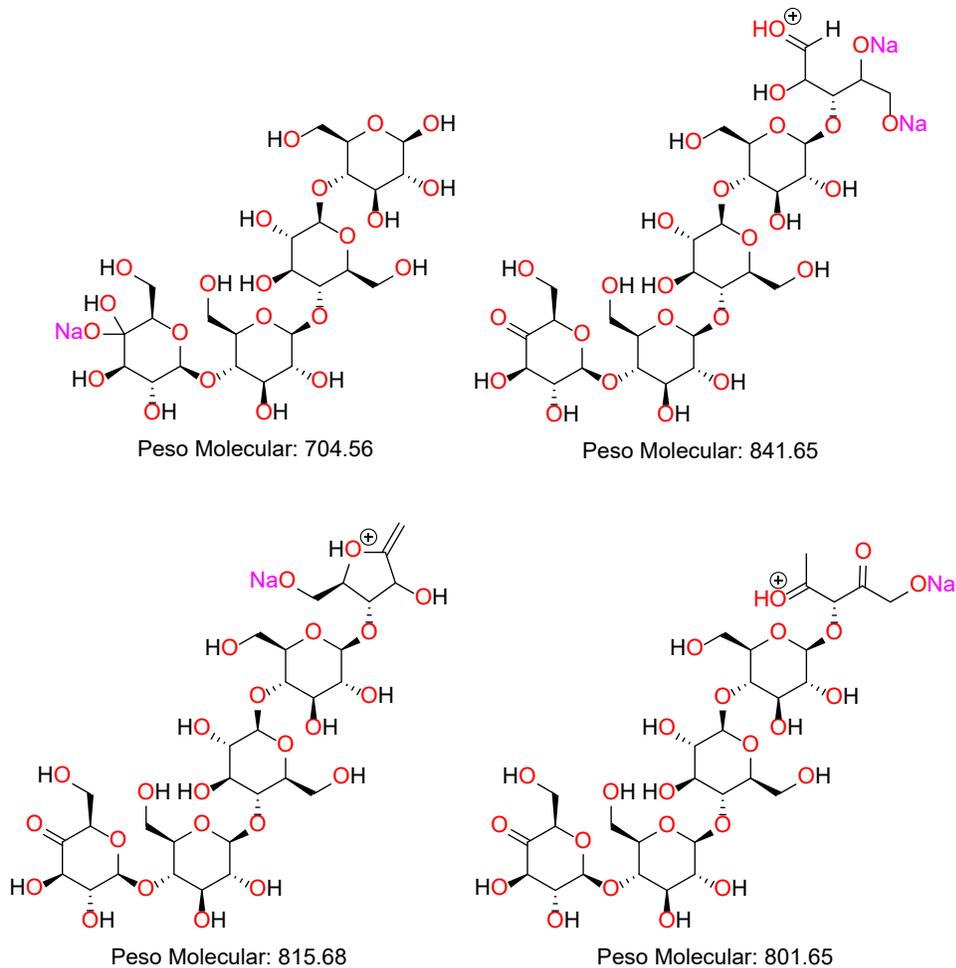
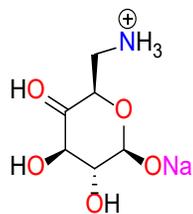


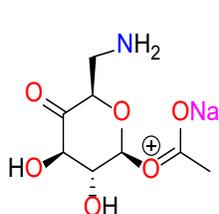
Tabla 5. Resultados de los estudios de degradación para quitina usando Cu2BB

\approx m/z	[Moléculas Propuestas + H/Na] ⁺
100- 200	<p>Peso Molecular: 155.10</p>

201-300



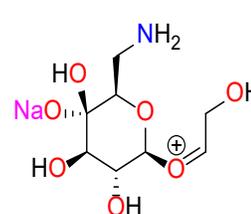
Peso Molecular: 201.15



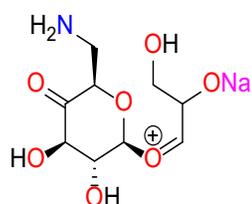
Peso Molecular: 242.18



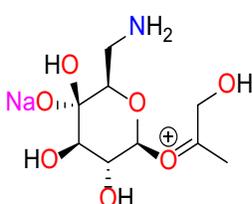
Peso Molecular: 246.17



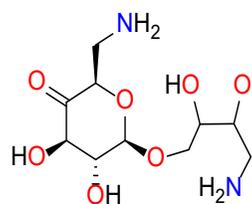
Peso Molecular: 260.20



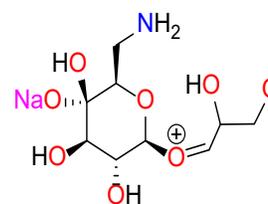
Peso Molecular: 272.21



Peso Molecular: 274.22

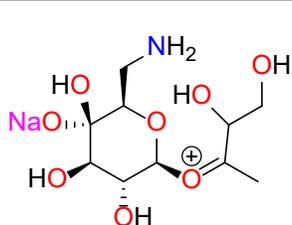


Peso Molecular: 279.27

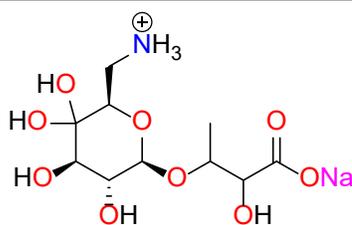


Peso Molecular: 290.22

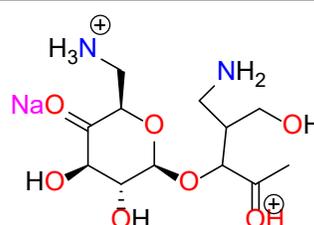
301-500



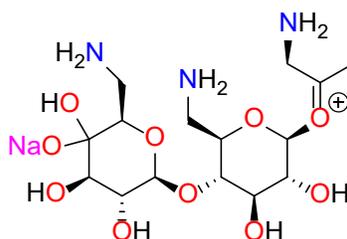
Peso Molecular: 304.25



Peso Molecular: 320.25

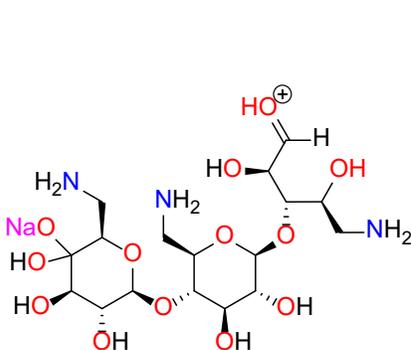


Peso Molecular: 331.32

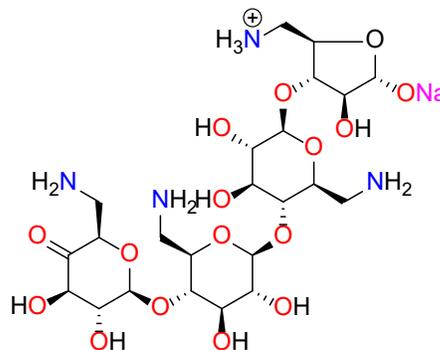


Peso Molecular: 434.40

501-700



Peso Molecular: 510.45



Peso Molecular: 653.59

Estudio Morfológico usando Microscopía de Barrido Electrónico:

Se realizó un análisis morfológico de los sustratos sólidos antes y después del tratamiento oxidativo por microscopía de barrido electrónico (MBE), sin que se aprecie algún cambio significativo en cuanto a la estructura del material. La Figura 26 muestra la imagen ampliada de uno de los sustratos (celulosa) antes y después del tratamiento con el agente oxidante y el catalizador; no se observan entidades esféricas que podrían indicar la presencia de nanopartículas de cobre que podrían estar llevando a cabo la catálisis, por lo cual se postula que el complejo de cobre actúa como catalizador homogéneo durante todo el proceso de reacción.

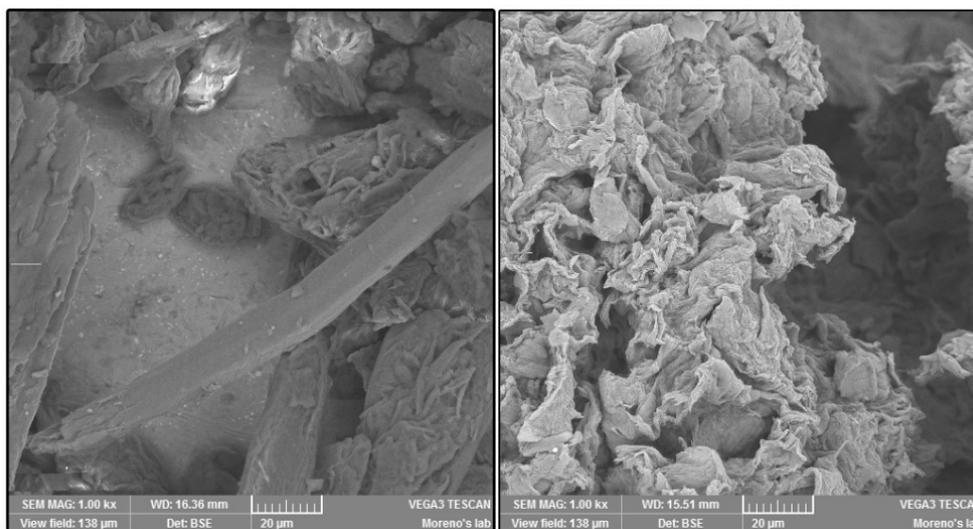


Figura 26. Del lado izq. tenemos celulosa sin tratamiento químico y del lado der. celulosa con un tratamiento del 15% H_2O_2 m/v ambos con 1000x de magnificación.

También se analizaron los sustratos antes y después del tratamiento oxidativo mediante espectroscopía IR, como se muestra en la Figura 27. Las bandas observadas son prácticamente idénticas al espectro previo al tratamiento oxidativo, además que no se encuentra la banda de 1710 cm^{-1} característica de grupos carboxílicos. Debido a esta evidencia se descarta la posibilidad de que haya productos de degradación insolubles retenidos en el sustrato y se puede aseverar que toda la masa sobrante de las reacciones descritas anteriormente corresponde al sustrato sólido prácticamente sin cambios.

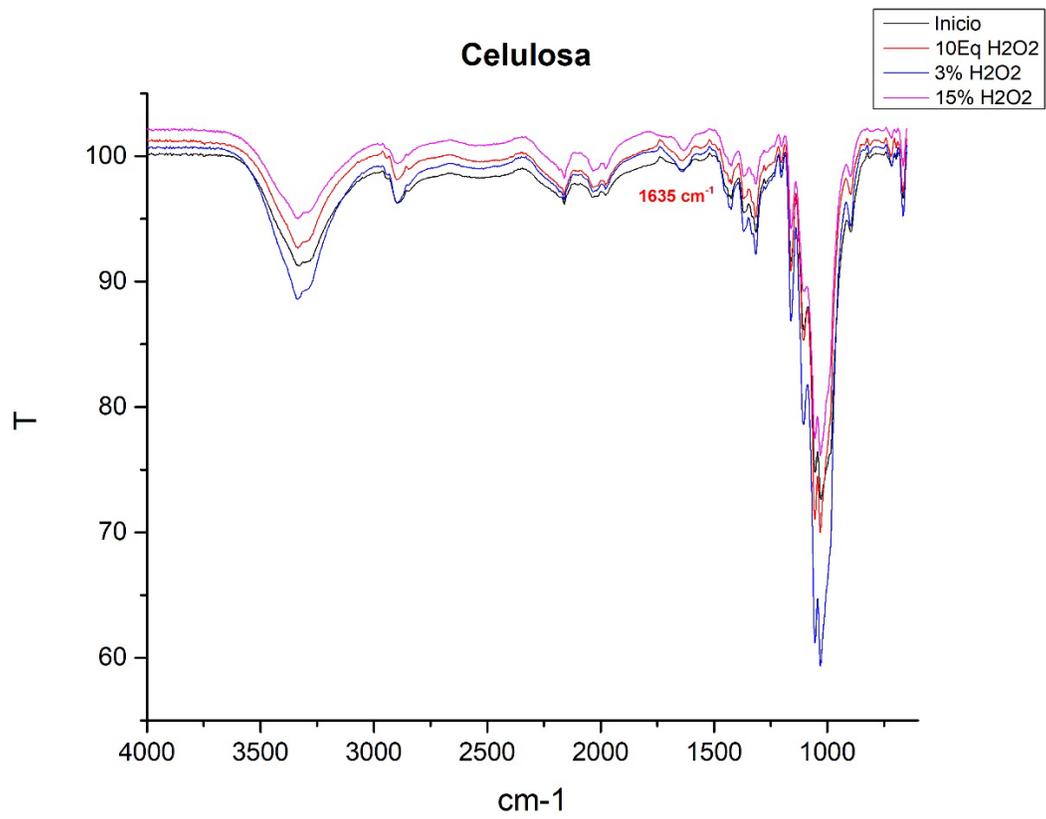


Figura 27. Espectro IR del sustrato de celulosa antes y después del tratamiento oxidativo.

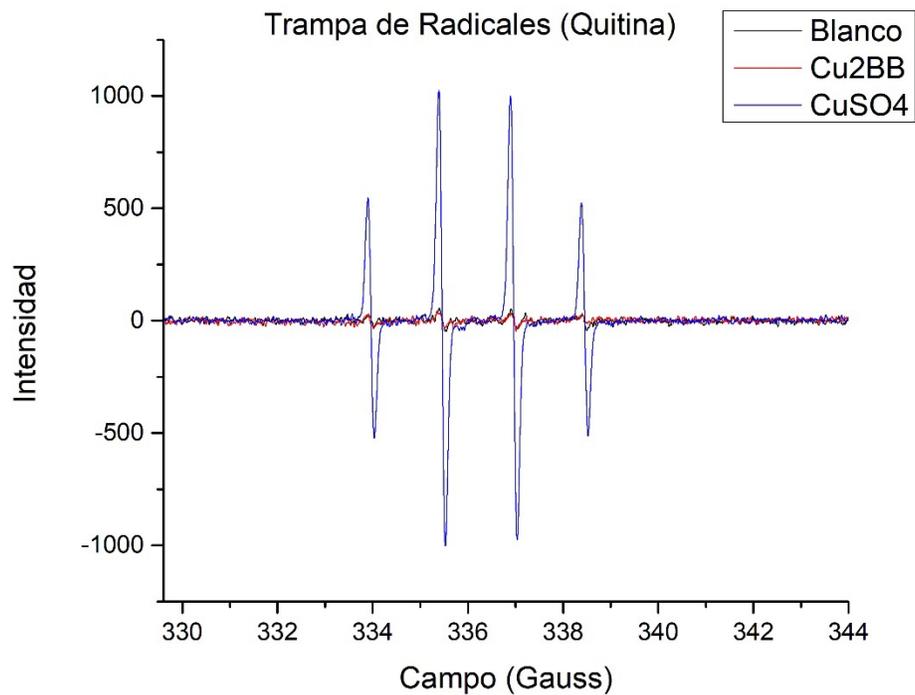
Conclusiones

- Se sintetizó y caracterizó el complejo Cu₂BB con éxito y este fue usado en pruebas de degradación oxidativa de biomasa recalcitrante.
- Se logró sintetizar y caracterizar el complejo Cu₁F₂BB
- Se logró determinar la capacidad de degradación oxidativa del catalizador Cu₂BB en los tres sustratos de biomasa recalcitrante (quitina, celulosa, lignocelulosa), se usaron diferentes cantidades de oxidante para cada una de las condiciones y se evaluó cual de todas las condiciones es la óptima para llevar a cabo la degradación de biomasa.
- Se observó que la mejor condición para llevar a cabo la degradación oxidativa de biomasa recalcitrante es cuando se usa el catalizador Cu₂BB al 5% mol y usando una cantidad de oxidante del 15% m/v de H₂O₂.
- Los estudios morfológicos por microscopía de escaneo electrónico no mostraron la presencia de nanopartículas de Cu que podrían llevar a cabo la degradación de los sustratos.
- Gracias a la caracterización de la reacción por RPE se pudo concluir que la reacción no procede por un mecanismo tipo Fenton, sino que el radical hidroxilo (o la especie oxidante por identificar) se encuentra dentro de la esfera de coordinación del Cu.

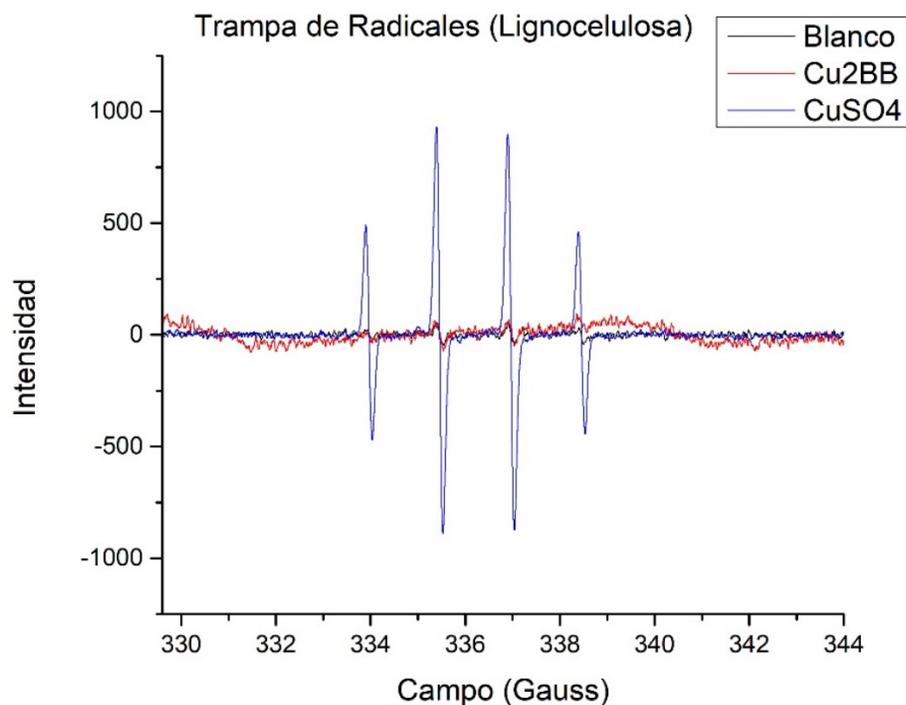
Perspectivas

- Realizar estudios de reactividad con O₂ y H₂O₂ con el complejo Cu₁F₂BB
- Realizar estudios de degradación oxidativa en sustratos de biomasa recalcitrante con el complejo Cu₁F₂BB y compararlo con Cu₂BB.

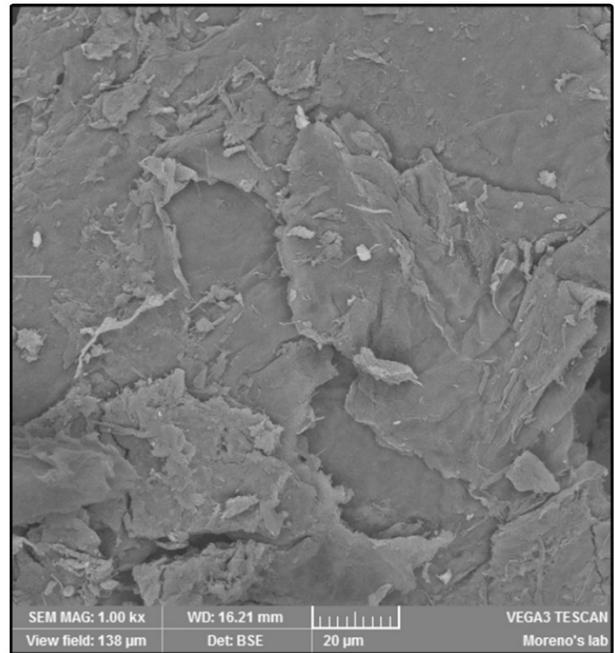
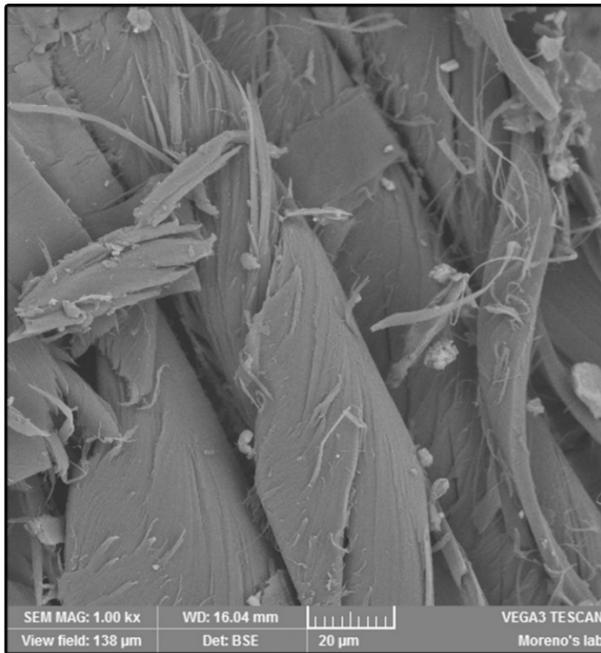
Anexos



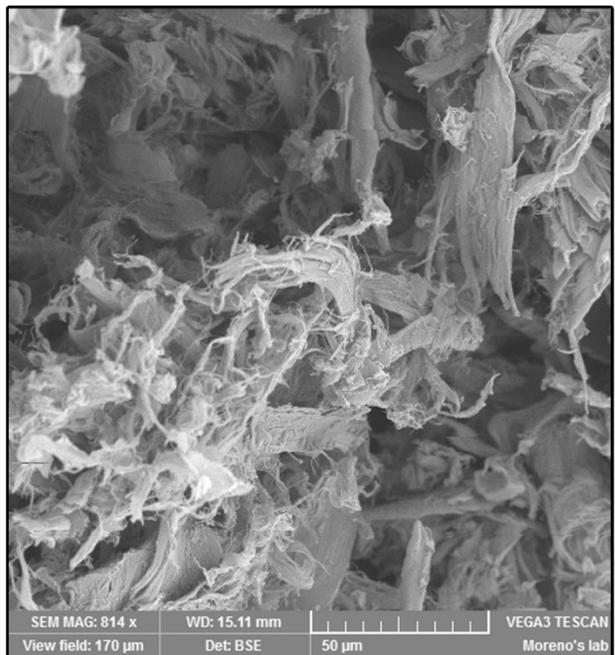
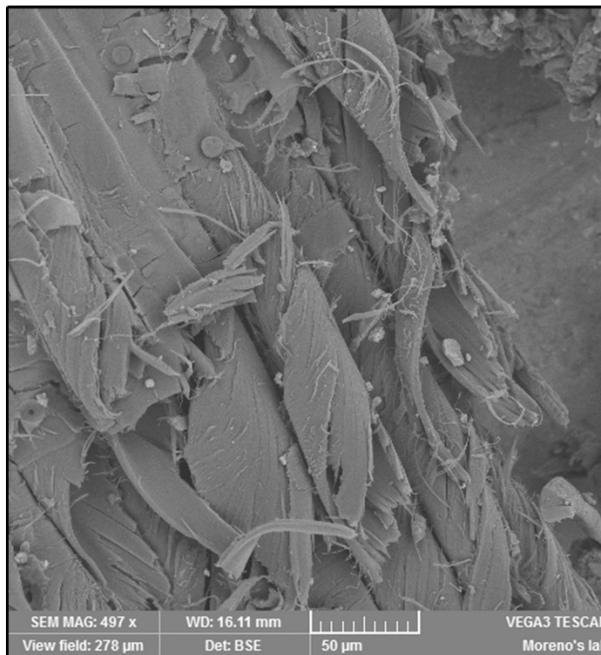
Anexo 1. Espectro de RPE del sistema de degradación de quitina y la trampa de radicales libres (DMPO).



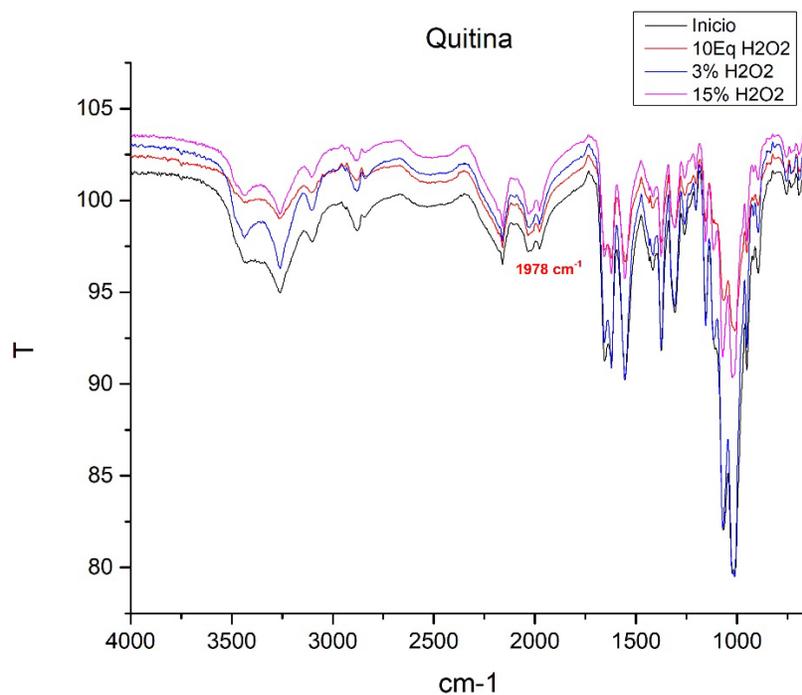
Anexo 2. Espectro de RPE del sistema de degradación de quitina y la trampa de radicales libres (DMPO).



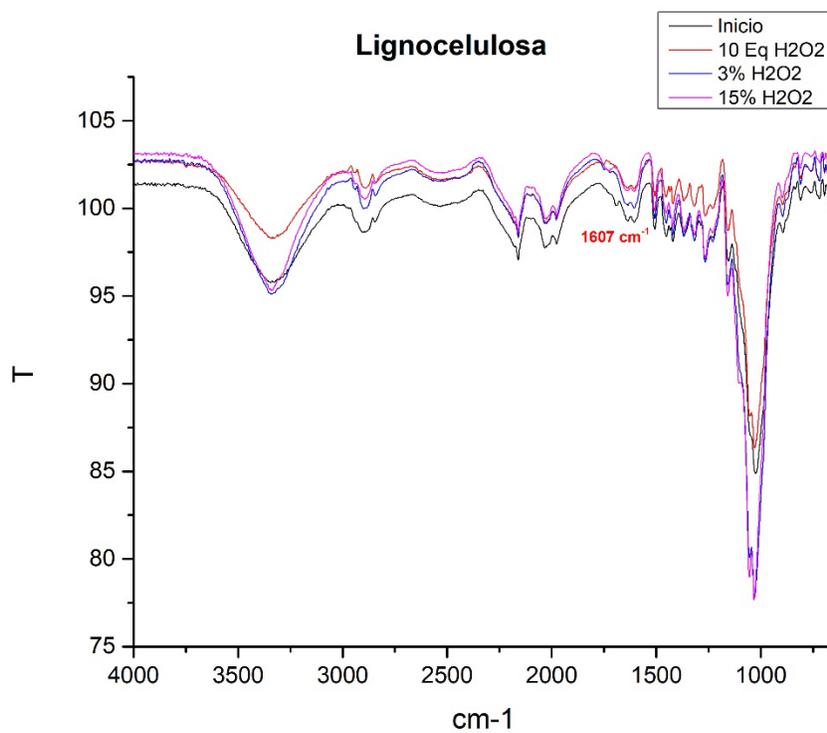
Anexo 3. Del lado izq. tenemos quitina sin tratamiento químico y del lado der. quitina con un tratamiento de 10 Eq H_2O_2 , ambos con 1000x de magnificación.



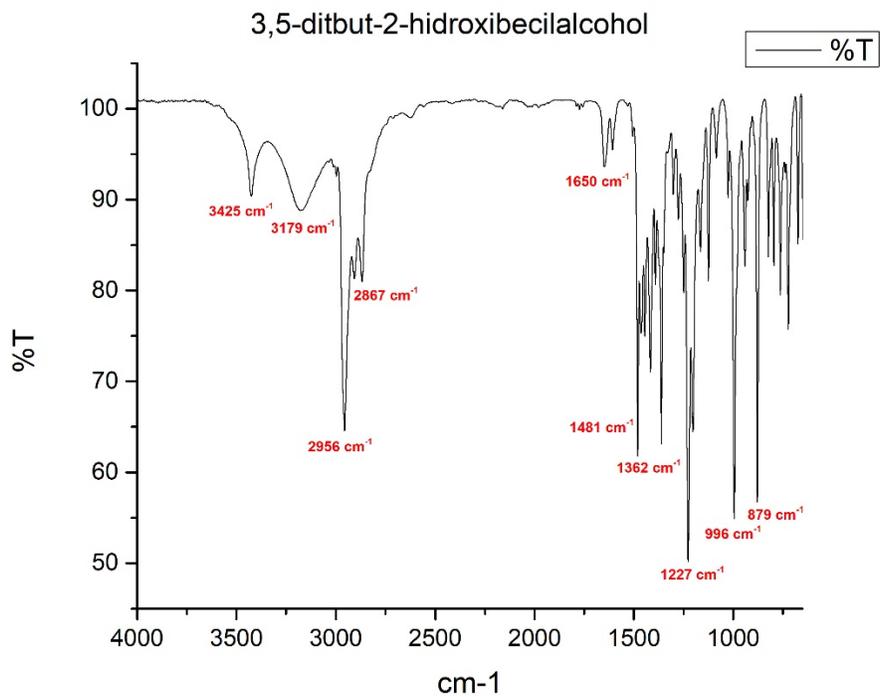
Anexo 4. Del lado izq. tenemos lignocelulosa sin tratamiento químico y del lado der. lignocelulosa con un tratamiento del 15% H_2O_2 m/v ambos con 800x de magnificación.



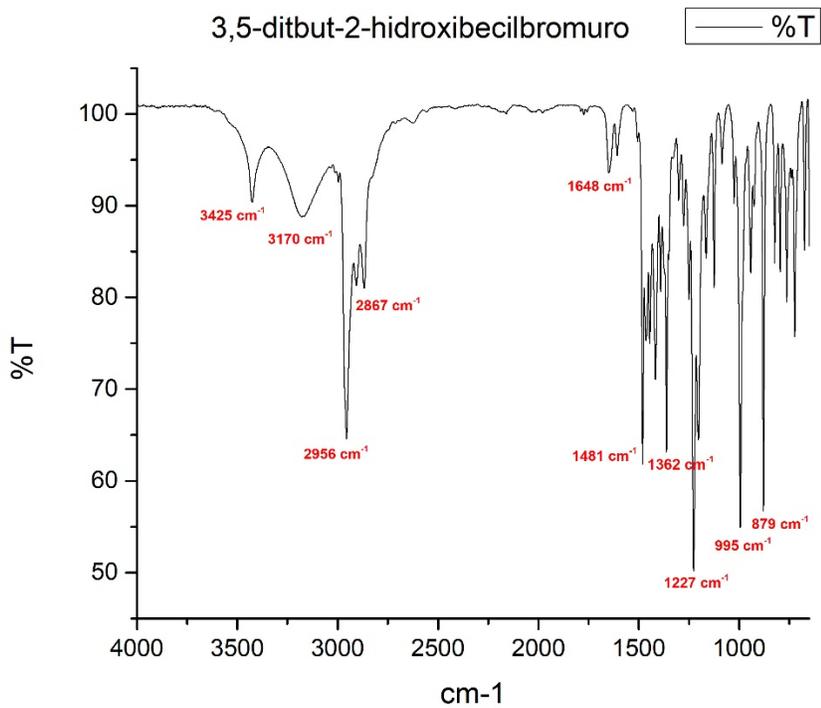
Anexo 5. Espectro IR del sustrato de quitina antes y después del tratamiento oxidativo.



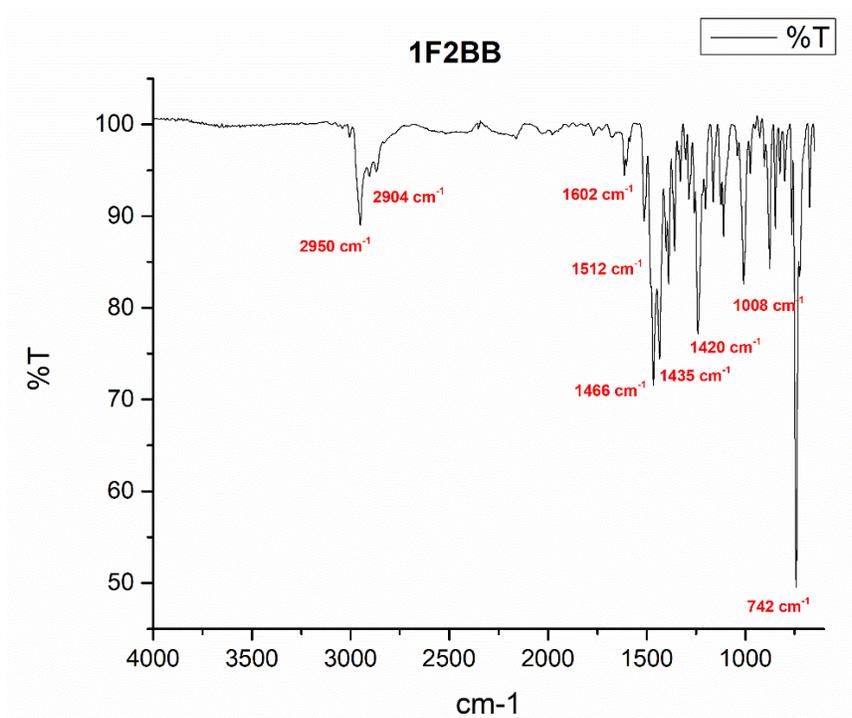
Anexo 6. Espectro IR del sustrato de lignocelulosa antes y después del tratamiento oxidativo.



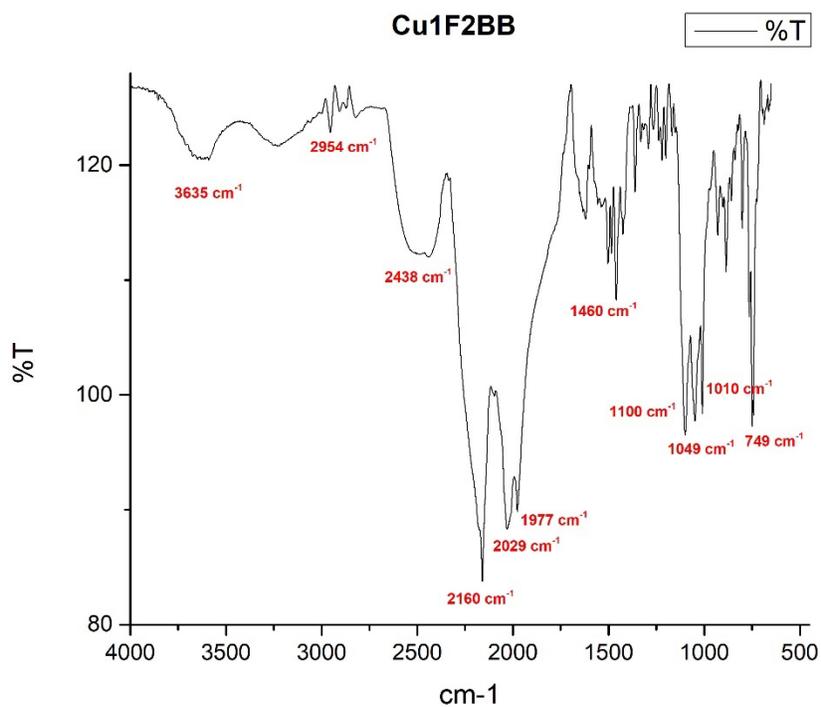
Anexo 7 Espectro ATR-IR de 3,5-di-terbutil-2-hidroxibencilfenol.



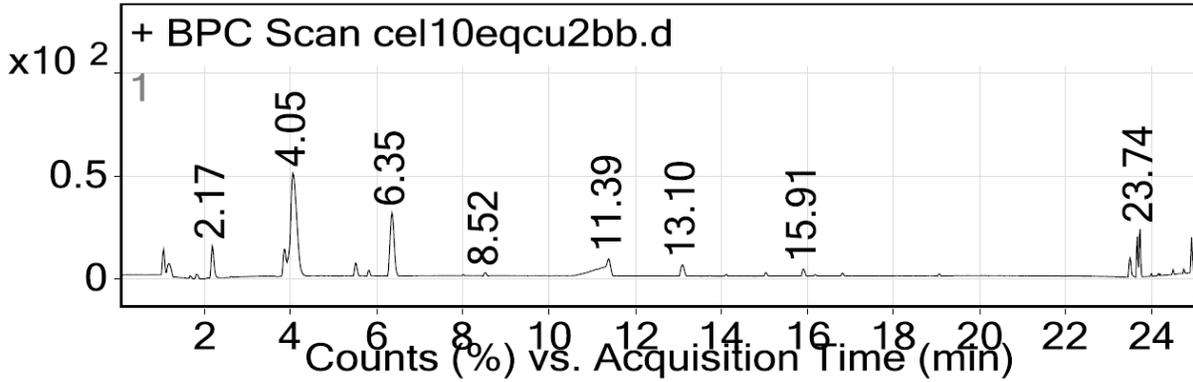
Anexo 8. Espectro ATR-IR de 3,5-di-terbutil-6-hidroxibencilbromuro.



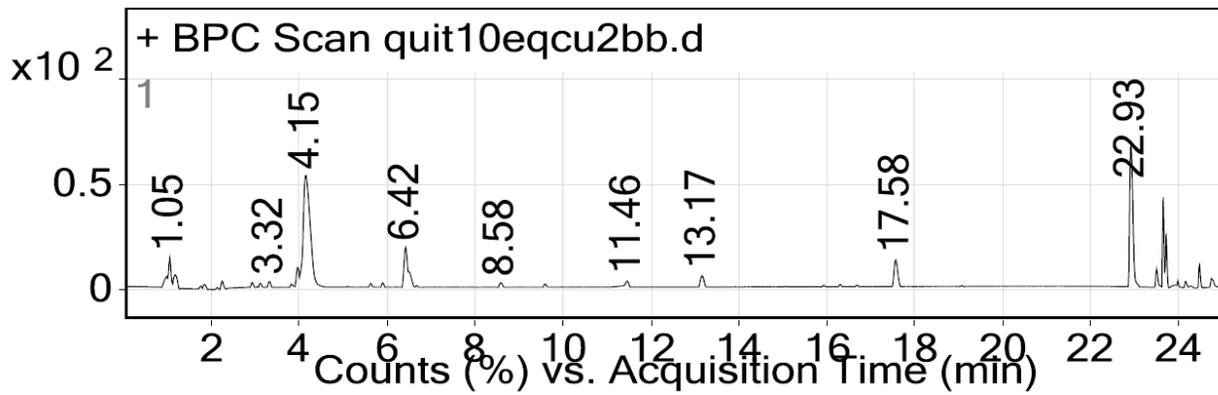
Anexo 9. Espectro ATR-IR de 1F2BB.



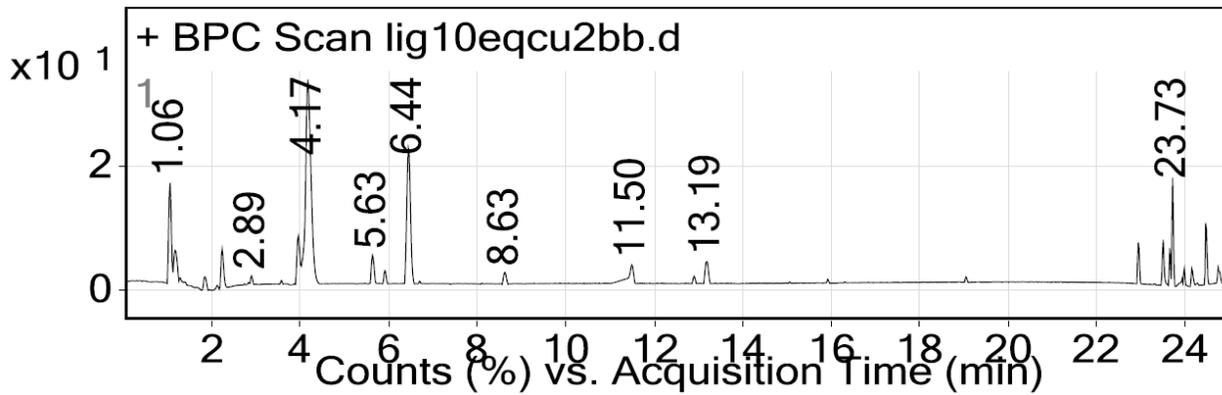
Anexo 10. Espectro ATR-IR de Cu1F2BB.



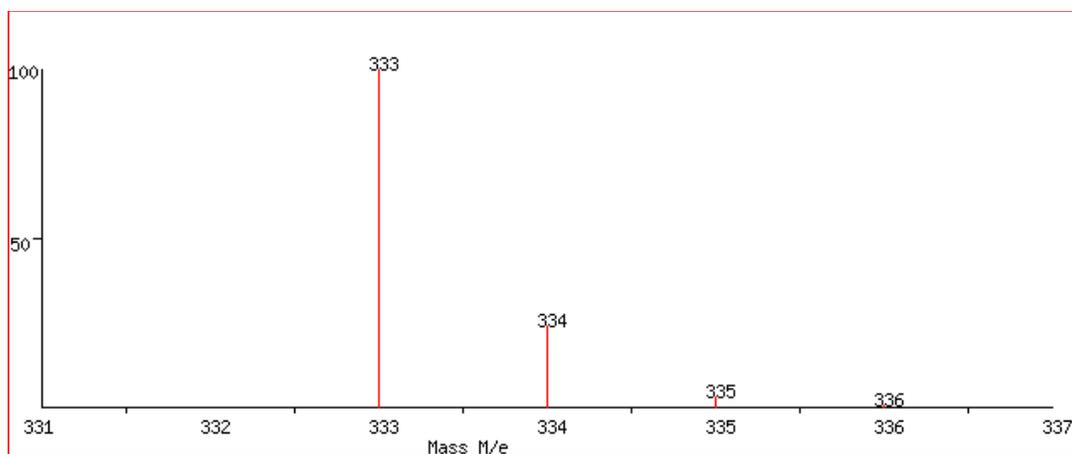
Anexo 11. Cromatograma de una muestra de degradación de celulosa a 10 Eq de H₂O₂.



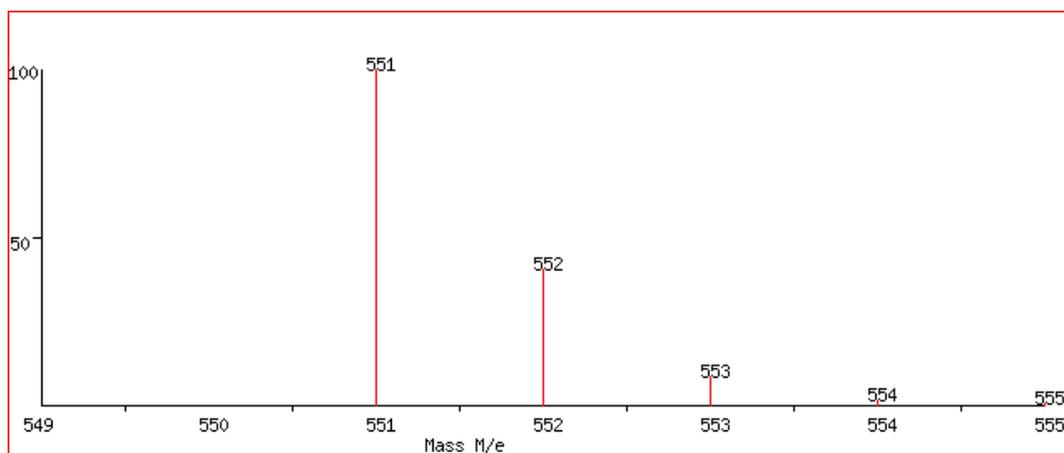
Anexo 12. Cromatograma de una muestra de degradación de quitina a 10 Eq de H₂O₂.



Anexo 13. Cromatograma de una muestra de degradación de lignocelulosa a 10 Eq de H₂O₂.



Anexo 14. Cálculo de la distribución isotópica del ligante 2BB



Anexo 15. Cálculo de la distribución isotópica del ligante 1F2BB

Referencias

- (1) Swiegers, G. F.; Chen, J. y Wagner, P. en *Bioinspiration and Biomimicry in Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: 2012; cap. 7, pp. 165-208.
- (2) Smith, M. B. en *Biochemistry an Organic Chemistry Approach*; CRC: 2020; cap. 7, pp. 147-192.
- (3) Kopacz, M. M.; Rovida, S.; van Duijn, E.; Fraaije, M. W. y Mattevi, A. *Biochemistry* **2011**, *50*, 4209-4217.
- (4) Kettle, S. en *Physical Inorganic Chemistry A: Coordination Chemistry Approach*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH: 1996; cap. 16, pp. 381-406.
- (5) Gagrani, A. y Tsuzuki, T. *Chem Eng Sci* **2019**, *194*, 116-126.
- (6) Crichton, R. R. y Pierre, J. *BioMetals* **2001**, *14*, 99-112.
- (7) Blakeley, R. L. y Zerner, B. *J. Mol. Catal.* **1984**, *23*, 263-292.
- (8) Lindahl, P. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 516-524.
- (9) Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A. y Getzoff, E. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038-8047.
- (10) Griffith, J. y Orgel, L. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1957**, *11*, 381-393.
- (11) Veidis, M.; Schreiber, G.; Gough, T. y Palenik, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1859-1860.
- (12) Rodgers, G. E., *Descriptive inorganic, coordination, and solid state chemistry*; Cengage Learning: 2011.
- (13) Rubino, J. T. y Franz, K. J. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *107*, 129-143.
- (14) Szilagyi, R. K. y Solomon, E. I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 250-258.
- (15) Raguz, S.; Yaguea, E.; Wood, D. y Thurston, C. *Gene* **1992**, *119*, 183-190.
- (16) Armesilla, A. L.; Thurston, C. F. y Yagüe, E. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *116*, 293-299.
- (17) Karkehabadi, S.; Hansson, H.; Kim, S.; Piens, K.; Mitchinson, C. y Sandgren, M. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 144-154.
- (18) Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Horn, S. J.; Liu, Z.; Zhai, H.; Sørli, M. y Eijsink, V. G. H. *Science* **2010**, *330*, 219-222.
- (19) Quinlan, R. J.; Sweeney, M. D.; Leggio, L. L.; Otten, H.; Poulsen, J.-C. N.; Johansen, K. S.; Krogh, K. B.; Jørgensen, C. I.; Tovborg, M.; Anthonsen, A. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 15079-15084.
- (20) Phillips, C. M.; Beeson IV, W. T.; Cate, J. H. y Marletta, M. A. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1399-1406.
- (21) Beeson, W. T.; Vu, V. V.; Span, E. A.; Phillips, C. M. y Marletta, M. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 923-946.
- (22) Li, X.; Beeson IV, W. T.; Phillips, C. M.; Marletta, M. A. y Cate, J. H. *Structure* **2012**, *20*, 1051-1061.
- (23) Book, A. J.; Yennamalli, R. M.; Takasuka, T. E.; Currie, C. R.; Phillips, G. N. y Fox, B. G. *Biotechnol Biofuels* **2014**, *7*, 109.

- (24) Persson, I.; Persson, P.; Sandström, M. y Ullström, A.-S. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 1256-1265.
- (25) Kjaergaard, C. H.; Qayyum, M. F.; Wong, S. D.; Xu, F.; Hemsworth, G.R.; Walton, D. J.; Young, N. A.; Davies, G. J.; Walton, P. H.; Johansen, K. S. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 8797-8802.
- (26) Wu, M.; Beckham, G. T.; Larsson, A. M.; Ishida, T.; Kim, S.; Payne, C. M.; Himmel, M. E.; Crowley, M. F.; Horn, S. J.; Westereng, B. et al. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12828-12839.
- (27) Kaim, W. y Schwederski, B. *Coord Chem Rev* **2010**, *254*, 1580-1588.
- (28) Rittle, J. y Green, M. T. *Science* **2010**, *330*, 933-937.
- (29) Whittaker, M. M. y Whittaker, J. W. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6074-6080.
- (30) Breslmayr, E.; Laurent, C. V.; Scheiblbrandner, S.; Jerkovic, A.; Heyes, D. J.; Oostenbrink, C.; Ludwig, R.; Hedison, T. M.; Scrutton, N. S. y Kracher, D. *ACS Catal* **2020**, *10*, 4842-4853.
- (31) Span, E. A.; Suess, D. L.; Deller, M. C.; Britt, R. D. y Marletta, M. A. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1095-1103.
- (32) Ngo, S. T.; Phan, H. N.; Le, C. N.; Ngo, N. C.; Vu, K. B.; Tung, N. T.; Luu, C. X. y Vu, V. V. *J Phys Chem B* **2020**, *124*, 1859-1865.
- (33) Hemsworth, G. R.; Davies, G. J. y Walton, P. H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 660-668.
- (34) Hemsworth, G. R.; Henrissat, B.; Davies, G. J. y Walton, P. H. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 122-126.
- (35) Petrović, D. M.; Bissaro, B.; Chylenski, P.; Skaugen, M.; Sørli, M.; Jensen, M. S.; Aachmann, F. L.; Courtade, G.; Várnai, A. y Eijsink, V. G. *Protein Sci* **2018**, *27*, 1636-1650.
- (36) Nishiyama, Y.; Langan, P. y Chanzy, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9074-9082.
- (37) Neira Desalvador, A. C. Complejos de Cobre con Ligantes Derivados Del Bencimidazol, Inspirados En El Sitio Activo De Las Enzimas LPMO, Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 2019, p. 133.
- (38) Kim, S.; Ståhlberg, J.; Sandgren, M.; Paton, R. S. y Beckham, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 149-154.
- (39) Fujii, T.; Naito, A.; Yamaguchi, S.; Wada, A.; Funahashi, Y.; Jitsukawa, K.; Nagatomo, S.; Kitagawa, T. y Masuda, H. *Chem. Commun.* **2003**, 2700-2701.
- (40) Gagnon, N. y Tolman, W. B. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2126-2131.
- (41) Bertini, L.; Breglia, R.; Lambrugh, M.; Fantucci, P.; De Gioia, L.; Borsari, M.; Sola, M.; Bortolotti, C. A. y Bruschi, M. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 86-97.
- (42) Hedegård, E. D. y Ryde, U. *Chem Sci* **2018**, *9*, 3866-3880.
- (43) Wang, B.; Johnston, E. M.; Li, P.; Shaik, S.; Davies, G. J.; Walton, P. H. y Rovira, C. *ACS Catal* **2018**, *8*, 1346-1351.
- (44) Bissaro, B.; Streit, B.; Isaksen, I.; Eijsink, V. G.; Beckham, G. T.; DuBois, J. L. y Røhr, Å. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 1504-1513.
- (45) Walton, P. H. y Davies, G. J. *Curr Opin Chem Biol* **2016**, *31*, 195-207.
- (46) Bissaro, B.; Røhr, Å. K.; Müller, G.; Chylenski, P.; Skaugen, M.; Forsberg, Z.; Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G. y Eijsink, V. G. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 1123.

- (47) Paradisi, A.; Johnston, E. M.; Tovborg, M.; Nicoll, C. R.; Ciano, L.; Dowle, A.; McMaster, J.; Hancock, Y.; Davies, G. J. y Walton, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 18585-18599.
- (48) Singh, R. K.; Blossom, B. M.; Russo, D. A.; Singh, R.; Weihe, H.; Andersen, N. H.; Tiwari, M. K.; Jensen, P. E.; Felby, C. y Bjerrum, M. J. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 454-463.
- (49) Jones, S. M.; Transue, W. J.; Meier, K. K.; Kelemen, B. y Solomon, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 2-8.
- (50) McEvoy, A.; Creutzberg, J.; Singh, R. K.; Bjerrum, M. J.; Hedegård, E. D. The Role of the Active Site Tyrosine in the Mechanism of Lytic Polysaccharide Monooxygenase. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 352-362
- (51) Gray, H. B. y Winkler, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 10920-10925.
- (52) Rittle, J. y Green, M. T. *Science* **2010**, *330*, 933-937.
- (53) Verma, P.; Pratt, R. C.; Storr, T.; Wasinger, E. C. y Stack, T. D. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 18600-18605.
- (54) Lenk, F.; Bröring, S.; Herzog, P. y Leker, J. *Biotechnol. J.* **2007**, *2*, 1497-1504.
- (55) Sheldon, R. A.; Arends, I. W. C. E. y Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*; Wiley: 2007, pp. 1-433.
- (56) Lange, J.-P. *Biofpr* **2007**, *1*, 39-48.
- (57) Perlack, R. D., *Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply*; Oak Ridge National Laboratory: 2005.
- (58) Perlack, R. D.; Eaton, L. M.; Turhollow Jr, A. F.; Langholtz, M. H.; Brandt, C. C.; Downing, M. E.; Graham, R. L.; Wright, L. L.; Kavkewitz, J. M.; Shamey, A. M. y col. **2011**.
- (59) Johansen, K. S. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 143-149.
- (60) Sedai, B.; Diaz-Urrutia, C.; Baker, R. T.; Wu, R.; Silks, L. y Hanson, S. K. *ACS Catal* **2011**, *1*, 794-804.
- (61) Dai, J.; Nanayakkara, S.; Lamb, T. C.; Clark, A. J.; Guo, S. X.; Zhang, J.; Patti, A. F. y Saito, K. *New J Chem* **2016**, *40*, 3511-3519.
- (62) Striegler, S.; Dunaway, N. A.; Gichinga, M. G.; Barnett, J. D. y Nelson, A. G. D. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2639-2648.
- (63) McClelland, D. J.; Galebach, P. H.; Motagamwala, A. H.; Wittrig, A. M.; Karlen, S. D.; Buchanan, J. S.; Dumesic, J. A. y Huber, G. W. *Green Chem* **2019**, *21*, 2988-3005.
- (64) Hoover, J. M.; Ryland, B. L. y Stahl, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2357-2367.
- (65) Ryland, B. L.; McCann, S. D.; Brunold, T. C. y Stahl, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12166-12173.
- (66) Castillo, I.; Neira, A. C.; Nordlander, E. y Zeglio, E. *Inorganica Chim Acta* **2014**, *422*, 152-157.
- (67) Neira, A. C.; Martínez-Alanis, P. R.; Aullón, G.; Flores-Alamo, M.; Zerón, P.; Company, A.; Chen, J.; Kasper, J. B.; Browne, W. R.; Nordlander, E. y Castillo, I. *ACS Omega* **2019**, *4*, 10729-10740.

- (68) Hemsworth, G. R.; Taylor, E. J.; Kim, R. Q.; Gregory, R. C.; Lewis, S. J.; Turkenburg, J. P.; Parkin, A.; Davies, G. J. y Walton, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6069-6077.
- (69) Concia, A. L.; Beccia, M. R.; Orio, M.; Ferre, F. T.; Scarpellini, M.; Biaso, F.; Guigliarelli, B.; Réglie, M. y Simaan, A. *J. Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 1023-1026.
- (70) Kim, S.; Ginsbach, J. W.; Lee, J. Y.; Peterson, R. L.; Liu, J. J.; Siegler, M. A.; Sarjeant, A. A.; Solomon, E. I. y Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2867-2874.
- (71) Muthuramalingam, S.; Maheshwaran, D.; Velusamy, M. y Mayilmurugan, R. *J. Catal.* **2019**, *372*, 352-361.
- (72) Fukatsu, A.; Morimoto, Y.; Sugimoto, H. e Itoh, S. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5123-5126.
- (73) Yu, Z.; Thompson, Z.; Behnke, S. L.; Fenk, K. D.; Huang, D.; Shafaat, H.S. y Cowan, J. A. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 11218-11222.
- (74) Tse, E. C.; Schilter, D.; Gray, D. L.; Rauchfuss, T. B. y Gewirth, A. A. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 8505-8516.
- (75) Wallington, T. J.; Srinivasan, J.; Nielsen, O. J. e Highwood, E. J. *Environ Ecol Chem* **2009**, *1*, 36.
- (76) Serrano-Ruiz, J. C. y Dumesic, J. A. *Energy Environ Sci* **2011**, *4*, 83-99.
- (77) Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K. y Dalai, A. K. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 578-597.
- (78) Casella, L.; Monzani, E.; Gullotti, M.; Gliubich, F. y De Gioia, L. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 3203-3210.
- (79) Armarego, W. L., *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth-Heinemann: 2017.
- (80) Sokolowski, A.; Müller, J.; Weyhermüller, T.; Schnepf, R.; Hildebrandt, P.; Hildenbrand, K.; Bothe, E.; Wieghardt, K. Phenoxyl Radical Complexes of Zinc(II). *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8889-8900.
- (81) Striegler, S.; Barnett, J. D.; Dunaway, N. A. Glycoside Hydrolysis with Sugar-Templated Microgel Catalysts. *ACS Catal.* **2012**, *2*, 50-55.
- (82) Gilbert, B. C.; Harrington, G.; Scrivens, G.; Silvester, S. EPR Studies of Fenton-Type Reactions in Copper- Peroxide Systems. *Free Radicals Biol. Environ.* **1997**, 49-62.
- (83) Carvalho, S. S. F.; Rodrigues, A. C. C.; Lima, J. F.; Carvalho, N. M. F. Photocatalytic Degradation of Dyes by Mononuclear Copper(II) Complexes from Bis-(2-Pyridylmethyl)Amine NNN-Derivative Ligands. *Inorg. Chim. Acta* **2020**, *512*, 119924.
- (84) Westereng, B.; Arntzen, M. T.; Aachmann, F. L.; Várnai, A.; Eijsink, V. G. H.; Agger, J. W. Simultaneous Analysis of C1 and C4 Oxidized Oligosaccharides, the Products of Lytic Polysaccharide Monooxygenases Acting on Cellulose. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1445*, 46-54.
- (85) Sun, P.; Frommhagen, M.; Kleine Haar, M.; van Erven, G.; Bakx, E. J.; van Berkel, W. J. H.; Kabel, M. A. Mass Spectrometric Fragmentation Patterns Discriminate C1- and C4-Oxidised Cello-Oligosaccharides from Their Non-Oxidised and Reduced Forms. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *234*, 115917.