



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**COMPLEJOS DE COBRE(II) CON LIGANTES DERIVADOS DEL
IMIDAZOL CON ACTIVIDAD CATECOLASA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MARÍA ROSA MENDOZA QUIJANO



TUTORA: Dra. Laura María Gasque Silva

AÑO: 2010



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la institución que me ha formado tanto académicamente como personalmente, y de la cual me siento orgullosa de formar parte.

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios del programa de Maestría y por el apoyo otorgado al proyecto 54717, gracias al cual se realizó esta investigación.

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

A la Dra. Laura Gasque Silva por ser más que una tutora, por todo el apoyo y las enseñanzas en todos los aspectos y sobre todo el cariño brindado.

Al Dr. Gerardo Ferrer Sueta con gran cariño en Montevideo, por el enorme apoyo y su valiosa colaboración para la realización de este proyecto.

Al Dr. Víctor Ugalde Saldívar de la UNAM y al Dr. Alberto Rojas Hernández de la UAM por asesorar en gran parte a este trabajo.

Al personal de la USAI por los análisis realizados y la ayuda brindada.

Lugar donde se realizó el trabajo:

Laboratorio 216, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear
División de estudios de Posgrado, Edificio B.
Facultad de Química, UNAM.

Parte de este trabajo se presentó en el Congreso Mexicano de Química:

“Complejos dinucleares de cobre (II) con ligantes derivados del imidazol”. Ma. Rosa Mendoza Quijano, Víctor Manuel Ugalde, Laura Gasque Silva. XLIV Congreso Mexicano de Química. Puebla, Pue., México. 26 al 30 de septiembre, 2009.

A mis padres Rosa María y José Luis
A mis hermanos José Luis y Juan Pablo
A mis amigos

Índice

Índice	i
Abreviaturas	iii
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	3
1.1. Metaloenzimas de cobre	3
1.2. Catecol oxidasa	5
1.3. Sistemas modelo	7
1.4. Compuestos dinucleares de cobre(II) con ligantes derivados del imidazol	14
1.4.1. Ligantes dinucleantes	14
1.4.2. Complejos dinucleares de cobre(II)	16
1.4.3. Evaluación de la actividad catecolasa	19
Capítulo 2. Objetivos e Hipótesis	23
Capítulo 3. Resultados y discusión	25
3.1. Síntesis y caracterización de los ligantes <i>diep</i> y <i>dmpa</i>	25
3.2. Síntesis y caracterización de los complejos Cu ₂ L	34
3.3. Especiación en disolución de los sistemas L/Cu ₂ L	50
3.4. Estudios cinéticos y mecanísticos de los complejos [Cu ₂ L] ⁴⁺	62
3.4.1. Evaluación de la actividad catecolasa	63
3.4.2. Interacción de los complejos [Cu ₂ L] ⁴⁺ con H ₂ DTBC en ausencia de O ₂	77
3.4.3. Detección de H ₂ O ₂ en la oxidación catalítica de H ₂ DTBC	83
3.4.4. Mecanismo catalítico	86
Capítulo 4. Conclusiones	89
Capítulo 5. Parte experimental	93
5.1. Reactivos y equipo	93
5.2. Síntesis	95

5.2.1. Síntesis de los ligantes <i>diep</i> y <i>dmpa</i>	95
5.2.2. Síntesis de los complejos dinucleares de cobre(II)	96
5.3. Difracción de rayos X	98
5.4. Especiación en disolución de los sistemas L/Cu ₂ L	99
5.5. Estudios cinéticos y mecanísticos de los complejos [Cu ₂ L] ⁴⁺	104
5.5.1. Evaluación de la actividad catecolasa	104
5.5.2. Interacción de los complejos [Cu ₂ L] ⁴⁺ con H ₂ DTBC en ausencia de O ₂	107
5.5.3. Detección de H ₂ O ₂ en la oxidación catalítica de H ₂ DTBC	109
Capítulo 6. Referencias	111

Abreviaturas

<i>diep</i>	2,8-dimetil-5,11-di-(2-etilpiridina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]-imidazo[4,5-c][1,6] diazecina
<i>dmpa</i>	2,8-dimetil-5,11-di-(dimetilpropilendiamina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]imidazo[4,5-c][1,6]diazecina
<i>dimp</i>	2,8-dimetil-5,11-di-(2-metilpiridina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]-imidazo[4,5-c][1,6] diazecina
<i>dimeim</i>	2,8-dimetil-5,11-di-(dimetiletilendiamina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]imidazo[4,5-c][1,6]diazecina
L	Ligante
Cu ₂ L	Complejo dinuclear de cobre(II) del ligante L
COx	Catecol oxidasa
<i>met</i>	Estado nativo de la catecol oxidasa Cu(II)Cu(II)
<i>desoxy</i>	Forma reducida de la catecol oxidasa Cu(I)Cu(I)
<i>oxy</i>	Estado oxidado de la catecol oxidasa con un grupo peroxo puente (Cu(II)O ₂ ²⁻ Cu(II))
H ₂ DTBC	3,5-di- <i>ter</i> -butilcatecol
DTBQ	3,5-di- <i>ter</i> -butil- <i>o</i> -benzoquinona
HDTBSQ	3,5-di- <i>ter</i> -butil-semiquinona
TCC	Tetraclorocatecol
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfónico])
TRIS	Tris(hydroximetil)-aminometano
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluorescina o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceina
HRP	Peroxidasa de rábano
TCLM	Transferencia de carga ligante-metal

ϵ_0	Absortividad molar
v_0	Velocidad inicial
K_M	Constante de Michaelis-Menten
V_{\max}	Velocidad máxima
k_{cat}	Constante catalítica o número de recambio
IR/ATR	Espectroscopía de infrarrojo por reflectancia de transmitancia atenuada

Introducción

En las últimas décadas el desarrollo de la química bioinorgánica, cuyo estudio se centra en la interacción de iones metálicos en procesos biológicos [1,2], ha permitido el mejor entendimiento de sistemas macromoleculares como lo son las metaloenzimas. Estos sistemas son de gran interés debido a su alta especificidad y poder catalítico, pero de difícil estudio pues su obtención y manipulación resulta complicada [1,3]. Debido a esto, en los últimos años ha crecido el interés en el estudio de compuestos de coordinación de bajos pesos moleculares que imiten funcional y estructuralmente, a nivel local, los sitios activos de estas enzimas y permitan un mejor acercamiento a la química de dichos sistemas macromoleculares [2,4,5].

Específicamente, las metaloenzimas de cobre y sus correspondientes complejos biomiméticos, han sido los sistemas de mayor interés y estudio en esta área debido a la importancia y la gran cantidad de procesos biológicos en los que están involucradas estas enzimas; entre los cuales se destaca la activación de O_2 y su procesamiento [6]. Este proceso juega un papel esencial en sistemas biológicos [7-10], y en la química medicinal [11], ambiental [12] e industrial [13].

La catecol oxidasa (COx) es una enzima de cobre cuyo sitio activo está conformado en el estado nativo por dos iones metálicos cercanos entre sí, coordinados cada uno a tres átomos de nitrógeno provenientes de residuos imidazólicos de histidinas y puenteados por un ion OH [14]. Esta enzima cataliza la conversión de una gran variedad de orto-difenoles (catecoles) a sus respectivas o-quinonas en un proceso conocido como actividad catecolasa [15], a través de la reducción de oxígeno molecular a agua mediante un mecanismo de 4 electrones [5,15].

En los últimos años, se ha estudiado la actividad catecolasa de una gran variedad de complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II) con características estructurales más o menos similares a las de este sitio activo, mediante la reacción modelo de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol (H_2DTBC) a la quinona correspondiente. Basándose en dichos estudios, la gran mayoría de autores propone la dependencia de una actividad catalítica significativa en la proximidad de los átomos de cobre(II) [16-21], siendo ésta mayor con una distancia Cu-Cu similar a la observada en la enzima.

No obstante, se han descrito sistemas modelo con actividad catecolasa cuya distancia Cu-Cu es significativamente mayor a la de la metaloenzima COx [22,23]. Aunado a esto, en el grupo de trabajo se han sintetizado mediante la reacción de Mannich, una serie de ligantes derivados del imidazol cuyos complejos dinucleares presentan distancias Cu-Cu mayores a 7 Å y una actividad catalítica importante [24,25]. Sin embargo el mecanismo por el cual actúan estos sistemas aún no se conoce, pero se cree que debe ser muy distinto al propuesto para la enzima.

A pesar de la gran cantidad de reportes en sistemas modelo de la catecol oxidasa, la cantidad de estudios mecanísticos detallados es mínima, siendo ésta un área poco explorada y con diferencias marcadas de compuesto a compuesto. Dentro de estas diferencias se pueden resaltar (i) los

modos de coordinación del sustrato a los centros metálicos y (ii) el modo de reducción del O_2 ya sea a H_2O o H_2O_2 .

De acuerdo a Reedijk y colaboradores [26] el estudio mecanístico de los sistemas modelo se ha abordado con cuatro enfoques distintos: estudio de la unión del sustrato, la relación estructura actividad, estudios cinéticos y oxidación estequiométrica del catecol por complejos peroxo- y oxodinucleares de cobre. Sin embargo, el segundo enfoque ha sido el más empleado por diversos grupos de trabajo; bajo el cual, se ha explorado la relación entre la actividad catecolasa y diversos factores como la distancia metal-metal, propiedades electroquímicas, ligantes exógenos, estructura del ligante, pH y disolvente.

Así, nuestro grupo de trabajo también ha orientado los estudios catalíticos de diversos sistemas modelo a encontrar una correlación de la actividad catalítica y los distintos factores estructurales de los complejos. Dentro de esto, se han publicado estudios catalíticos comparativos de ligantes imidazolados análogos en los que se modifica la naturaleza de los átomos donadores y se evalúa la dependencia de la eficiencia de estos sistemas con las condiciones del medio catalítico como el pH y el disolvente [25].

Bajo esta misma línea, este trabajo presenta dos nuevos complejos de cobre(II) formados con dos ligantes semejantes a los estudiados previamente, pero con variaciones estructurales específicas, para estudiar las diferencias en su actividad catalítica y lograr conocer los factores que la rigen. Los ligantes *diep* y *dmpa* son análogos a sendos sistemas previamente estudiados [24,25], en los que la cadena lateral se ha alargado en un átomo de carbono, lo que genera anillos quelatos de 6 miembros, a diferencia de los anillos quelatos de 5 miembros a los que daban lugar los anteriores. Como durante el ciclo catalítico, el cobre cambia de estado de oxidación (II) a (I), con el consecuente cambio en su geometría, se pretende estudiar cómo las mencionadas modificaciones estructurales introducidas en estos nuevos ligantes afectarán la actividad catalítica de los complejos. Adicionalmente se intentan explorar nuevos enfoques, con la finalidad de comprender mejor el mecanismo por el cual actúan estos complejos dinucleares de Cu(II) con metales distantes en la reacción de oxidación del H_2DTBC .

Por esto se presentan a continuación estudios estructurales, de equilibrio y catalíticos en disolución; además de estudios de la unión del sustrato e identificación de productos de reacción como herramientas en aras de obtener información suficiente para proponer un mecanismo catalítico congruente para estos complejos.

1. Antecedentes

1.1. Metaloenzimas de cobre

El cobre es uno de los 25 elementos que se consideran esenciales para la vida, encontrándose en el intervalo de concentración de las partes por millón en los organismos [7]. Las metaloenzimas de cobre juegan roles importantes en la naturaleza ya que son catalizadores redox de una gran variedad de procesos biológicos, entre los que se encuentran el transporte y/o activación de oxígeno, transferencia electrónica, reducción de óxidos de nitrógeno y la dismutación de superóxidos [2,7,27,28].

Estas enzimas se pueden clasificar en siete tipos de acuerdo a las características y propiedades de su sitio activo [2,5,7,29,30].

Tipo I. Usualmente nombradas como proteínas azules de cobre debido a la gran intensidad del color azul que presentan en su estado oxidado. Esto a causa de una fuerte transferencia de carga ligante-metal del enlace Cu^{2+} -S (cisteína), observable en el espectro visible alrededor de 600 nm. La esfera de coordinación alrededor del centro metálico está constituida por dos átomos de nitrógeno donadores provenientes de residuos de histidinas, un átomo de azufre de residuo de cisteína y un átomo de azufre débilmente coordinado proveniente, en la mayoría de los casos, de residuo de metionina. La geometría alrededor de los centros de cobre es tetraédrica distorsionada. (Figura 1.1.1 a). Grandes representantes de este grupo de enzimas son la plastocianina, amicianina y azurina, las cuales participan como proteínas móviles acarreadoras de electrones.

Tipo II. Conocidas también como proteínas “normales” de cobre debido a que tanto su espectro de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE), como su espectro electrónico es similar al de complejos tetragonales comunes de Cu(II) con ligantes donadores de N, O. Estas enzimas presentan un color azul de baja intensidad debido en este caso a las transiciones d-d de los iones Cu^{2+} . Los centros metálicos están coordinados a cuatro átomos donadores de nitrógeno u oxígeno que conforman una geometría cuadrada o tetraédrica distorsionada.

Las proteínas de esta categoría están involucradas en reacciones de catálisis como la oxidación de alcoholes primarios y la dismutación del anión superóxido. Algunos ejemplos de éstas son la galactosa oxidasa, superóxido dismutasa y la dopamina- β -hidroxilasa. (Figura 1.1.1 b)

Tipo III. Esta clase es de los sitios más estudiados por la importancia de las funciones que desempeñan, entre las que se destacan la capacidad de fijar O_2 reversiblemente o emplearlo en

reacciones de oxidación bajo condiciones ambientales. Se caracterizan por poseer dos iones Cu^{2+} cercanos entre sí (alrededor de 3 Å) y acoplados antiferromagnéticamente, lo que conduce a un comportamiento silencioso en RPE. Cada centro metálico está coordinado a tres átomos donadores de nitrógeno provenientes de residuos de histidinas. (Figura 1.1.1 c)

Este grupo está representado por tres proteínas, la hemocianina que es responsable del transporte de oxígeno en algunos moluscos y artrópodos; la tirosinasa y la catecol oxidasa que son capaces de fijar oxígeno para oxidar sustratos fenólicos a catecoles (tirosinasa) y subsecuentemente a o-quinonas (tirosinasa y catecol oxidasa).

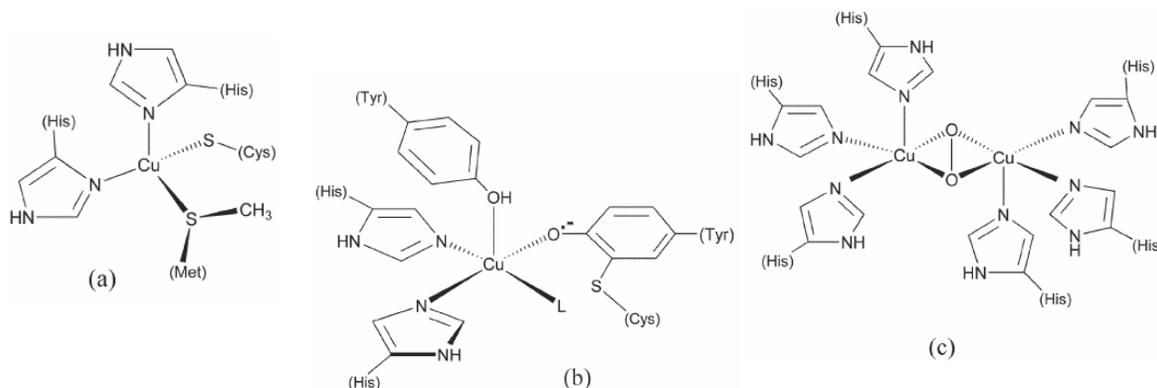


Figura 1.1.1. Representaciones esquemáticas de sitios activos de proteínas de cobre: (a) plastocianina (tipo I), (b) galactosa oxidasa (tipo II) y (c) oxihemocianina (tipo III).

Tipo IV. Estos sitios usualmente están compuestos por un sitio activo tipo II y uno tipo III, formando un cúmulo trinuclear triangular. En algunos casos estas proteínas también contienen al menos un sitio activo tipo I. Representantes de este grupo son la ceruloplasmina, lacasa y ascorbato oxidasa.

Sitio Cu_A . A estos sitios también se les conoce como sitios de cobre de valencia mixta ya que están compuestos por cúmulos dinucleares de cobre en el que ambos iones tienen un estado de oxidación formal +1.5. Estos presentan un patrón de siete líneas en el espectro de RPE y tienen una coloración morada. La citocromo c oxidasa y la óxido nítrico reductasa son proteínas características de esta categoría que tienen la función de transferencia electrónica a larga distancia.

Sitio Cu_B . Este sitio activo está formado por un centro de cobre cercano a uno de hierro. Ambos metales están acoplados antiferromagnéticamente y se encuentran puenteados por un átomo de oxígeno. Estos sitios llevan a cabo la reducción de 4 electrones de oxígeno molecular a agua.

Sitio Cu_2 . En estos sitios se encuentran cuatro átomos de cobre coordinados a siete residuos de histidina y un ion OH^- . Presentan un patrón de cuatro líneas en RPE provenientes de dos esquemas distintos de oxidación. Este tipo de sitio se puede encontrar en la óxido nítrico reductasa.

1.2. Catecol oxidasa

Esta enzima con un sitio activo de cobre tipo III cataliza la oxidación de una gran variedad de *o*-difenoles (catecoles) a las *o*-quinonas correspondientes en un proceso conocido como actividad catecolasa [15]. Se encuentra en el tejido de diversas plantas y en crustáceos, en los cuales las *o*-quinonas auto-polimerizan produciendo melanina, un pigmento difenólico color marrón, que protege el tejido contra agentes patógenos e insectos.

En 1937 fue aislada por primera vez [31] y a partir de entonces se ha aislado de diversas frutas y vegetales (manzana, papa, espinaca, entre otras). La estructura cristalina de la catecol oxidasa obtenida de la especie *Ipomoea batata* se reportó en 1998 en tres estados catalíticos: estado nativo *met* (Cu(II)Cu(II)), el estado *desoxy* (Cu(I)Cu(I)) y en un complejo con el inhibidor feniltiourea (PTU) [14]. La estructura cristalina muestra que la enzima es un monómero con un peso molecular de 39 kDa en donde cada ion de cobre se encuentra coordinado a tres residuos de histidina. (Figura 1.2.1)

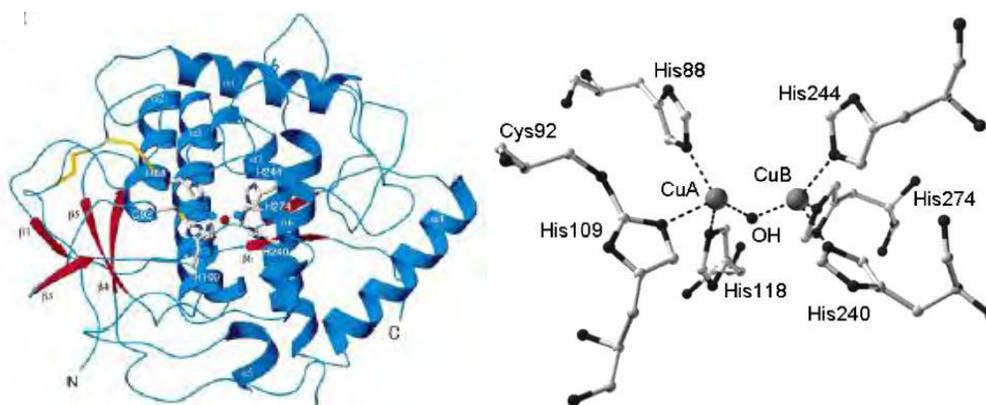


Figura 1.2.1 Izquierda: diagrama Ribbon de la vista frontal de la catecol oxidasa. Derecha: Sitio activo de la catecol oxidasa en el estado *met*. [14].

En el estado nativo *met* (Cu(II)Cu(II)) los centros metálicos se encuentran a 2.9 Å de distancia, puenteados por un ion hidróxido. La esfera de coordinación de cada ion metálico se completa a un número de 4 con los residuos de histidina generando una geometría alrededor de cada uno de pirámide trigonal. El espectro de RPE concuerda con la estructura cristalina ya que revela un acoplamiento fuertemente antiferromagnético entre los iones de cobre.

La distancia entre los iones metálicos aumenta a 4.4 Å en el estado reducido *desoxy* (Cu(I)Cu(I)). Basados en mapas de densidad electrónica residual, se propone que una molécula de agua se encuentra a 2.2 Å de uno de los átomos de cobre, por lo que la geometría alrededor de éste es una pirámide trigonal distorsionada. La esfera de coordinación alrededor del otro sitio metálico se puede describir como un cuadrado con un sitio de coordinación vacante.

El estado *oxy* ($\text{Cu(II)O}_2^{2-}(\text{Cu(II)})$) de la enzima se obtiene al tratar el estado *met* con peróxido de hidrógeno. Esta forma activa presenta un espectro UV-Vis característico para un grupo $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo-dicobre (II)}$ [32] con bandas de absorción en el intervalo de 335-350 nm y alrededor de 580 nm.

Por último, el aducto entre la catecol oxidasa y la feniltiourea muestra la unión de este inhibidor mediante el átomo de azufre coordinado a ambos sitios de cobre(II) reemplazando el puente hidroxilo presente en el estado *met* y aumentando la distancia Cu-Cu a 4.2 Å. El nitrógeno de la amida interactúa débilmente con uno de los iones de cobre(II), completando una geometría de pirámide de base cuadrada. (Figura 1.2.2)

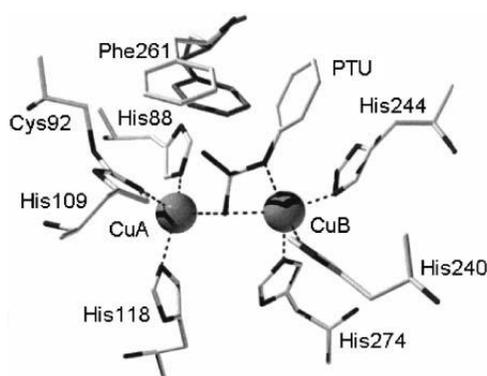


Figura 1.2.2. Estructura cristalina del complejo de la catecol oxidasa con la feniltiourea.

Se han propuesto dos mecanismos enzimáticos basados en datos estructurales, bioquímicos y espectroscópicos [7,33] en los que se oxidan dos moléculas de catecol acompañadas de la reducción de oxígeno molecular a agua.

Ambos mecanismos parten del estado nativo *met* de la catecol oxidasa, en la que el centro dinuclear de cobre(II) reacciona con un equivalente de catecol para producir quinona y el estado reducido Cu(I) *desoxy*. Posteriormente, se enlaza una molécula de O_2 al sitio activo reducido, reoxidando a los centros metálicos y formando un puente peroxo- η^2 entre los átomos de cobre(II). Finalmente se oxida otra molécula de catecol mediante un complejo ternario $\text{COx-O}_2\text{-catecol}$ en el que se transfieren dos electrones del sustrato al peróxido, seguido de la ruptura del enlace O-O, la pérdida de agua y la formación de la segunda molécula de quinona, aunado a la regeneración del estado *met* de la enzima. (Figura 1.2.3)

La principal diferencia entre los dos mecanismos propuestos es el modo de unión del sustrato, que bien puede ser asimétrica monodentada (Krebs y colaboradores [33]) o bidentada (Solomon *et al* [7]).

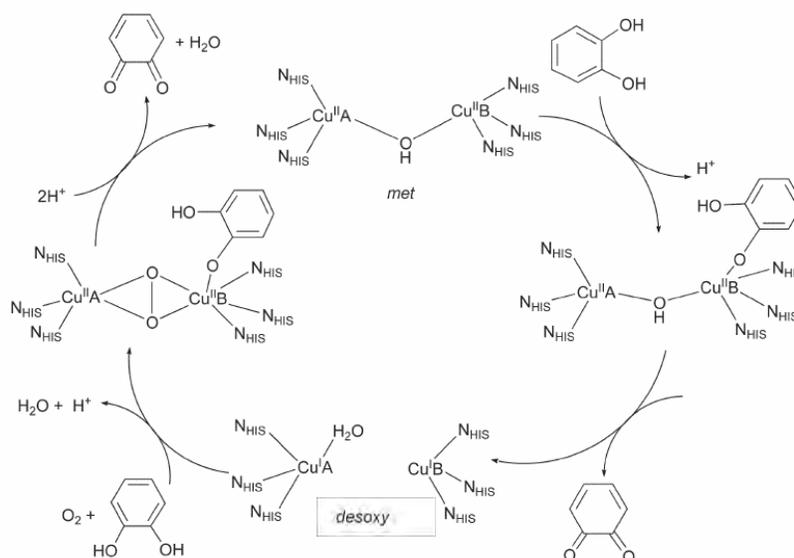


Figura 1.2.3. Ciclo catalítico de la catecol oxidasa propuesto por Krebs y colaboradores [20].

1.3. Sistemas modelo de la catecol oxidasa y estudios mecanísticos

Dada la importancia biológica de la catecol oxidasa y a la vez la dificultad de su obtención y manipulación, muchos grupos de investigación como los de J. Ackermann [17], H. Wei [18], L. Casella [20], G. Speier [22], L. Gasque [25], J. Reedijk [26,35], B. Krebs [33], C. Belle [34] y A. Neves [37] entre otros, han centrado su atención en la elaboración y estudio de complejos de coordinación de bajo peso molecular que simulen el sitio activo de la enzima, con el objetivo de proveer un mejor entendimiento de la función biológica de ésta, así como catalizadores potenciales para la oxidación de sustratos.

Es bien conocido que los complejos de cobre tienen la habilidad de oxidar fenoles a catecoles, por lo que se ha probado la actividad catecolasa de una gran variedad de compuestos mononucleares y polinucleares de Cu(II) frente a la reacción modelo del 3,5-di-*ter*-butilcatecol (H_2DTBC) a la respectiva quinona (DTBQ). De estos sistemas los más estudiados han sido los sistemas dinucleares debido a su similitud con el sitio activo de la enzima, en donde los átomos metálicos se encuentran coordinados a ligandos orgánicos con grupos donadores por nitrógeno generalmente, distancias Cu-Cu cortas ($<4 \text{ \AA}$) y puenteados por átomos de oxígeno provenientes del ligante mismo o de algún ligante inorgánico exógeno. Ejemplos de esto son los complejos descritos por Belle [34], Reedijk [35], Gichinga [36], Neves [37], Selmeçzi [22], Ackermann [17], entre otros. (Figura 1.3.1)

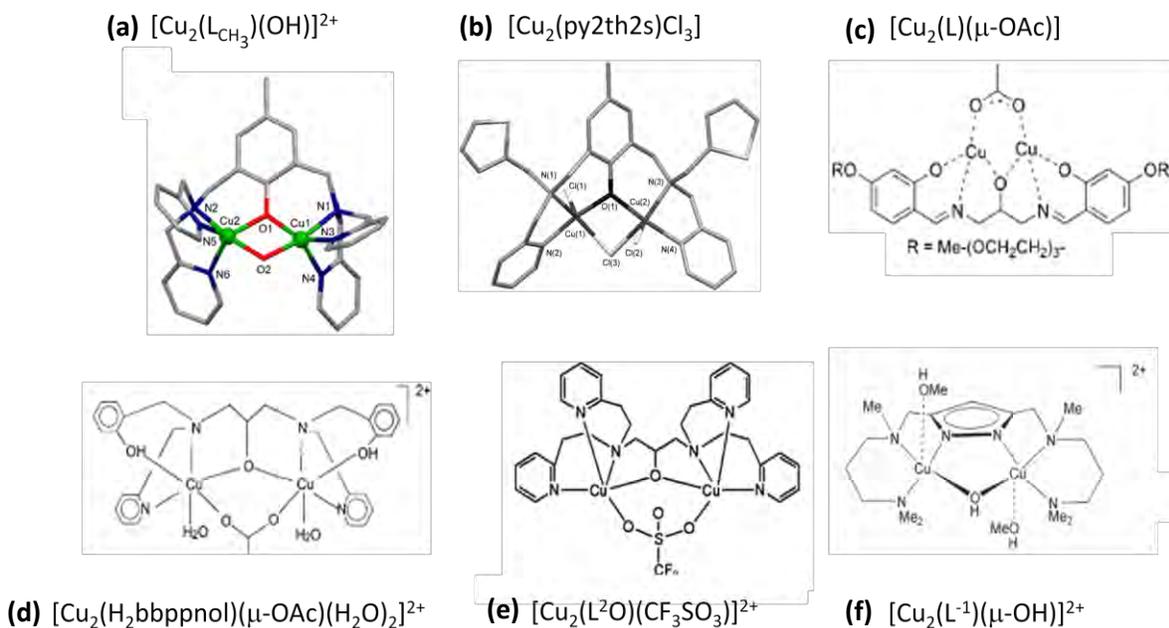


Figura 1.3.1. Complejos dinucleares de cobre(II) empleados como sistemas modelo de la catecol oxidasa. a) Belle [34], b) Reedijk [35], c) Gichinga [36], d) Neves [37], e) Selmezi [22], f) Ackermann[17].

En la búsqueda por entender los factores que influyen en la actividad catalítica de los compuestos modelo, estos mismos investigadores entre otros, han estudiado las propiedades reactivas de complejos con variaciones estructurales, tales como el tipo y la naturaleza de átomos donadores [25,38], el tamaño de anillo quelato [39], la presencia de grupos electroattractores o electrodonadores en el ligante [34] y la distancia Cu-Cu [40]; así también con variaciones de las condiciones de reacción como el pH [21,34,37,41-43], el disolvente [24,25], la temperatura y la concentración de O_2 [43], etc.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios de complejos modelo ([7-10,12-18,21-24]), la cantidad de estudios mecanísticos detallados es mínima y sólo en algunos casos se han tenido pruebas contundentes para proponer mecanismos catalíticos, los cuales varían de compuesto a compuesto y en la gran mayoría de los casos no son comparables, debido a los distintos métodos de estudio entre cada grupo de investigación.

Las principales diferencias de los mecanismos propuestos son: (1) la forma de coordinación del grupo peroxo en el intermediario Cu(II)Cu(II) , (2) el modo de coordinación del sustrato catecol como monodentado o quelato, (3) la producción de H_2O o H_2O_2 como producto de la reducción de O_2 y (4) la formación o ausencia del puente hidroxilo entre los átomos de cobre(II) en la forma *met*. Algunas de estas diferencias han sido englobadas por Casella y colaboradores [20] en un solo esquema que muestra las posibles vías de oxidación del catecol por compuestos dinucleares de cobre, basándose en estudios mecanísticos previos. (Figura 1.3.2)

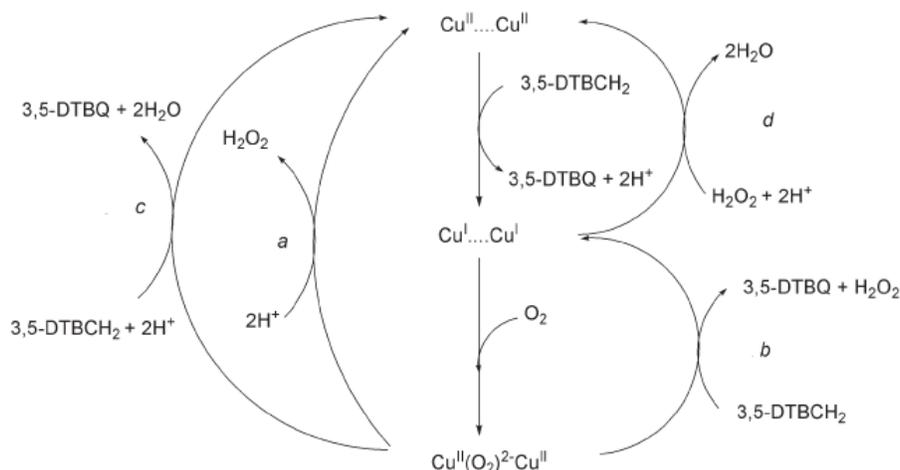


Figura 1.3.2. Posibles pasos propuestos para el ciclo catalítico de la oxidación de catecol por compuestos dinucleares de cobre(II) propuesto por Casella y colaboradores [20].

En general, de acuerdo a Reedijk [26], se han empleado cuatro distintos enfoques para el estudio del mecanismo de la actividad catecolasa de estos compuestos:

1. Estudios de unión del sustrato a los centros metálicos. Incluyen la caracterización cristalográfica y/o espectroscópica de aductos del catecol(ato) y estudios de la interacción de los complejos con el catecol en ausencia de oxígeno molecular.
2. Estudios de la relación estructura-actividad. Éstos comprenden la correlación de la actividad catecolasa con la distancia Cu-Cu, propiedades electroquímicas, estructura del ligante, naturaleza de los ligantes exógenos puente, pH y disolvente.
3. Estudios cinéticos. Dentro de los cuales se observa la influencia en la velocidad de reacción con la concentración de los reactivos involucrados, la adición de otro reactivo como quinona o peróxido de hidrógeno, etc.
4. Estudios estequiométricos de las especies intermediarias de cobre con el catecol.

Estudios de la unión del sustrato

A partir de los estudios con el primer enfoque se han encontrado varios modos de coordinación del catecol a los centros metálicos, (Figura 1.3.3) [26] obtenidos a partir de la caracterización cristalográfica y espectroscópica de aductos de los complejos dinucleares de cobre(II) con tetraclorocatecol (TCC). Este reactivo se utiliza como sustrato debido a su alto potencial redox ($E_{\text{pirocatecol}} = -0.046 \text{ V}$, $E_{\text{H}_2\text{DTBC}} = -0.222 \text{ V}$, $E_{\text{TCC}} = +0.312 \text{ V}$; todos vs. Ag/AgCl [44]) y sus propiedades de enlace similares que permiten la obtención de aductos estables.

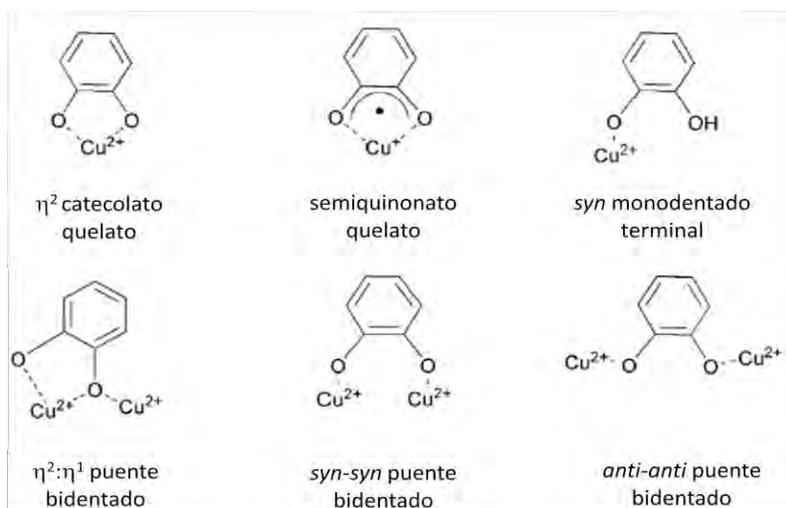


Figura 1.3.3. Posibles modos de unión del catecol a los centros de cobre.

Espectrofotométricamente, Krebs y colaboradores [45], han observado que mientras los complejos inactivos aparentan ser indiferentes al TCC o no mostrar un cambio significativo; la reacción de los complejos activos con el sustrato muestran señales en el intervalo de 400-500 nm, asignadas a la transferencia de carga ligante-metal catecolato-Cu (II), y cambios en la posición y coeficiente de absortividad molar de la banda d-d del Cu(II).

Así también dentro de este enfoque se han realizado estudios de la interacción anaerobia de los complejos de Cu(II) con H₂DTBC que brindan información de la reacción estequiométrica entre éstos como un primer paso en el ciclo catalítico. Lo estudios de espectroscopía UV-Vis han arrojado diversos resultados; Casella y colaboradores [43] reportan la presencia del aducto catecol-complejo [Cu₂L55]⁴⁺ a -90 °C con señales características de transferencia de carga L-M (345 y 440 nm) y la consecuente reducción de los centros de cobre(II) acompañada de la formación de una molécula de quinona (400 nm) al aumentar la temperatura. Figura (1.3.4)

Algunos autores han publicado la disminución o desaparición de las bandas d-d o TCLM de los complejos de Cu(II) con la adición del sustrato y la aparición de la banda de quinona a 400 nm; otros autores como Belle y colaboradores [46] no han observado la oxidación del H₂DTBC en condiciones anaerobias, pero sí la interacción del sustrato con el complejo.

Por otro lado, otros grupos de investigación como Koval y colaboradores [47] han mostrado la presencia del radical semiquinona (389 nm) como resultado de la interacción anaerobia de los complejos dinucleares de cobre(II) con el sustrato, al darse una transferencia de un electrón. (Figura 1.3.5.)

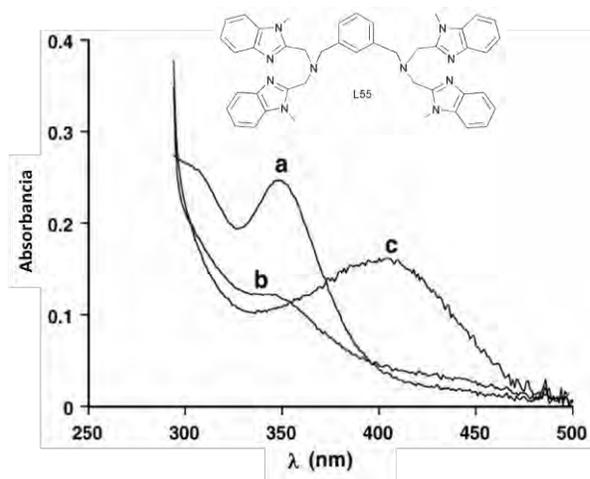


Figura 1.3.4. Espectro electrónico obtenido en condiciones anaerobias en disolución de metanol a 183 K de: **(a)** $[Cu_2L55]^{4+}$ (0.2 mM), **(b)** el complejo con H_2DTBC (1.8 mM) y **(c)** formación estequiométrica de DTBQ tras aumentar la temperatura a temp. amb. [43]

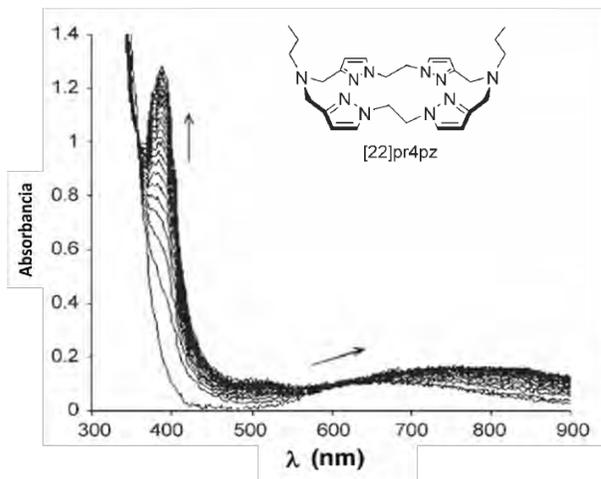


Figura 1.3.5. Cambios en el espectro de Uv-Vis de una disolución de $[Cu_2([22]pr4pz)(CO_3)(H_2O)]^{2+}$ 0.5 mM en metanol tras la adición de H_2DTBC bajo condiciones anaerobias a 100 K. [47]

Relación estructura-actividad

En cuanto a la relación estructura-actividad, la gran mayoría de los autores han estudiado la dependencia de la actividad catecolasa con la distancia Cu-Cu; para lo que se propone que distancias cercanas a las observadas en la forma *met* de la catecol oxidasa (2.9 Å) dan una mejor actividad. Tal es el caso de Wei y colaboradores que reportan para una serie de complejos análogos [40] las distancias óptimas entre los metales que corresponden a una actividad alta. (Figura 1.3.6)

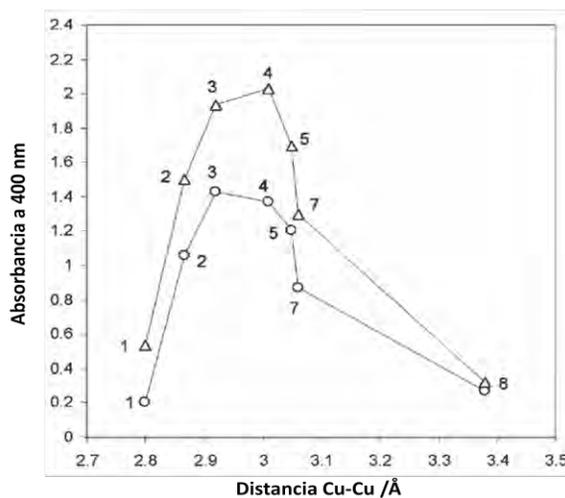


Figura 1.3.6. Absorbancia de DTBQ a 400 nm (a) 30 min (○) y (b) 60 min (△) después de la adición de H_2DTBC a una serie de complejos análogos con distancias Cu-Cu distintas. [40]

Sin embargo, la evidencia de compuestos con distancias Cu-Cu mayores que exhiben una actividad catecolasa importante [22,23], ha demostrado que la actividad no depende únicamente de este factor. Por esto también se han realizado estudios que involucran las propiedades de los ligantes para explicar los resultados de la actividad catecolasa.

La flexibilidad de los ligantes ha mostrado ser uno de los factores influyentes en la reactividad de los compuestos, donde de acuerdo a los estudios de Kandaswamy y colaboradores de una serie de ligantes dinucleantes macrocíclicos, el incremento en el tamaño del anillo incrementa la flexibilidad y favorece el fenómeno catalítico ya que facilita la unión al sustrato y la reducción del ion metálico [39].

Por último dentro de este enfoque, también se incluyen estudios de la dependencia de la actividad con el pH, ya que éste puede cambiar la esfera de coordinación del complejo y por tanto sus propiedades reactivas. La actividad de la enzima se observa en el intervalo de pH 5-8 (óptimo a pH = 8), con un pérdida irreversible de actividad por debajo de pH 4 y por arriba de pH 10. Belle y colaboradores [34] han publicado la actividad catalítica de una serie de complejos con ligantes derivados del fenol cuyas estructuras se interconvierten con el pH del medio. (Figura 1.3.7). De estas tres especies en disolución, únicamente la especie con el puente OH⁻ presenta actividad catecolasa, misma que atribuyen a la corta distancia Cu-Cu en ésta y a la capacidad del grupo hidroxilo de asistir la desprotonación del sustrato facilitando su coordinación a los centros metálicos con el consecuente aumento en la actividad catalítica.

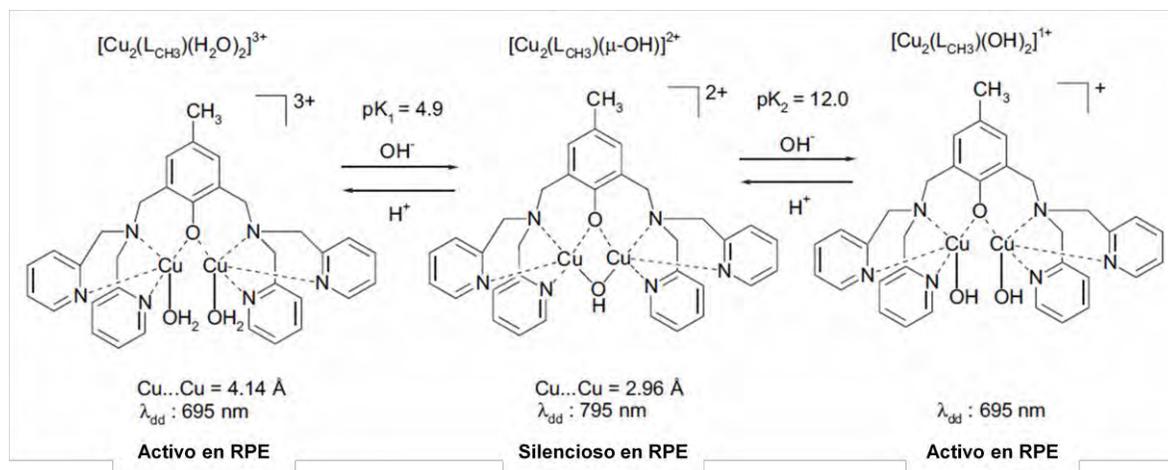


Figura 1.3.7. Especies en equilibrio dependientes del pH [34].

Existen otros grupos de investigación que también han observado un incremento en la actividad catecolasa de complejos de cobre a valores de pH en los que está presente la especie hidroxilada, para lo cual también sugieren que el grupo OH⁻ asiste la desprotonación del catecol. Neves y colaboradores hacen una propuesta de este tipo para un complejo dinuclear de Cu(II) con el ligante HTPPNOL [42], que a diferencia de Belle et al [34] proponen que el ion hidróxido no se encuentra coordinado como puente, sino coordinado en la posición apical.

También Casella y colaboradores encontraron un comportamiento similar para los complejos dinucleares de Cu(II) con el ligante L55 [43]. Los estudios de la influencia del pH en la velocidad de reacción muestran un máximo de velocidad alrededor de pH 7 mientras que a valores de pH superiores e inferiores la velocidad decrece significativamente (Figura 1.3.8, izquierda). Este valor de pH, de acuerdo al diagrama de distribución de especies (Figura 1.3.8, derecha), es en el cual se tiene la mayor abundancia posible de la forma monohidroxilada del complejo, por lo que proponen a ésta como la especie activa.

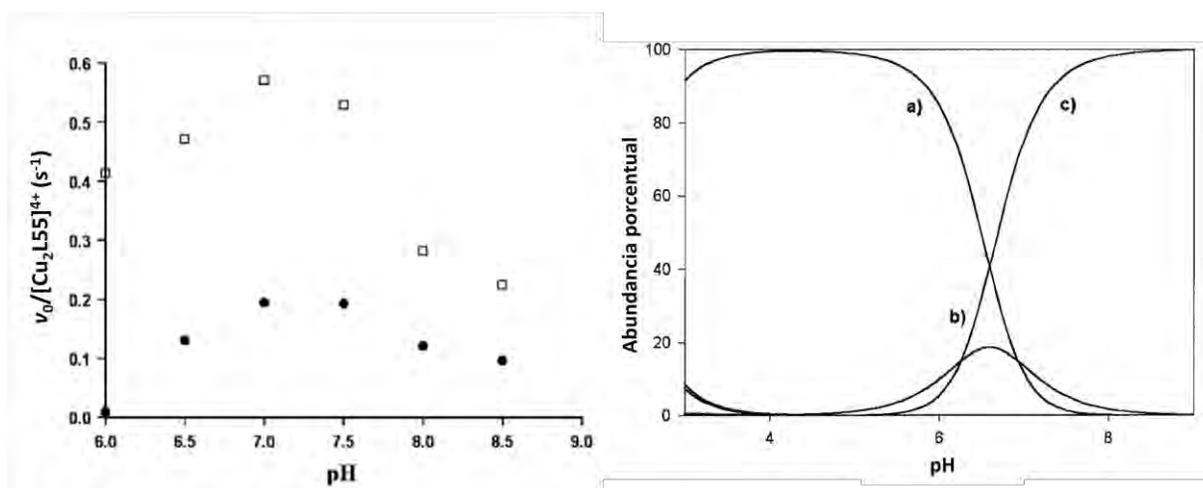


Figura 1.3.8. Izquierda: Dependencia en el pH de la velocidad del primer (□) y segundo (●) paso de la oxidación del H₂DTBC (2 mM) catalizada por $[Cu_2L55]^{4+}$ (6 μM) en la mezcla de disolventes 75% metanol/glicerol (7/1) y 25% (v/v) disolución acuosa de buffer HEPES (50 mM) [43]. Derecha: diagrama de distribución de especies del sistema 2Cu/L55 en función del pH en la mezcla acetonitrilo-agua: (a) $[Cu_2(L55)(H_2O)_2]^{4+}$; (b) $[Cu_2(L55)(H_2O)(OH)]^{3+}$; (c) $[Cu_2(L55)(OH)_2]^{2+}$ [48].

Estudios cinéticos

La mayoría de los trabajos relativos a la actividad catecolasa incluyen estudios cinéticos que evalúan la dependencia de la velocidad de reacción en las concentraciones de las especies involucradas (complejo, sustrato, O₂), así como en la adición de algún reactivo (peróxido de hidrógeno).

Generalmente se ha encontrado un comportamiento tipo Michaelis-Menten [17,19,20,22,24,25,37,42,45,46]) al variar la concentración del sustrato; mientras que para la variación de la concentración del complejo, una dependencia lineal correspondiente a una cinética de primer orden en el catalizador.

Algunas excepciones pueden encontrarse como el caso de Casella y Selmeczi, donde observaron una cinética de orden cero al sustrato y una dependencia en la concentración del oxígeno molecular, lo que indica la existencia de un paso determinante de reacción distinto [20,22].

Casella y colaboradores, reportan la posibilidad de formación tanto de agua como peróxido de hidrógeno como productos laterales de la reacción catalítica [20]. La producción de peróxido de

hidrógeno ha sido observada sólo en algunos casos [17,22,37,49,50], sin embargo, el mecanismo de formación exacto de éste no se conoce completamente. En algunos casos la formación está relacionada con la detección de especies intermediarias semiquinona en la reacción catalítica [26,49,51].

Los estudios de Meyer [17] y Casella [52] en los aductos complejo de cobre(II)-catecolato indican que el catecolato puede unirse sólo a uno de los dos iones metálicos, especialmente cuando la distancia metal-metal es larga. En este caso, sólo un electrón es transferido resultando en la formación de una especie de valencia mixta Cu(II)Cu(I)-semiquinonato. Con esta propuesta, sólo uno de los iones de cobre(II) participaría en la transferencia electrónica, mientras que el otro sólo desempeñaría un papel estructural. Sin embargo la poca información que hay al respecto no permite aceptar o rechazar esta opción.

Por otro lado, también se encuentran en la bibliografía estudios de la influencia del peróxido de hidrógeno en la reacción catalítica [20,21,26]. En general, este reactivo puede participar en el ciclo catalítico reoxidando a las especies reducidas de cobre(I) compitiendo con el oxígeno molecular.

1.4. Compuestos dinucleares de cobre(II) con ligantes derivados del imidazol

Tomando en cuenta que el sitio activo de la catecol oxidasa está constituido por dos iones de cobre(II) coordinados a residuos imidazólicos de histidina, en el grupo de investigación se han evaluado una serie de complejos dinucleares de cobre(II) con distintos ligantes derivados de imidazol, como sistemas modelo de esta enzima con el interés de entender los factores que rigen la actividad catecolasa de éstos.

1.4.1. Ligantes dinucleantes

Se han sintetizado diversos ligantes dinucleantes mediante la reacción de Mannich en medio básico. Estos se han clasificado de acuerdo a la estructura obtenida como “cerrados” y “abiertos”. (Figura 1.4.1)

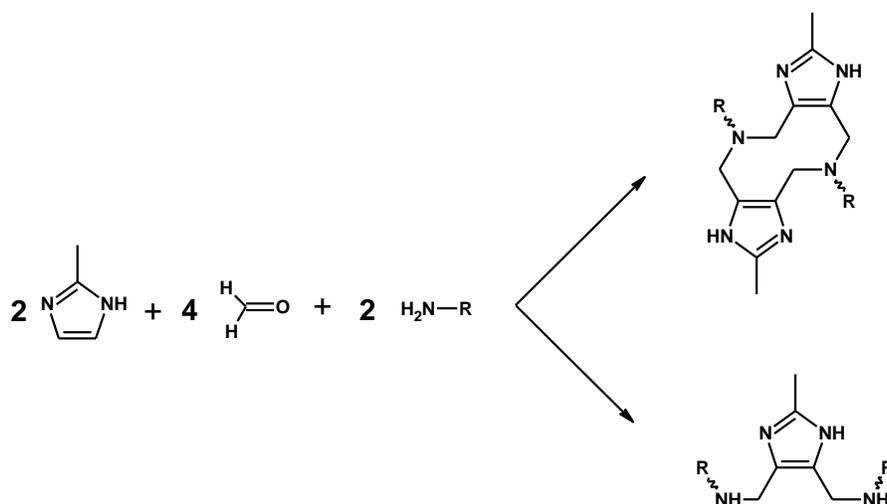


Figura 1.4.1. Esquema de la reacción de Mannich en medio básico para la obtención de ligantes “cerrados” (superior) y “abiertos” (inferior).

La reacción de Mannich ha sido ampliamente utilizada para condensar grupos aminométicos a anillos imidazólicos en un solo paso [53] tanto en medio ácido como en medio básico. El anillo de imidazol presenta cuatro sitios posibles de reacción (1, 2, 4 y 5); la N-sustitución en la posición 1 se favorece en medio ácido, mientras que en medio básico se favorece la C-sustitución en las posiciones 2, 4 y 5; dado que en medio básico la sustitución en el nitrógeno es una reacción reversible, se favorece la acumulación de productos sustituidos en el carbono.

En medio básico, se propone el inicio de la reacción con la formación del aminometilol. Este intermediario puede reaccionar de forma reversible con el anión imidazolato en el nitrógeno, o en cualquiera de los carbonos de forma prácticamente irreversible.

Los ligantes de tipo “cerrado” se obtienen de una doble adición de dos aminas a dos anillos imidazólicos en las posiciones 4 y 5, que resulta en la formación de un heterociclo de 10 miembros conocido como anillo diazocina. Por el contrario, los ligantes “abiertos” se obtienen de una sola adición de dos aminas primarias a un anillo imidazólico.

La obtención de ligantes de un tipo o de otro se ha encontrado que presenta una relación con la naturaleza de la amina primaria utilizada. Mientras que al utilizar aminas primarias se obtienen ligantes de tipo “cerrado”, los de tipo “abierto” se obtienen a partir de aminas provenientes de L- α -aminoácidos. A continuación se muestran algunas de las principales aminas utilizadas en la síntesis de ligantes “abiertos” y “cerrados” en el grupo de investigación. (Tabla 1.4.1.)

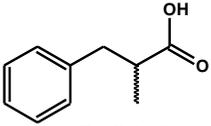
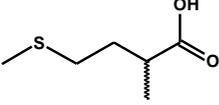
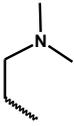
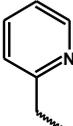
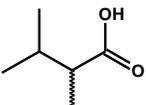
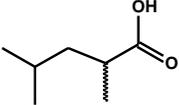
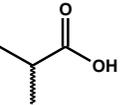
LIGANTES "CERRADOS" R = Aminas primarias	LIGANTES "ABIERTOS" R = aminas de L- α -aminoácidos
 Glicina  Propilamina	 Fenilalanina  Metionina
 N,N-dimetiletilendiamina  2-(aminometil)piridina	 Valina  Leucina
 Isopropilamina  Etanolamina	 Alanina

Tabla 1.4.1. Aminas primarias a partir de las cuales se han sintetizado ligantes en el grupo de investigación.

1.4.2. Complejos dinucleares de cobre(II)

Ambos tipos de ligantes presentan dos sitios tridentados capaces de coordinar a dos átomos de Cu(II), con excepción de los ligantes obtenidos a partir de propilamina (*prometim*) e isopropilamina (*isoprometim*), que presentan dos sitios bidentados.

En los complejos con ligantes de tipo "cerrado", cada uno de estos sitios está conformado por un nitrógeno del anillo imidazol y un nitrógeno de la amina terciaria del ciclo diazecina. El tercer átomo donador proviene del residuo de la amina primaria utilizada.

Los ligantes de tipo "abierto" presentan átomos donadores similares con la excepción de un nitrógeno de amina secundaria en lugar de la amina terciaria del ciclo diazecina ausente en este caso.

En ambos casos el número de coordinación de los iones de Cu(II) se completa a un número de cuatro y cinco con moléculas del disolvente o contraiones.

Se han caracterizado diversos complejos dinucleares con ligantes de tipo "cerrado" mediante difracción de rayos X. (Figura 1.4.2 y 1.4.3) Éstos presentan similitudes en la esfera de coordinación de los átomos de Cu(II) y en la conformación del ciclo diazecina (conformación de silla), con la excepción nuevamente del ligante *prometim* (conformación de bote). (Figura 1.4.3.)

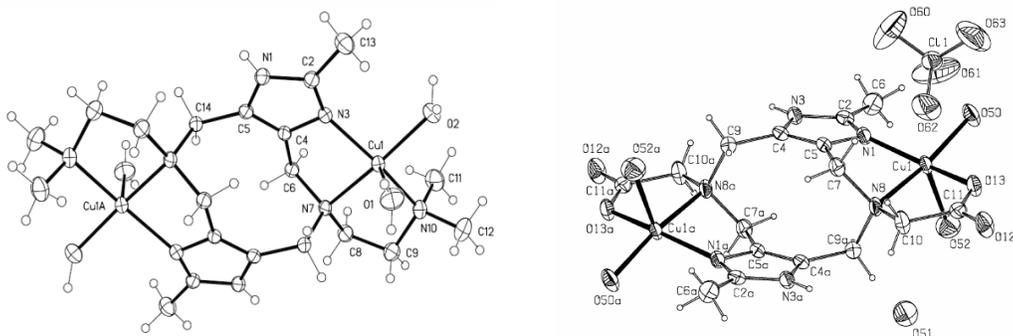


Figura 1.4.2. Estructuras cristalinas de complejos dinucleares de cobre(II) con ligantes “cerrados” en los que se aprecia la geometría de los centros metálicos de pirámide base cuadrada. Izquierda: $[Cu_2dimeim(H_2O)_4]^{4+}$ [24]. Derecha: $[Cu_2glimeim(H_2O)_4](ClO_4)_4$ [54].

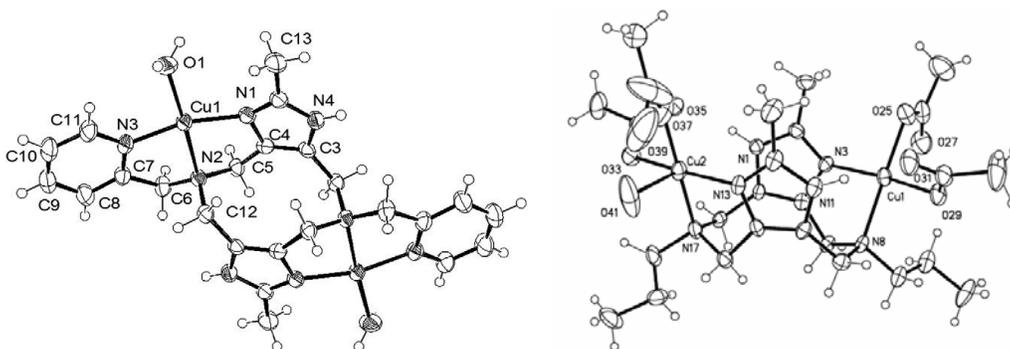


Figura 1.4.3. Estructuras cristalinas de complejos dinucleares de cobre(II) con ligantes “cerrados”. Izquierda: $[Cu_2dimp(H_2O)_4]^{4+}$ [25], conformación de silla. Derecha: $[Cu_2promeim(AcO)_4(H_2O)]$, conformación de bote.

Estos complejos se caracterizan por presentar distancias Cu-Cu mayores a 7Å; considerablemente mayores a la distancia publicada para la catecol oxidasa (2.9 Å) y a la gran mayoría de los sistemas modelos de ésta, a pesar de lo cual muestran una actividad catecolasa importante.

Así también se ha realizado la caracterización de algunos de estos complejos mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE) en disolución congelada a 77 K en MeOH. En los espectros obtenidos se puede identificar una estructura hiperfina resuelta en la región de $g_{||}$, con siete líneas discernibles con constantes de acoplamiento cercanas a 78 G. (Figura 1.4.4)

Este comportamiento sugiere un acoplamiento entre los centros metálicos a pesar de la gran distancia entre ellos. Espectros similares se han asociado previamente a la interacción magnética Cu-Cu en complejos dinucleares con distancias entre los centros de Cu(II) entre 7.3-8 Å [20,54,55].

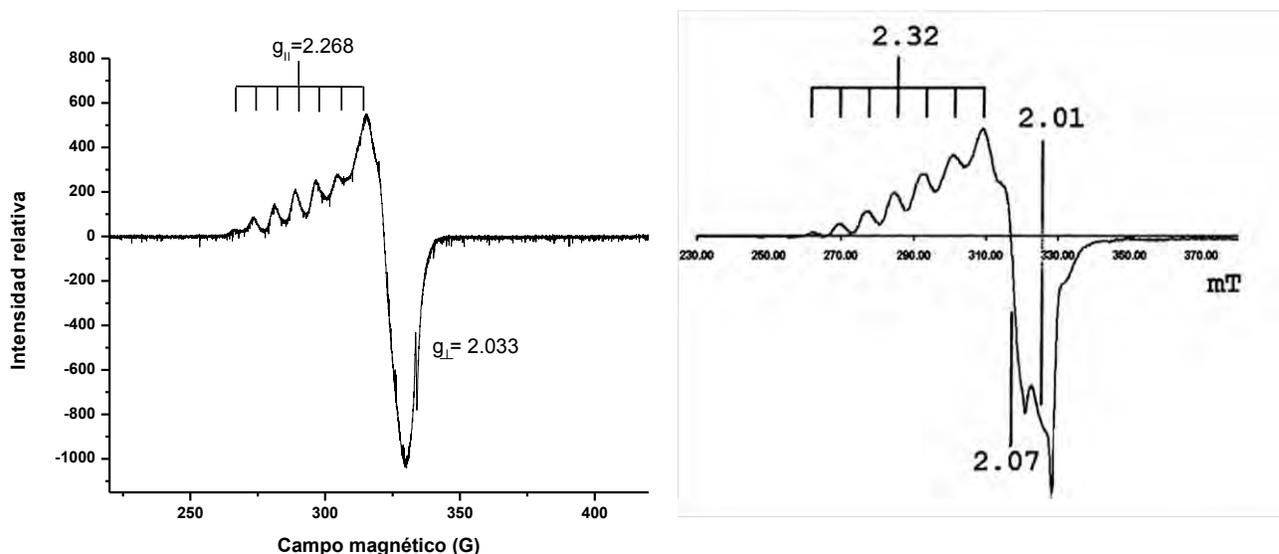


Figura 1.4.4. Espectros experimentales de RPE de Izquierda: $[\text{Cu}_2\text{dimp}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$ en disolución congelada de MeOH [25]. Derecha: $[\text{Cu}_2\text{glimeim}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4$ en disolución congelada de DMSO [54].

En cuanto a los complejos dinucleares de cobre(II) con ligantes de tipo “abierto”, se han aislado dos tipos de estructuras: una en la que los sitios de coordinación no son equivalentes, como en el caso con el ligante *leumeim* [56], en la que uno de los iones de cobre(II) se encuentra coordinado a los tres átomos donadores de uno de los sitios del ligante, mientras que el otro ion de Cu(II) únicamente a dos; y otra en la que se presenta la formación de un puente imidazolato que genera entornos de coordinación semejantes, como se obtuvo con el ligante *fenmeim* [57]. (Figura 1.4.5)

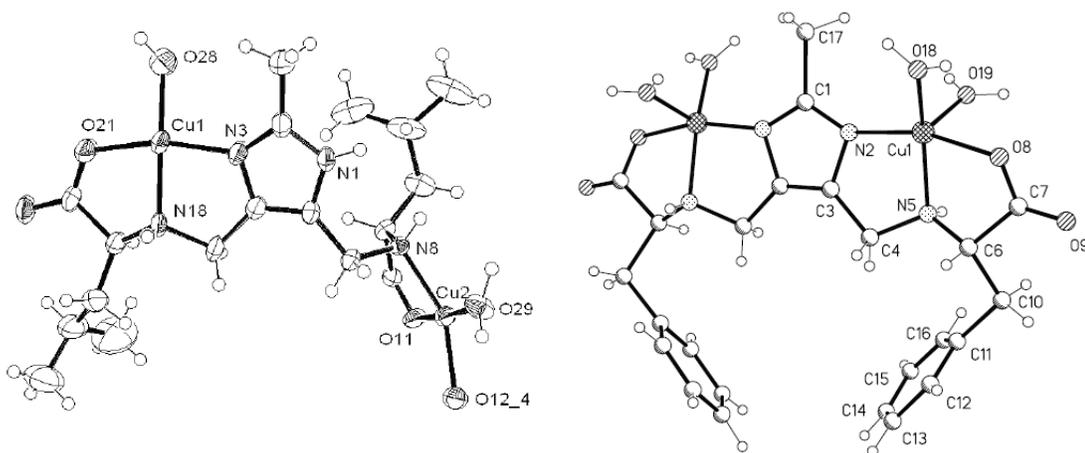


Figura 1.4.5. Estructura cristalina del complejos dinucleares con ligantes “abiertos”.
Izquierda: $[\text{Cu}_2\text{leumeim}(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$. Derecha: $[\text{Cu}_2\text{fenmeim}(\text{H}_2\text{O})_4]^{1+}$.

1.4.3. Evaluación de la actividad catecolasa

Los complejos dinucleares obtenidos tanto con ligantes de tipo “abierto” como con ligantes de tipo “cerrado” se han probado como catalizadores frente a la reacción de oxidación del 3,5-di-*tert*-butilcatecol (H_2DTBC) a la quinona correspondiente (DTBQ) en presencia de oxígeno molecular. (Figura 1.4.6)

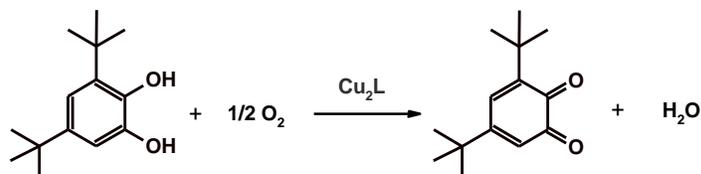


Figura 1.4.6. Esquema de reacción de oxidación de 3,5-di-*tert*-butilcatecol.

Esta reacción modelo es ampliamente utilizada para la evaluación de la actividad catecolasa de una variedad de sistemas modelo debido a su bajo potencial redox [44], la minimización de reacciones laterales gracias al impedimento estérico de los grupos *tert*-butilo y a la facilidad de seguimiento espectrofotométrico del producto de reacción, DTBQ. Una característica importante de este sustrato es que es insoluble en agua, por lo que los estudios cinéticos se llevan a cabo en disolventes como MeOH y MeCN o en mezclas de éstos con agua.

De los estudios catalíticos de los complejos obtenidos en el grupo de investigación, se ha encontrado un comportamiento lineal con la variación de la concentración del complejo y con la variación de la concentración del sustrato un comportamiento tipo Michaelis-Menten [24,25,57-64]. Dado esto, se emplea este modelo para la obtención de los parámetros cinéticos, constante catalítica, k_{cat} , y constante de Michaelis-Menten, K_M , a concentraciones constantes de catalizador y variantes de sustrato. Así la eficiencia catalítica se expresa en términos de k_{cat}/K_M .

Con la finalidad de entender de mejor manera los factores que rigen la actividad catecolasa de estos sistemas modelo, se han realizado estudios catalíticos variando condiciones del medio (mezcla de disolventes MeOH:H₂O, MeCN:H₂O y pH) y la estructura del ligante (átomos donadores, tipo de ligante) variando el complejo dinuclear de cobre(II). En la tabla 1.4.2 se presentan resultados de algunos de los complejos estudiados en el grupo de investigación.

Complejo	Medio (1:1)	$V_{max} \times 10^{-6}$ (Ms ⁻¹)	$K_M \times 10^{-3}$ (M)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)
Cu ₂ dimp [25]	MeCN:H ₂ O _{pH = 7.5}	7.53	7.26	0.025	3.44
	MeCN:H ₂ O _{pH = 8.5}	1.15	2.23	0.038	34.37
	MeOH:H ₂ O _{pH = 7.5}	2.36	0.52	0.079	152.61
Cu ₂ dimeim [24]	MeCN:H ₂ O _{pH = 7.5}	4.63	11.90	0.031	2.60
	MeCN:H ₂ O _{pH = 8.5}	9.77	4.19	0.065	15.53
	MeOH:H ₂ O _{pH = 7.5}	3.05	1.96	0.010	51.99
	MeOH:H ₂ O _{pH = 8.0}	3.25	1.59	0.108	67.88

Tabla 1.4.2. Parámetros cinéticos obtenidos de los estudios catalíticos de dos complejos dinucleares de cobre(II) del grupo de investigación.

Como se puede apreciar, la actividad catalítica resulta mayor en la mezcla MeOH:H₂O que en MeCN:H₂O para ambos complejos [Cu₂dimp]⁴⁺ y [Cu₂dimeim]⁴⁺, así también es mayor a valores de pH más básicos. Este incremento en la actividad a valores mayores de pH se puede asociar con la predominancia de las formas catalíticas hidrolizadas de los complejos, sin embargo, dada la disposición alejada de los centros metálicos, estos grupos hidroxilos no forman un puente como en el caso de la catecol oxidasa y de otros sistemas modelo. A pesar de ello, la presencia de grupos OH⁻ en los complejos [Cu₂dimp]⁴⁺ y [Cu₂dimeim]⁴⁺ facilita la desprotonación del sustrato y la consecuente unión de éste al centro metálico, incrementando así la actividad de estos sistemas modelo.

Ahora bien, al comparar entre ambos complejos, se encuentra que el complejo con el ligante *dimp* presenta la mayor eficiencia catalítica, efecto que puede atribuirse a la naturaleza de los átomos donadores. Estudios anteriores han establecido que los ligandos donadores por oxígeno se enlazan preferentemente a sitios de cobre(II) coordinados a ligandos aceptores- π , que a sitios coordinados a simples donadores- σ [65]. De acuerdo a esto, el complejo [Cu₂dimp]⁴⁺ presenta mayor actividad debido a la presencia de grupos piridínicos en la estructura del ligante (aceptores- π) (Figura 1.4.7 izquierda), mientras que el complejo [Cu₂dimeim]⁴⁺ grupos donadores - σ como la etilendiamina (Figura 1.4.7 derecha).

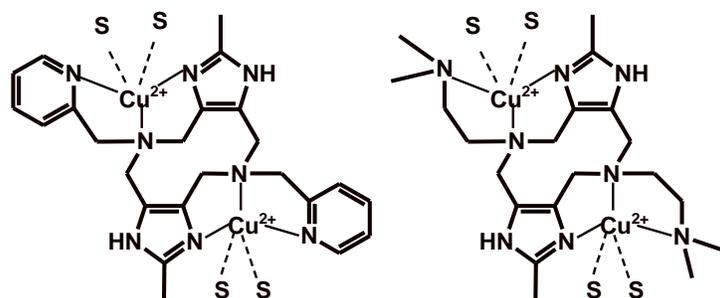


Figura 1.4.7. Estructuras propuestas para los complejos $[Cu_2dimp]^{4+}$ (izquierda) y $[Cu_2dimeim]^{4+}$ (derecha).

Dado que se ha observado una variación en la actividad catalítica de los complejos al variar los grupos donadores, el pH y el disolvente; ahora resulta de gran interés estudiar el efecto del tamaño de anillo quelato en la actividad, con el objetivo de tener mayor información acerca de la relación estructura-actividad y por tanto del mecanismo de acción de estos sistemas modelo.

Con base en esto se plantean los objetivos de este trabajo.

2. Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivo general

Realizar el estudio mecanístico de dos complejos dinucleares de cobre(II) análogos a los sistemas previamente estudiados Cu_2dimp y $Cu_2dimeim$, incrementando el tamaño del anillo quelato. Este estudio será abordado desde varios enfoques como la relación estructura actividad, estudios cinéticos y de la unión del sustrato; con la finalidad de entender los factores que rigen la actividad catecolasa de estos sistemas modelo y tener un mejor acercamiento al mecanismo catalítico.

2.2. Objetivos particulares

- Sintetizar los ligantes *diep* y *dmpa* mediante la reacción de Mannich en medio básico y caracterizarlos.
- Sintetizar los complejos dinucleares de cobre(II) de estos ligantes y caracterizarlos mediante diversas técnicas analíticas.
- Realizar la especiación de los sistemas cobre(II)/ligante en disolución mediante estudios potenciométricos de éstos.
- Evaluar la actividad catecolasa de los complejos de cobre mediante la reacción de oxidación del sustrato 3,5-di-*ter*-butilcatecol en disolución.
- Estudiar la interacción de los complejos de cobre con el sustrato en ausencia de oxígeno.
- Identificar el producto de la reducción del oxígeno molecular a agua o peróxido de hidrógeno.
- Comparar el comportamiento catalítico de los complejos de cobre con los observados para los sistemas análogos antes estudiados Cu_2dimp y $Cu_2dimeim$.

2.3. Hipótesis

El incremento del tamaño de uno de los anillos quelato en los ligantes *diep* y *dmpa*, favorecerá la actividad catecolasa de sus complejos dinucleares de cobre(II), en comparación con sus análogos Cu_2dimp y Cu_2dimeim . Este aumento en la actividad catalítica al cambiar un anillo quelato de 5 a 6 miembros, se deberá a que los ligantes al ser más flexibles facilitarán el cambio de geometría de pirámide de base cuadrada para el estado Cu(II) a la geometría tetraédrica del estado reducido Cu(I) durante el ciclo catalítico.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de los ligantes *diep* y *dmpa*

A continuación se discute la síntesis de dos ligantes análogos a los previamente estudiados [24,25] en los que la cadena lateral se ha alargado en un átomo de carbono.

La síntesis de dichos ligantes, *diep* y *dmpa*, se realizó mediante una reacción de Mannich en medio básico. Esta reacción se muestra en el siguiente esquema.

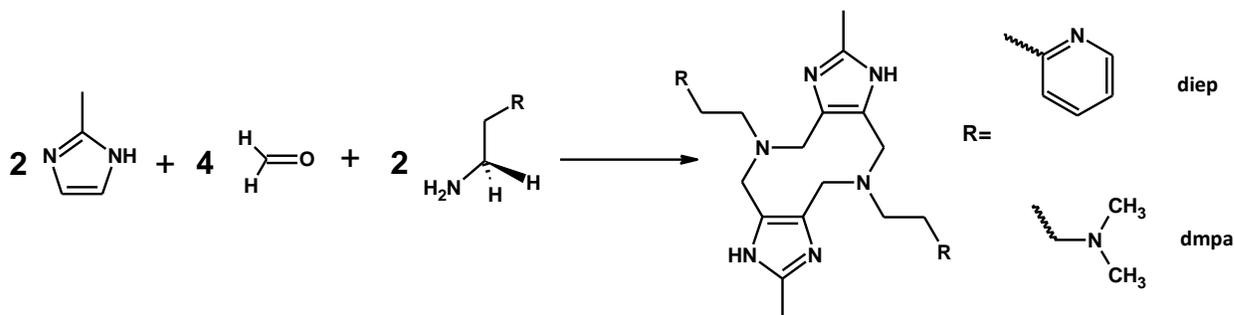


Figura 3.1.1. Esquema de la reacción de Mannich para la síntesis de los ligantes *diep* y *dmpa*.

La reacción de Mannich se ha utilizado como un excelente método de un solo paso para la aminometilación del anillo imidazólico [53]. El imidazol presenta cuatro sitios posibles de reacción (1, 2, 4 y 5). La reactividad de estas posiciones depende del pH del medio en el cual se lleve a cabo la reacción. En medio ácido se obtienen únicamente N-sustituciones del anillo imidazólico (posición 1). En medio básico se forman tanto las N-sustituciones como las C-sustituciones, obteniéndose una acumulación de los productos sustituidos en el carbono ya que este proceso es irreversible mientras que el proceso de la sustitución en N es reversible.

Se propone que la reacción en medio básico involucra la condensación del carbanión imidazolato, con el aminometilol formado entre la amina y el formaldehído, ya sea en la posición 1 de manera reversible o en las posiciones 2, 4 y 5 de manera irreversible.

De acuerdo a estos antecedentes, las reacciones de síntesis se llevaron a cabo en medio básico y partiendo del 2-metilimidazol para favorecer la sustitución únicamente en las posiciones 4 y 5 del anillo imidazólico.

3.1.1. Síntesis y caracterización del ligante *diep*

Para la síntesis del ligante 2,8-dimetil-5,11-di-(2-etilpiridina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo[4,5-h]-imidazo[4,5-c][1,6]diazecina (*diep*) se hizo reaccionar en medio acuoso 20 mmol de 2-metilimidazol con 20 mmol de 2-(2-aminoetil)piridina y 60 mmol de formaldehído. Este último se agregó en un exceso del 50% para incrementar el rendimiento de la reacción. El pH de la mezcla se ajustó a 12 y se agregaron 5 mL de etanol para mantener la mezcla traslúcida. Se mantuvo bajo agitación constante por 48 horas a 70 °C en baño de aceite y posteriormente a temperatura ambiente por 2 horas. Se obtuvo el producto puro con un rendimiento del 14.60 %.

Análisis elemental

Se determinó el porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno del ligante *diep* mediante el análisis elemental de una muestra de éste. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos así como los valores esperados para este ligante.

Elemento	Calculado	Observado	% Error
C	59.07 %	59.65 %	0.98 %
H	7.63 %	7.81 %	2.36 %
N	21.20 %	20.65 %	2.59 %

Tabla 3.1.1. Análisis elemental del ligante *diep*·4H₂O (C₂₆H₄₀N₈O₄).

Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

En la Figura 3.1.2 se muestra el espectro de IR obtenido para el ligante *diep*·4H₂O, mediante la técnica de reflectancia ATR.

En este espectro se pueden identificar señales características de los grupos funcionales contenidos en la estructura propuesta de este ligante, de acuerdo al número de onda y su asociación a los modos vibracionales de los átomos correspondientes a estos grupos.

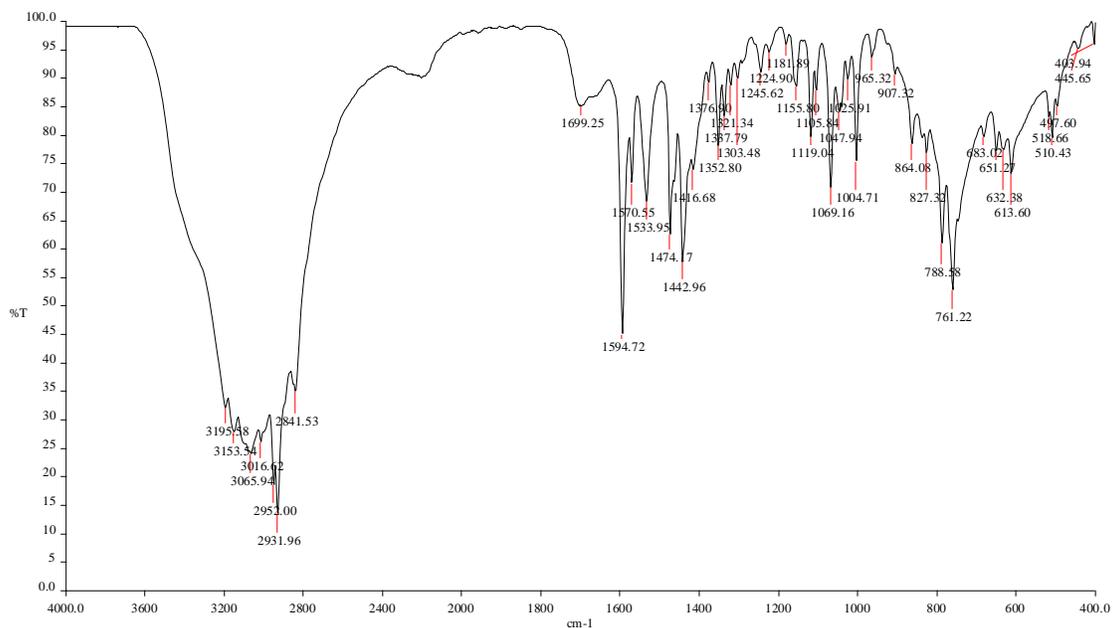


Figura 3.1.2. Espectro de infrarrojo del ligante diep.

En la tabla 3.1.2 se resumen las asignaciones de las principales bandas presentes en este espectro.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3196	N-H imidazol	1571, 1534	C=C imidazol
3066	C-H piridina		
2952	-CH ₃ imidazol (v _{as})	1474	-CH ₂ - (tijera)
2932	-CH ₂ - (v _{as})	1443	-CH ₃ (δ _{as})
2842	-CH ₂ - (v _s)	1377	-CH ₃ (δ _s)
~1650	C=N imidazol	1005, 864, 761	Anillo aromático del 2- metilimidazol
1595	C=C piridina		

Tabla 3.1.2. Frecuencias de vibración de las señales identificadas en el espectro de IR del ligante diep.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para el ligante *diep* se llevaron a cabo los experimentos de RMN de ¹H y ¹³C empleando como disolvente D₂O acidulado con DCl. Este último se empleó para lograr disolver el ligante.

RMN ¹H

Por medio del espectro de RMN ¹H se logró identificar y corroborar la estructura del ligante *diep*. Las señales se asignaron de acuerdo a su multiplicidad, desplazamiento químico e integración relativa. (Figura 3.1.3)

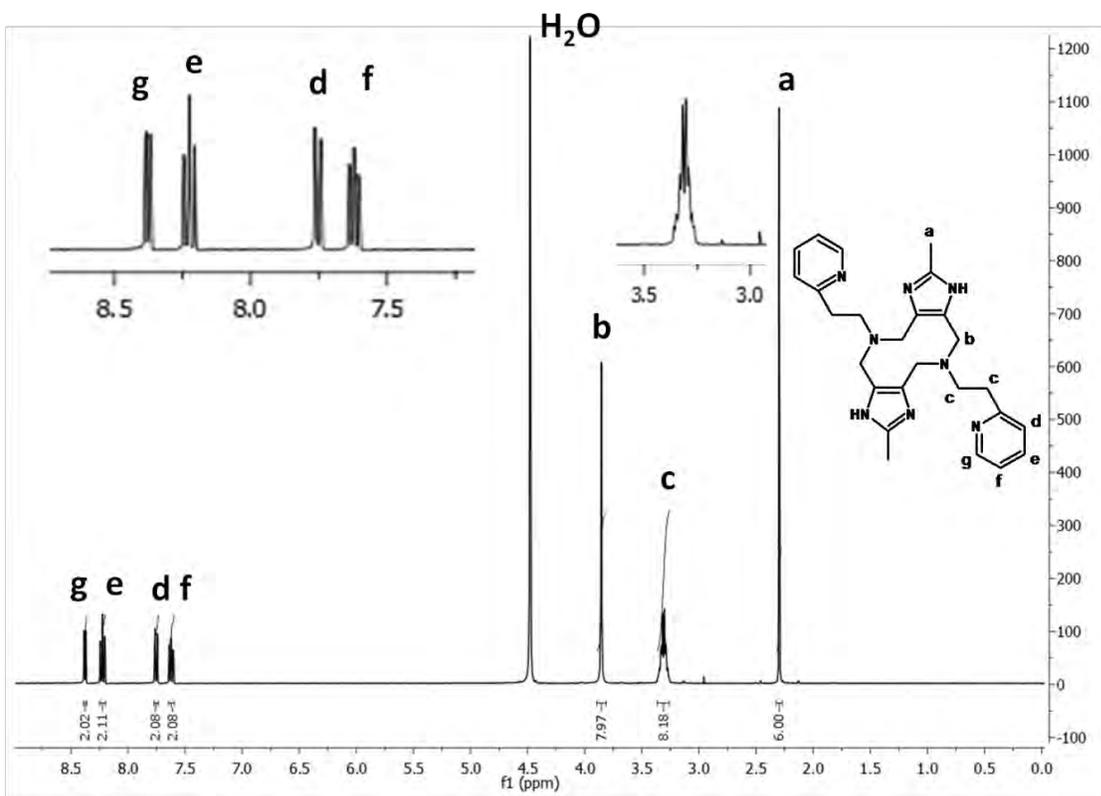


Figura 3.1.3. Espectro de RMN ^1H del ligante diep ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$) (400 MHz).

Las asignaciones realizadas para cada una de estas señales se resumen en la siguiente tabla.

Señal	δ (ppm)	Multiplicidad	Integración	J (Hz)	Asignación
a	2.30	Singulete	6 H	-	Metilos imidazol
b	3.86	Singulete	8 H	-	Metilenos diazecina
c	3.32	Sin resolver	8 H	-	Metilenos α,β a la piridina
d	7.76, 7.74	Doblete tripleteado	2 H	8, 0.8	Piridina
e	8.24, 8.22, 8.20	Triplete dobleteado	2 H	8, 1.6	Piridina
f	7.63, 7.61	Doblete de tripletes	2 H	8, 6, 1.2	Piridina
g	8.38, 8.37	Doblete de tripletes	2 H	6, 1.6, 0.8	Piridina

Tabla 3.1.3. Señales observadas en el espectro de RMN de ^1H del ligante diep.

En el espectro se pueden apreciar 7 señales correspondientes a 7 grupos de hidrógenos del ligante en ambientes químicos distintos. La señal **c** corresponde a la superposición de las señales de dos

pares de protones que están acoplados y presentan un desplazamiento químico muy similar. La señal a 4.48 ppm se atribuye a las moléculas de H₂O provenientes tanto del ligante diep·4H₂O como de H₂O o HDO residual del disolvente.

RMN ¹³C

El espectro de RMN ¹³C (Figura 3.1.4) corroboró una vez más la estructura de *diep* al evidenciarse 11 señales correspondientes a los átomos de carbono no equivalentes presentes en este ligante.

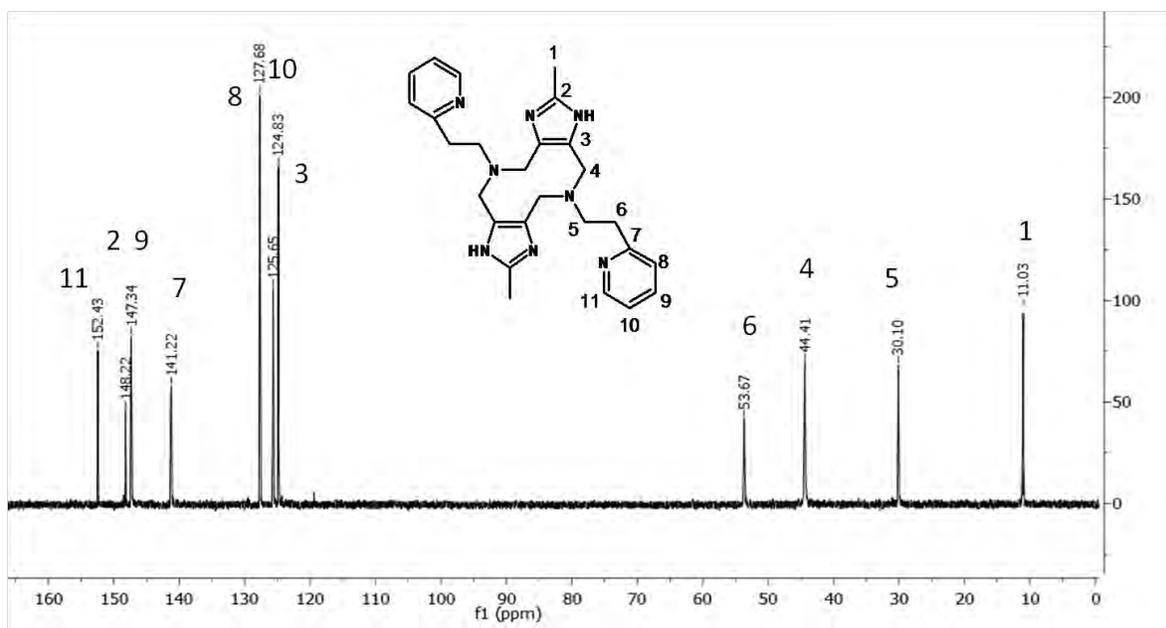


Figura 3.1.4. Espectro de RMN ¹³C del ligante *diep* (D₂O/DCI) (400 MHz).

En la tabla 3.1.4 se detallan las asignaciones realizadas mediante desplazamientos químicos para cada una de las señales.

Señal	δ (ppm)	Tipo de carbono	Asignación
1	11.03	Primario	2C, metilos imidazol
2	148.22	Cuaternario	2C, posición 2 imidazol
3	124.83	Cuaternario	4C, posición 4 y 5 imidazol
4	44.41	Secundario	4C, metilenos α al imidazol
5	30.10	Secundario	2C, metilenos α a diazecina

6	53.67	Secundario	2C, metilenos β a diazecina
7	141.22	Cuaternario	2C, posición 2 piridina
8	127.68	Terciario	2C, posición 3 piridina
9	147.34	Terciario	2C, posición 4 piridina
10	125.65	Terciario	2C, posición 5 piridina
11	152.43	Terciario	2C, posición 6 piridina

Tabla 3.1.4. Señales observadas en el espectro de RMN de ^{13}C del ligante *diep*.

3.1.2. Síntesis y caracterización del ligante *dmpa*

El ligante 2,8-dimetil-5,11-di-(dimetilpropilendiamina)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo-[4,5-h]imidazo[4,5-c][1,6]diazecina (*dmpa*) se sintetizó mediante la reacción en medio acuoso de 20 mmol de 2-metilimidazol con 20 mmol de 3-(dimetilamino)-1-propilamina y 50 mmol de formaldehído. Se aumentó la basicidad del medio agregando 2 eq. de KOH. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C por 78 horas con agitación continua y posteriormente se precipitó en caliente a 85 °C. Se obtuvo el producto puro con un rendimiento del 9.62 %.

Análisis elemental

Por medio del análisis elemental se determinaron los porcentajes de C, H y N en una muestra del ligante *dmpa*, encontrándose que dichos porcentajes concuerdan con una molécula de agua por cada molécula del ligante. En la tabla 3.1.5 se muestran los valores observados y los calculados para el ligante monohidratado.

Elemento	Calculado	Observado	% Error
C	60.80 %	60.50 %	0.49 %
H	9.74 %	10.03 %	2.98 %
N	25.78 %	25.53 %	0.97 %

Tabla 3.1.5 Análisis elemental del ligante *dmpa*·H₂O (C₂₂H₄₂N₈O).

Espectroscopía de infrarrojo

El espectro FTIR por reflectancia ATR del ligante *dmpa*·H₂O se muestra en la Figura 3.1.5. De la misma manera que para el ligante *diep*, las señales observadas en el espectro coinciden con los grupos funcionales presentes en la estructura propuesta del ligante. Las principales señales y su asignación se muestran en la tabla 3.1.6.

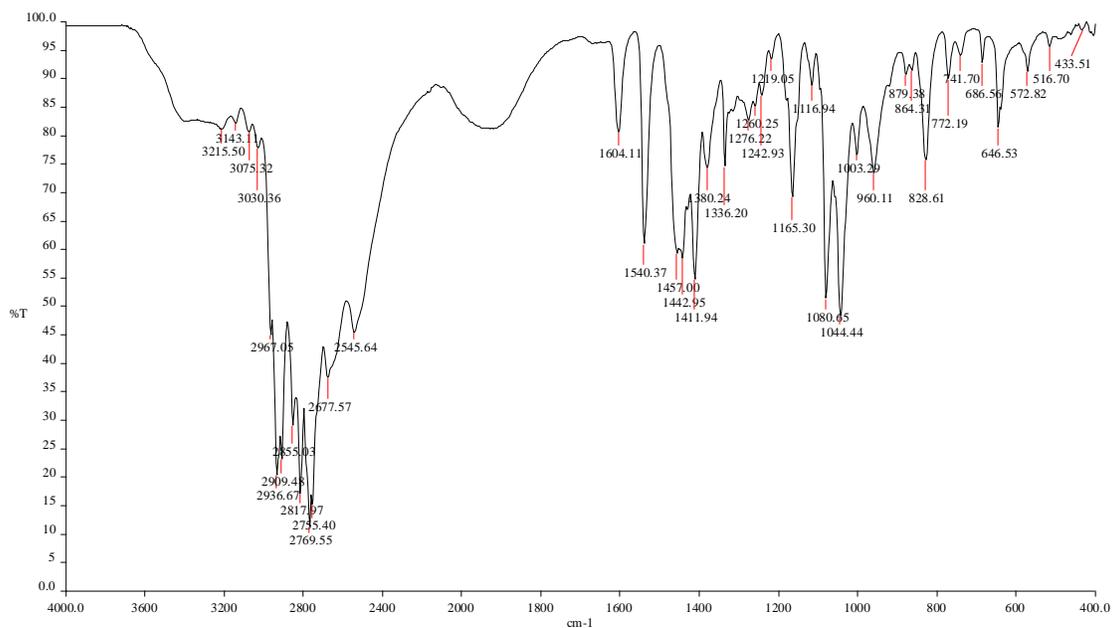


Figura 3.1.5. Espectro de infrarrojo del ligante *dmpa*·H₂O.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3216	N-H imidazol	1604	C=C imidazol
2967	-CH ₃	1540	N-H imidazol (δ)
2937	-CH ₂ - (ν _{as})	1443	-CH ₃ (δ _{as})
2855	-CH ₂ - (ν _s)	1380	-CH ₃ (δ _s)
2818, 2770, 2755	R-N(CH ₃) ₂	1165, 1044	C-N amina alifática
~1640	C=N Imidazol	960, 772, 687	Anillo aromático del 2-metilimidazol

Tabla 3.1.6. Señales identificadas en el espectro de IR del ligante *dmpa*.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para la caracterización del ligante mediante RMN se llevaron a cabo los experimentos de ¹H y ¹³C utilizando como disolvente D₂O acidulada con DCl para lograr disolver el ligante.

RMN ^1H

En la Figura 3.1.6 se muestra el espectro de RMN ^1H del ligante *dmpa*. En éste se observan 6 señales correspondientes a los protones no equivalentes de la molécula del ligante. El número de señales, así como su integración concuerdan con lo esperado. En la tabla 3.1.7 se enlistan las señales y su asignación correspondiente de acuerdo a su multiplicidad, integración y desplazamiento químico.

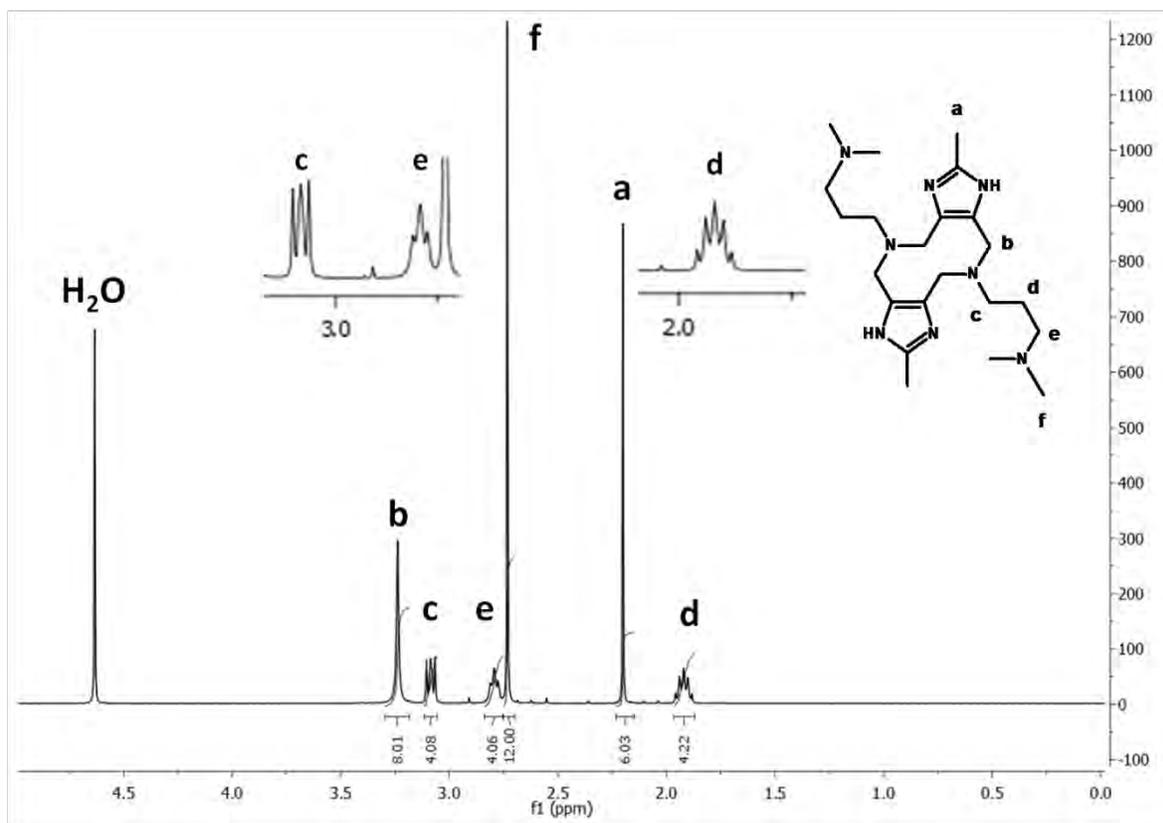


Figura 3.1.6. Espectro de RMN ^1H del ligante *dmpa* ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$) (400 MHz).

Señal	δ (ppm)	Multiplicidad	Integración	J (Hz)	Asignación
a	2.20	Singulete	6 H	-	Metilos imidazol
b	3.24	Singulete	8 H	-	Metilenos diazocina
c	3.11, 3.09, 3.07	2 dobletes traslapados	4 H	7.6	Metilenos α a la diazocina
d	1.96, 1.94, 1.92, 1.90, 1.88	Quintuplete	4 H	7.6	Metilenos β a la diazocina
e	2.81, 2.79, 2.78	Triplete	4 H	7.2	Metilenos γ a la diazocina
f	2.73	Singulete	12	-	Metilenos de dimetilamina

Tabla 3.1.7. Señales observadas en el espectro de RMN de ^1H del ligante *dmpa*.

RMN ¹³C

El espectro de RMN ¹³C (Figura 3.1.7) muestra 8 señales que concuerdan con los átomos no equivalentes de carbono presentes en el *dmpa*. De esta manera se tiene otra evidencia que corrobora la estructura del ligante. Las señales y su asignación de acuerdo al desplazamiento químico se detallan en la tabla 3.1.8.

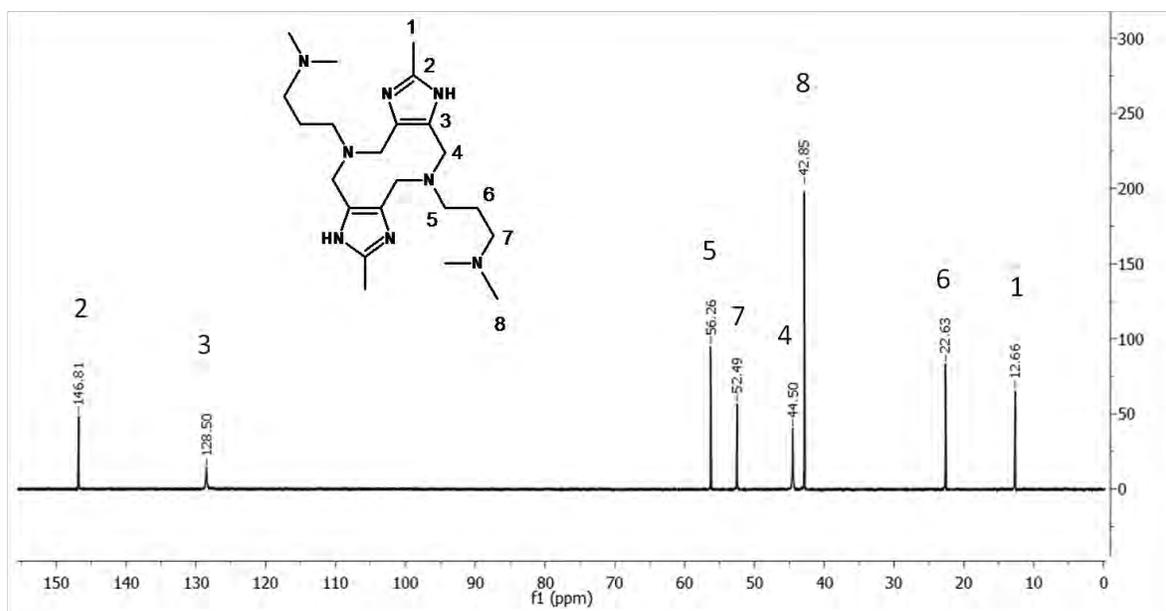


Figura 3.1.7. Espectro de RMN ¹³C del ligante *dmpa* (D₂O/DCl) (400 MHz).

Señal	δ (ppm)	Tipo de carbono	Asignación
1	12.66	Primario	2C, metilos imidazol
2	146.81	Cuaternario	2C, posición 2 imidazol
3	128.50	Cuaternario	4C, posición 4 y 5 imidazol
4	44.50	Secundario	4C, metilenos α al imidazol
5	56.26	Secundario	2C, metilenos α a diazecina
6	22.63	Secundario	2C, metilenos β a diazecina
7	52.49	Secundario	2C, metilenos γ a diazecina
8	42.85	Primario	4C, metilos de dimetilamina

Tabla 3.1.8. Señales observadas en el espectro de RMN de ¹³C del ligante *dmpa*.

3.2. Síntesis y caracterización de los complejos Cu₂L

Los ligantes sintetizados *diep* y *dmpa* presentan dos sitios para la coordinación de iones metálicos, cada uno conformado por 3 donadores por nitrógeno.

Dichos ligantes al poseer un átomo de carbono más en su cadena lateral, en comparación con sus análogos *dimp* y *dimeim* respectivamente [24,25] dan lugar a un anillo quelato de 6 y otro de 5 miembros, a diferencia de los dos anillos quelatos de 5 miembros a los que daban lugar los anteriores. (Figura 3.2.1.)

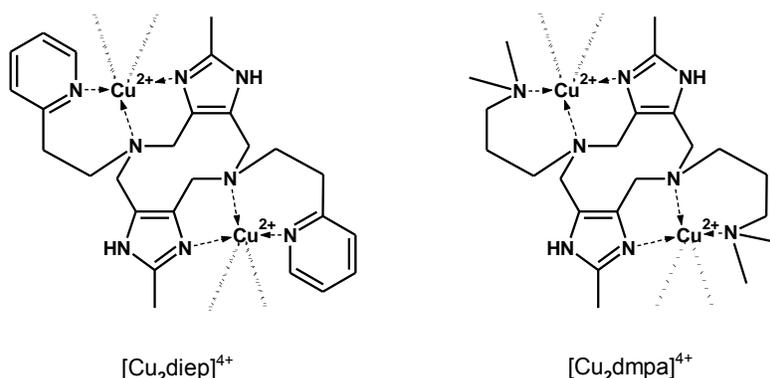


Figura 3.2.1. Estructura general de los complejos dinucleares de cobre(II) obtenidos con los ligantes *diep* y *dmpa*.

Para la síntesis de los complejos dinucleares de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* se variaron tanto las contraiones de la sal del metal, así como el disolvente utilizado, con la finalidad de observar la influencia de ambos factores en la composición de los complejos. Se sabe que los contraiones pueden coordinarse o no al centro metálico y este proceso a su vez depender del disolvente empleado.

Es por esto que en la reacción de síntesis se utilizaron sales de nitratos y percloratos de cobre(II) mezcladas en cantidades estequiométricas con los ligantes en agua o metanol como disolvente.

Como se muestra en la Figura 3.2.1, se coordina un átomo de cobre(II) en cada uno de los sitios tridentados de la molécula del ligante. La esfera de coordinación se completa a un total de 5 ligandos con dos moléculas de disolvente o aniones de la sal metálica; dando así lugar a una geometría de pirámide base cuadrada para cada centro metálico.

A continuación se detalla la obtención y caracterización de los complejos obtenidos para cada ligante.

3.2.1. Complejos dinucleares de Cu(II) con el ligante *diep*

3.2.1.1. Síntesis y caracterización de $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Para la síntesis de este complejo se disolvieron 0.25 mmol de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua y se le adicionaron 0.5 eq. del ligante *diep*. La intensidad del color de la disolución se fue incrementando paulatinamente con la adición del ligante a la disolución de cobre(II). Después de evaporación completa del disolvente se obtuvo un sólido cristalino del cual se logró aislar un monocristal color verde oscuro apropiado para la difracción de rayos X.

El sólido cristalino se caracterizó por análisis elemental y espectroscopía de infrarrojo, mientras que el monocristal se caracterizó mediante difracción de rayos X.

Análisis elemental

Del análisis elemental se obtuvieron los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno presentes en una muestra del complejo obtenido a partir de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$. Los valores obtenidos, presentados en la tabla 3.2.1, corresponden al complejo dinuclear $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ con 4 iones perclorato y 6 moléculas de agua. Se propone la fórmula $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dada la evidencia de la banda característica en IR de perclorato iónico.

Elemento	Calculado	Observado	% Error
C	28.66 %	28.30 %	1.26 %
H	4.07 %	4.11 %	0.98 %
N	10.28 %	10.20 %	0.78 %

Tabla 3.2.1. Análisis elemental para el complejo $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_{26} \text{H}_{44} \text{Cl}_4 \text{Cu}_2 \text{N}_8 \text{O}_{22}$).

Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

El espectro de IR/ATR del complejo presenta bandas identificadas previamente como características del ligante *diep*, así como nuevas bandas en 1082, 1055 y 619 cm^{-1} correspondientes a percloratos iónicos [66].

En la Figura 3.2.2 se presenta el espectro obtenido para este compuesto; y la asignación de las principales bandas, así como su comparación con las del ligante, se detallan en la tabla 3.2.2.

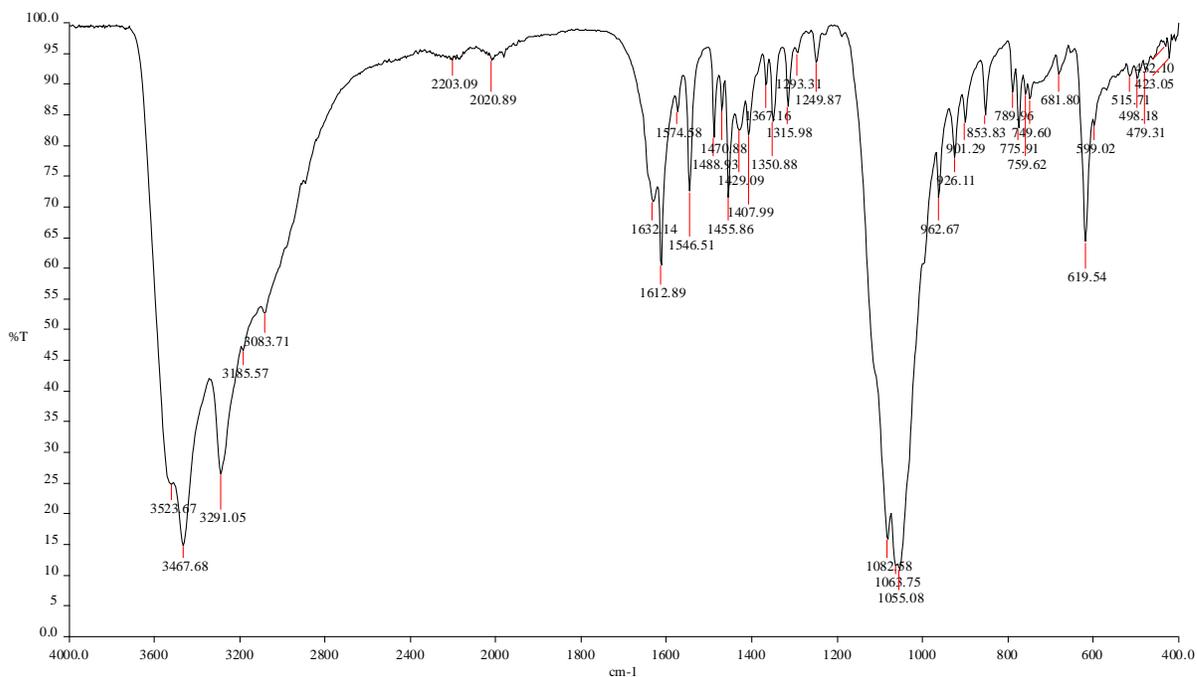


Figura 3.2.2. Espectro de IR del compuesto $[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2H_2O$.

En este espectro las bandas correspondientes a la vibración de los grupos funcionales del ligante se encuentran ligeramente desplazadas de su frecuencia original debido a la coordinación de los iones metálicos. También es importante mencionar que algunas bandas de menor energía del ligante no son posibles de identificar ya que las señales debidas a los percloratos son significativamente intensas y anchas.

Número de onda (cm^{-1}) $[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2H_2O$	Asignación	Número de onda (cm^{-1}) <i>diep</i>
~3200	N-H imidazol	3196
~3100	C-H piridina	3066
~2900	-CH ₃ imidazol (ν_{as})	2952
1632	C=N imidazol	1650
1456	-CH ₃ (δ_{as})	1443
1083, 1055, 620	ClO ₄ ⁻ iónico	---

Tabla 3.2.2. Frecuencias de vibración de las señales identificadas en el espectro de IR del compuesto $[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2H_2O$.

El intervalo de frecuencias de vibración informado para percloratos iónicos en compuestos de coordinación es variable de acuerdo a la sal o complejo estudiado [66] y va desde 1040 cm^{-1} hasta

1170 cm^{-1} . Las bandas observadas en el espectro del complejo en cuestión se encuentran dentro de este intervalo y dado que estos iones son poco coordinantes en competencia con el agua, se identifican como percloratos iónicos.

Difracción de rayos X

La estructura molecular del complejo sólido aislado consiste en el catión del complejo dinuclear de cobre(II) $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$, cuatro contraiones ClO_4^- y dos moléculas de agua no coordinadas. La estructura obtenida del catión complejo se muestra en la Figura 3.2.3 y en la tabla 3.2.3 algunas longitudes de enlace y ángulos seleccionados.

El compuesto cristaliza en el grupo espacial monoclinico $\text{P}21/\text{c}$, en el que se encuentran dos unidades del complejo por celda unitaria.

Este compuesto contiene dos centros de cobre(II) coordinados por una molécula de ligante *diep* a una distancia de 7.457 Å y cuatro moléculas de agua coordinadas. La esfera de coordinación alrededor del ion Cu1 se puede describir como pirámide base cuadrada distorsionada, con los átomos N4, N10, N15, provenientes del ligante, y O1w de una molécula de agua, ocupando las posiciones del plano base. La posición apical es ocupada por un átomo de oxígeno O2w de otra molécula de agua coordinada a una distancia de 2.268 Å. Las distancias cobre-nitrógeno no son equivalentes, para los nitrógenos imidazólico (N10) y piridínico (N15), las distancias al ion Cu1 son iguales (1.993 Å); mientras que el nitrógeno alifático N4 se encuentra a una distancia mayor, de 2.132 Å; aún mayor que la distancia Cu1-O1w (2.007 Å).

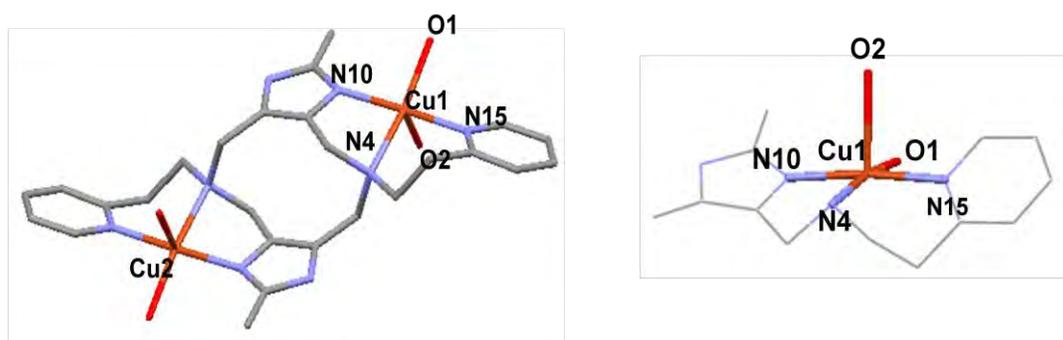


Figura 3.2.3. Estructura de rayos X del catión $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$. Derecha: esfera de coordinación del ion de cobre(II).

$[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2(H_2O)$			
Cu1-N15	1.993(3)	Cu1- Cu2	7.457
Cu1-N10	1.993(2)	Cu1-N4	2.132(2)
Cu1-O1	2.007(2)	Cu1-O2W	2.268(3)
N15-Cu1-N10	173.01(11)	O1-Cu1-N4	168.45(10)
N15-Cu1-O1	90.31(11)	N15-Cu1-O2	90.74(11)
N10-Cu1-O1	93.46(10)	N10-Cu1-O2	95.19(10)
N15-Cu1-N4	92.67(10)	O1-Cu1-O2	89.20(11)
N10-Cu1-N4	82.51(9)		

Tabla 3.2.3. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para el complejo $[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2H_2O$.

La composición del monocristal concuerda con la estructura propuesta para el complejo por análisis elemental.

3.2.1.2. Síntesis y caracterización de $[Cu_2diep(NO_3)_4]$

La mezcla de dos equivalentes de $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5 H_2O$ y un equivalente de ligante *diep* en H_2O dio como resultado la formación de microcristales color azul oscuro.

Al igual que para el compuesto anterior, se realizaron los análisis necesarios para la caracterización del sólido obtenido.

Análisis elemental

En la tabla 3.2.4 se muestran los resultados arrojados por el análisis elemental de C, H y N del compuesto. Estos porcentajes corresponden al complejo dinuclear $[Cu_2diep]^{4+}$ y cuatro iones nitrato; los cuales se proponen estén coordinados al centro metálico dada la evidencia de bandas en el IR correspondientes a iones coordinados. La fórmula propuesta para este compuesto es $[Cu_2diep(NO_3)_4]$.

Elemento	Calculado	Observado	% Error
C	37.54 %	37.55 %	0.03 %
H	3.88 %	4.01 %	3.35 %
N	20.21 %	20.05 %	0.79 %

Tabla 3.2.4. Análisis elemental para el complejo $[Cu_2diep(NO_3)_4]$ ($C_{26}H_{32}Cu_2N_{12}O_{12}$).

Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

En el espectro de IR obtenido por reflectancia ATR (Figura 3.2.4) se pueden identificar señales correspondientes al ligante, así como bandas características de iones nitrato presentes en el compuesto. Las bandas correspondientes a la vibración de los grupos funcionales de los átomos donadores del ligante se encuentran desplazadas de su frecuencia original debido a la coordinación de los iones Cu(II).

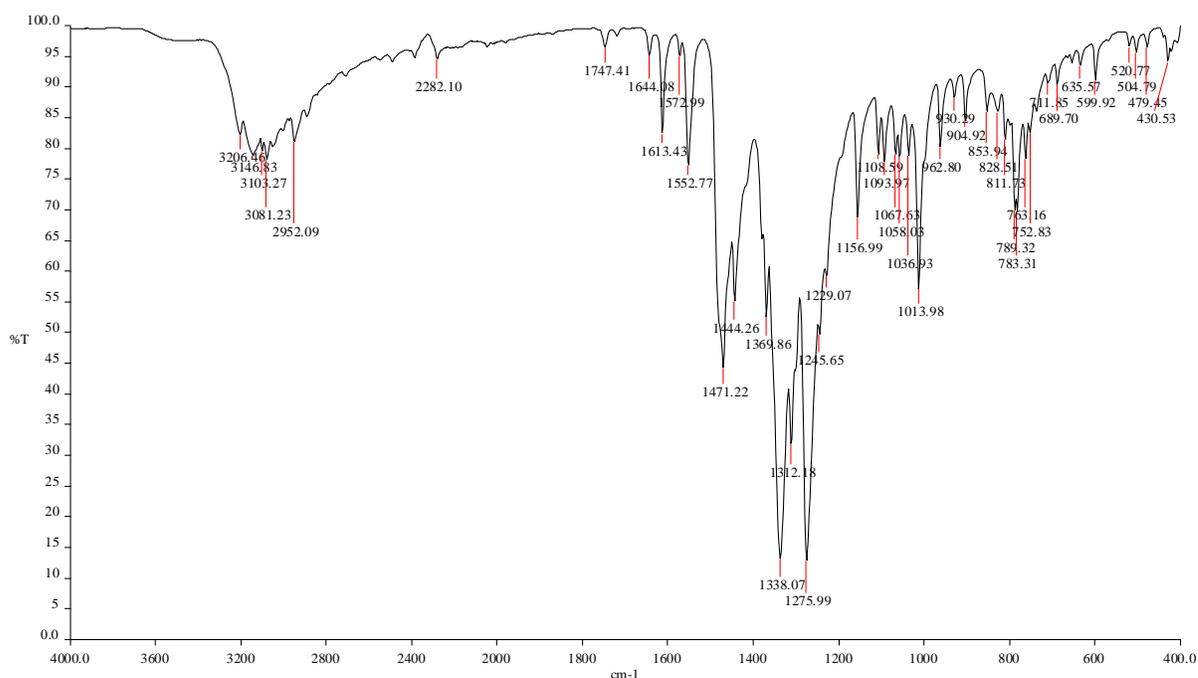


Figura 3.2.4. Espectro de IR del compuesto $[Cu_2diep(NO_3)_4]$.

Está informado en la literatura que los nitratos coordinados presentan tres intervalos de frecuencias de vibración (cm^{-1} : 1630 – 1420, 1340 – 1162 y 1041 – 963), mientras que nitratos iónicos un único intervalo considerablemente distinto (cm^{-1} : 1405 - 1370) [66]. Las bandas observadas en el espectro de IR del compuesto en cuestión corresponden a nitratos coordinados al centro metálico, ya que éstas entran en los intervalos correspondientes.

A continuación se presentan las asignaciones de las principales bandas del espectro y su comparación con las frecuencias originales del ligante *diep*. (Tabla 3.2.5)

Número de onda (cm ⁻¹) [Cu ₂ <i>diep</i> (NO ₃) ₄]	Asignación	Número de onda (cm ⁻¹) <i>diep</i>
3206	N-H imidazol	3196
3081	C-H piridina	3066
2952	-CH ₃ imidazol (ν _{as})	2952
1613	C=C piridina	1595
1644	C=N imidazol	1650
1444	-CH ₃ (δ _{as})	1443
1471, 1338, 1276, 1014	NO ₃ ⁻ coordinado	---

Tabla 3.2.5. Frecuencias de vibración de las señales identificadas en el espectro de IR del compuesto [Cu₂*diep*(NO₃)₄].

Conductividad

Aunado a la caracterización por IR, el complejo es totalmente insoluble en metanol, lo cual corrobora la presencia de un complejo eléctricamente neutro incapaz de disolverse en este disolvente.

3.2.1.3. Espectroscopía UV-Vis

Los complejos de cobre(II) sintetizados con el ligante *diep* se analizaron por espectroscopía UV-Vis tanto en estado sólido como en disolución.

En la Figura 3.2.5 se presentan los espectros electrónicos de los compuestos con nitratos y percloratos obtenidos en estado sólido mediante reflectancia difusa y el espectro obtenido en disolución 1 mM en metanol del complejo con percloratos.

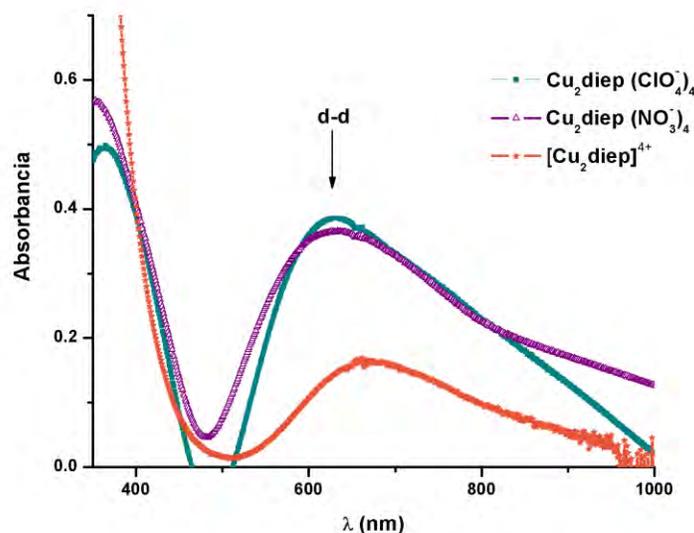


Figura 3.2.5. Espectros electrónicos UV-Vis en estado sólido de los complejos (■) $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (△) $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{NO}_3)_4]$ y en solución 1 mM en MeOH del compuesto (★) $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

En los espectros obtenidos en estado sólido se observa una banda de absorción en 629 nm debido a las transiciones d-d de los iones Cu(II); independientemente del contraión presente en el complejo dinuclear de cobre(II).

Este máximo de absorción se desplaza a menores energías (670 nm) al disolver el sólido en metanol. De este espectro se determinó el valor del coeficiente de absortividad molar del complejo, obteniéndose un valor $\epsilon = 162.65 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 670 nm.

3.2.1.4. Resonancia paramagnética electrónica (RPE)

Se caracterizaron los complejos sintetizados $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ y $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{NO}_3)_4]$ mediante estudios de resonancia paramagnética electrónica (RPE). El espectro del compuesto con percloratos se adquirió de una disolución congelada a 77 K de metanol de este complejo; mientras que el espectro del complejo con nitratos se adquirió de la muestra sólida a temperatura ambiente dado que este complejo es insoluble en metanol. Los espectros obtenidos se presentan en la Figura 3.2.6.

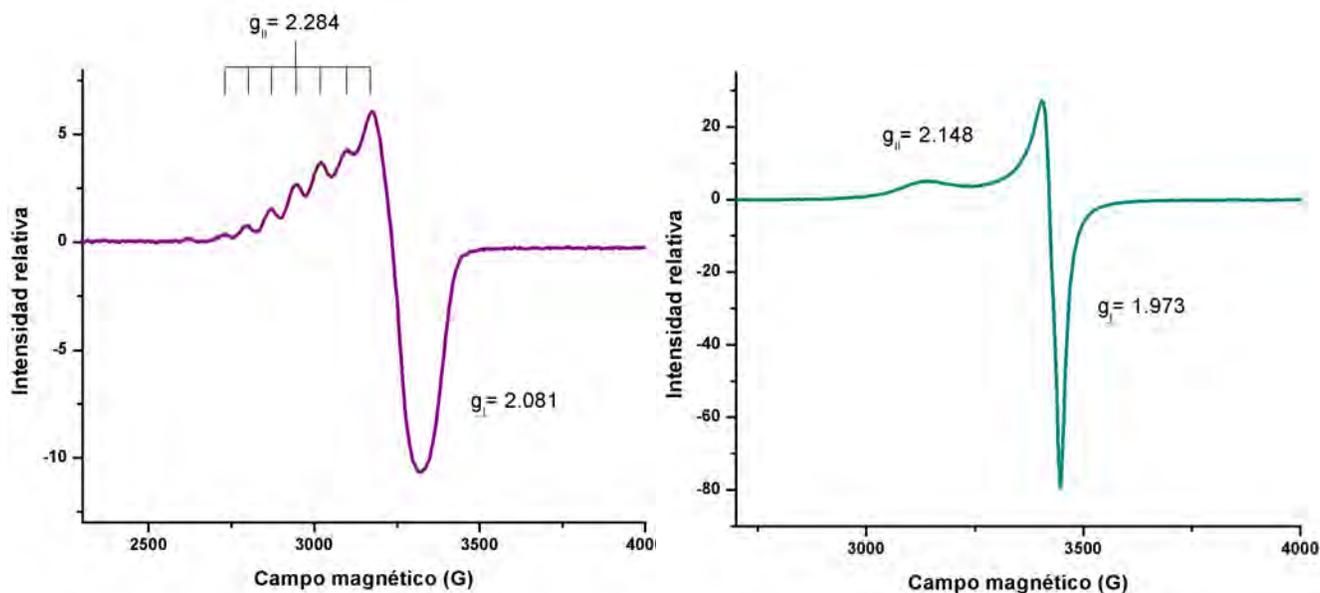


Figura 3.2.6. Izquierda: Espectro de RPE de disolución congelada de metanol de $[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2(H_2O)$. Derecha: Espectro de RPE de $[Cu_2diep(NO_3)_4]$ en estado sólido a temperatura ambiente.

Para los complejos con el ligante *diep* tanto con percloratos como con nitratos se obtienen espectros de RPE axiales. En el espectro obtenido en disolución congelada de metanol del complejo con percloratos (Figura 3.2.6, izquierda), se puede identificar una estructura hiperfina resuelta con siete líneas distinguibles, características para complejos dinucleares de cobre(II). El espín nuclear de los dos isótopos de cobre (^{63}Cu y ^{65}Cu) es igual a $3/2$, por lo que la interacción de un electrón con dos núcleos equivalentes de cobre resulta en el desdoblamiento de siete componentes, observables en el espectro izquierdo de la Figura 3.2.6. Este comportamiento sugiere un acoplamiento magnético entre los centros metálicos a pesar de presentar distancias $Cu(II)-Cu(II)$ mayores a 7 \AA .

Espectros similares se han asignado previamente a la interacción de intercambio entre los dos sitios de cobre(II) en complejos dinucleares con distancias entre los centros metálicos de $7.3-8 \text{ \AA}$ [20,54,55].

3.2.2. Complejos dinucleares de Cu(II) con el ligante *dmpa*

3.2.2.1. Síntesis y caracterización de $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Se disolvieron 0.25 mmol de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ en metanol y se le adicionaron 0.5 eq. del ligante *dmpa*. En seguida de la adición total del ligante, precipitó un polvo fino verde claro. Después de la evaporación completa del disolvente se obtuvieron dos sólidos distintos, distinguibles por la diferencia en el color y la apariencia. Mientras que un sólido estaba conformado por microcristales verde claro, el otro era un vidrio verde oscuro. Estos sólidos distintos se encontraban perfectamente separados, donde el sólido verde claro se encontraba en el centro del vaso formando un círculo delimitado por el sólido verde oscuro.

Éstos se lograron separar y se caracterizaron mediante las mismas técnicas que los complejos antes descritos, sin embargo se presentan a continuación únicamente los resultados del sólido que corroboró la composición del complejo esperado; en este caso el sólido microcristalino verde claro.

Análisis elemental

De los resultados obtenidos del estudio de análisis elemental de C, H y N (tabla 3.2.6) se sabe que el complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}]^{4+}$ en estado sólido presenta cuatro iones nitrato y una molécula de agua. Por el espectro de IR se propone la fórmula $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$, en la que los iones nitrato se encuentran dentro de la esfera de coordinación.

Elemento	Calculado	Observado	% Error
C	32.63 %	32.89 %	0.79
H	5.23 %	5.31 %	1.53
N	20.76 %	20.32 %	2.19

Tabla 3.2.6. Análisis elemental para el complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{12}\text{O}_{13}$).

Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

El espectro de IR obtenido por reflectancia ATR corrobora la estructura de este complejo al presentar bandas correspondientes al ligante desplazadas por la presencia de los iones metálicos y nuevas bandas debidas a los iones nitrato. Se presenta el espectro de IR del compuesto en la Figura 3.2.6.



Figura 3.2.6. Espectro de IR del compuesto $[Cu_2dmpa(NO_3)_4] \cdot H_2O$.

En este espectro se observan señales alrededor de 1275, 1435 y 1016 cm^{-1} , las cuales de acuerdo a lo informado en literatura [66], corresponden a nitratos dentro de la esfera de coordinación.

De igual manera que para los anteriores complejos, las señales de los grupos funcionales que incluyen a los átomos donadores del ligante se encuentran desplazadas de las obtenidas para el ligante libre, debido a la coordinación de cobre(II). En la tabla 3.2.7 se detallan las asignaciones realizadas de las bandas principales y su comparación con las bandas correspondientes en ligante libre.

Número de onda (cm^{-1}) $[Cu_2dmpa(NO_3)_4] \cdot H_2O$	Asignación	Número de onda (cm^{-1}) <i>dmpa</i>
~3230	N-H imidazol	3216
~2780	R-N(CH ₃) ₂	2770
1636	C=N imidazol	1640
1547	N-H imidazol (δ)	1540
1390	-CH ₃ (δ_s)	1380
1435, 1312, 1275, 1016	NO ₃ ⁻ coordinado	---
1168, 1041	C-N amina alifática	1165, 1044

Tabla 3.2.7. Frecuencias de vibración de las señales identificadas en el espectro de IR del compuesto $[Cu_2dmpa(NO_3)_4] \cdot H_2O$.

Conductividad

Se intentó realizar mediciones de conductimetría en metanol. Sin embargo en metanol no fue posible realizar dichas mediciones ya que el complejo es totalmente insoluble en este disolvente, lo cual concuerda con el complejo eléctricamente neutro propuesto anteriormente por la caracterización por espectroscopía IR.

3.2.2.2. Síntesis y caracterización de $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Para la síntesis de este complejo se mezclaron 2 equivalentes de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con un equivalente de ligante *dmpa* en metanol. Se dejó evaporar por completo el disolvente y se obtuvo en mayor proporción un sólido fino color azul oscuro y en menor proporción, únicamente en las paredes del vaso, un sólido azul claro.

A continuación se presenta únicamente la caracterización del sólido que corroboró la composición del complejo deseado, en este caso el azul oscuro.

Análisis elemental

Del estudio de análisis elemental de C, H y N se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 3.2.8. Estos porcentajes concuerdan con el complejo dinuclear de cobre(II) de este ligante con percloratos hexahidratado.

Elemento	Calculado	Observado	% Error
C	25.18 %	24.78 %	1.69
H	4.99 %	4.89 %	2.10
N	10.68 %	10.62 %	0.56

Tabla 3.2.8. Análisis elemental para el complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

La fórmula propuesta para este compuesto es $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con base en los estudios posteriores de IR.

Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

En el espectro de IR obtenido por reflectancia ATR (Figura 3.2.7) se identifican bandas correspondientes al ligante *dmpa*, las cuales se encuentran ligeramente desplazadas de su frecuencia original debido a la formación del complejo.

Además de corroborarse la formación del complejo, se confirma la presencia de percloratos en el compuesto sólido al observarse una banda intensa en 1058.47 cm^{-1} .

La asignación de estas señales y su comparación con las del ligante libre se presentan en la tabla 3.2.9.

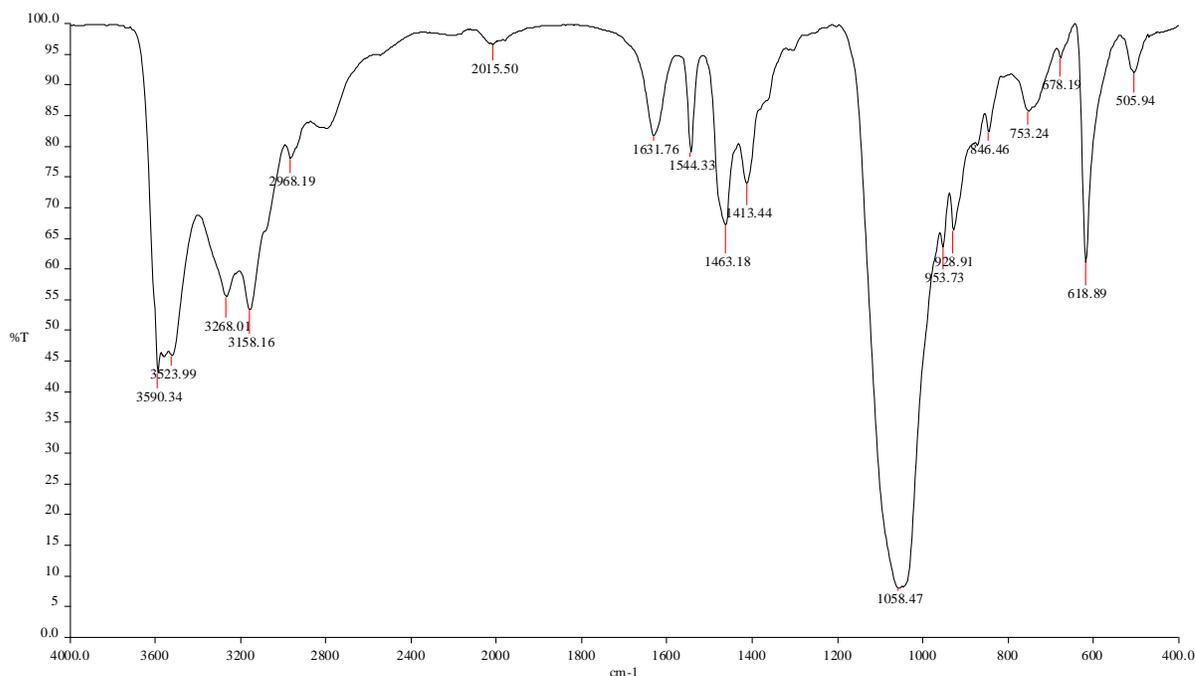


Figura 3.2.7. Espectro de IR del compuesto $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Debido a la gran intensidad de las señales de los percloratos no es posible observar e identificar todas las señales correspondientes al ligante ya que muchas de ellas quedan inmersas.

Número de onda (cm^{-1}) $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Asignación	Número de onda (cm^{-1}) <i>dmpa</i>
~3268	N-H imidazol	3216
~2810	R-N(CH ₃) ₂	2770
1632	C=N imidazol	1640
1544	N-H imidazol (δ)	1540
1413	-CH ₃ (δ_s)	1380
1058, 619	ClO ₄ ⁻ iónico	---

Tabla 3.2.9. Frecuencias de vibración de las señales identificadas en el espectro de IR del compuesto $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Al igual que para el complejo $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, la banda en 1058.47 cm^{-1} entra en el intervalo de perclorato iónico informado [66]. A pesar de que el complejo con *dmpa* se sintetizó en metanol, se tiene la presencia de moléculas de agua provenientes de la sal de cobre hexahidratada; las cuales se coordinan preferentemente a los centros metálicos dejando fuera de la esfera de coordinación a los percloratos.

3.2.2.3. Espectroscopía UV-Vis

Al igual que para los complejos con el ligante *diep*, se caracterizaron los complejos dinucleares de cobre(II) sintetizados con el ligante *dmpa* por medio de espectroscopía UV-Vis.

Se adquirieron los espectros electrónicos de los complejos con nitratos y percloratos en estado sólido y en disolución de metanol. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 3.2.8.

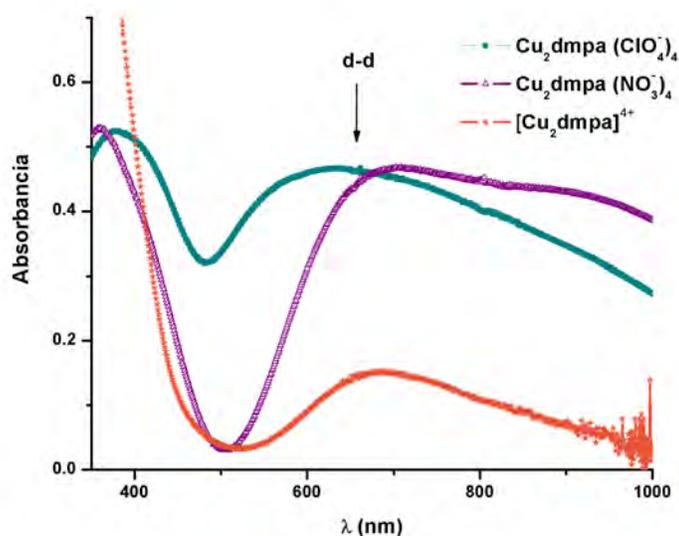


Figura 3.2.8. Espectros electrónicos UV-Vis en estado sólido por reflectancia difusa de los complejos (■) $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (△) $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ y en disolución 1 mM en MeOH del compuesto (★) $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Para los complejos en estado sólido se observan bandas de absorción debidas a las transiciones d-d de los iones de Cu(II), en 628 nm para el complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y en 703 nm para el complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$. En el espectro electrónico de este último complejo se aprecia que esta banda no presenta una forma uniforme debido a la presencia de un máximo de menor intensidad alrededor de 900 nm. Esto sugiere la existencia de dos especies de cobre(II) con entornos de coordinación distintos, cuyas señales se encuentran traslapadas.

Este fenómeno, aunado a la dificultad en la síntesis de los complejos dinucleares de cobre(II) con este ligante, sugieren fuertemente la presencia de más de una especie compleja en equilibrio. Adicionalmente se realizaron estudios de resonancia paramagnética electrónica, presentados en la sección 3.2.2.3, que ayudan a sostener esta idea.

De los complejos dinucleares obtenidos anteriormente en el grupo de investigación, incluido el complejo presentado en este proyecto con el ligante *diep*, la esfera de coordinación de los sitios de Cu(II) se puede describir como pirámide base cuadrada con los tres átomos donadores del ligante ocupando posiciones del plano base [24,25,54,58]. En el caso de los complejos con *dmpa*, se sugiere que este ligante pueda coordinar al cobre(II) de dos maneras; una en la que los tres átomos donadores de cada sitio del ligante ocupen posiciones ecuatoriales de la pirámide de base cuadrada (Figura 3.2.9, izquierda), y otra en la que únicamente dos de los átomos donadores se encuentren en esta posición mientras que el restante, proveniente de la cadena lateral, se encuentre ocupando la posición apical de dicha geometría (Figura 3.2.9, derecha)

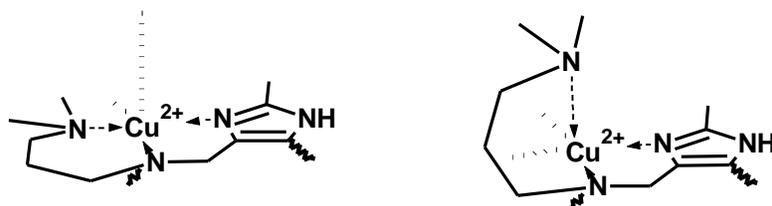


Figura 3.2.9. Representación de los posibles modos de coordinación de los centros de cobre(II) en los complejos con el ligante *dmpa*, en donde el átomo donador N de la cadena lateral del ligante se encuentra en posición ecuatorial (izquierda) o en posición apical (derecha).

Esto se sugiere con base en la longitud de la cadena lateral del ligante; la cual al poseer un átomo de carbono más que sus análogos en el grupo de trabajo [24,25,54,58], presenta mayor flexibilidad para ocupar la posición apical de la pirámide de base cuadrada con una longitud de enlace adecuada N-Cu(II). Sin embargo, este comportamiento no se observa en su análogo “largo” con el ligante *diep* estudiado en este proyecto.

Así se sugiere que en los complejos con el ligante *dmpa* existe un equilibrio entre ambos modos de coordinación, que se manifiesta como señales traslapadas en los espectros UV-Vis, en la obtención de mezclas de sólidos en la síntesis de los complejos de cobre(II) y la dificultad de obtener monocristales de éstos.

Por último concerniente a esta caracterización, se determinó del espectro adquirido del complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en disolución de metanol un valor de coeficiente de absorptividad molar a 683 nm igual a $152.13 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.2.4. Resonancia paramagnética electrónica (RPE)

Se obtuvo el espectro de resonancia paramagnética electrónica del complejo sintetizado $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en disolución congelada a 77 K de metanol. Adicionalmente se adquirió el espectro en las mismas condiciones pero de una disolución del complejo formado *in situ* a partir de cantidades estequiométricas del ligante y la sal de cobre(II).

Para complementar el estudio se obtuvo el espectro de RPE del complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$, pero a diferencia de los estudios de los complejos con percloratos que se llevaron a cabo en disolución, éste se realizó en estado sólido a temperatura ambiente ya que el complejo con nitratos es insoluble en metanol. Los resultados de dichos estudios se presentan en la Figura 3.2.10.

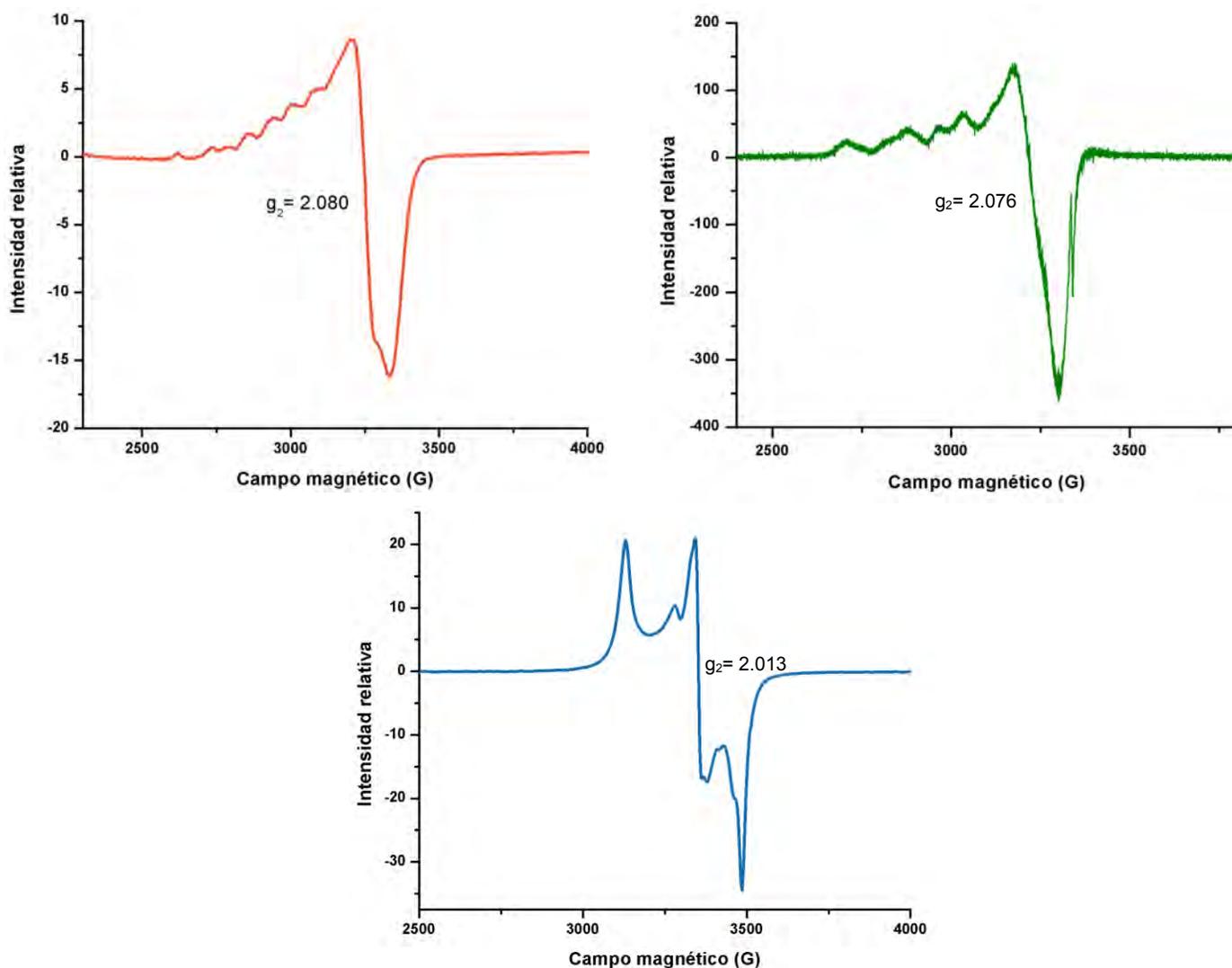


Figura 3.2.10. Arriba: Espectros de RPE de disolución congelada de metanol del complejo sintetizado $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (izquierda) y del complejo formado *in situ* (derecha).

Abajo: Espectro de RPE del complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ en estado sólido a temperatura ambiente.

Al comparar los espectros obtenidos en disolución del complejo con percloratos (Figura 3.2.10, arriba), se observa que ambos presentan una estructura hiperfina no resuelta; siendo más notorias estas anomalías para el complejo formado *in situ* en comparación con el espectro del complejo redisuleto $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Por otro lado, el espectro rómbico obtenido del complejo con nitratos $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{NO}_3)_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Figura 3.2.10, abajo) también muestra irregularidades en las señales.

Este comportamiento en resonancia paramagnética electrónica indica la presencia de más de una especie magnética en los complejos con el ligante *dmpa*; que en concordancia con los estudios UV-Vis, sugiere una vez más la existencia de dos especies de cobre(II) en equilibrio con entornos de coordinación no equivalentes.

Así se tiene una evidencia adicional para sugerir que el ligante *dmpa* puede coordinar de dos maneras a los átomos de cobre(II); ya sea con el átomo donador de la cadena lateral en la posición apical o en posición ecuatorial.

3.3. Especiación en disolución de los sistemas L/Cu₂L

La especiación de los sistemas en disolución resulta de gran importancia ya que los estudios catalíticos y mecanísticos de los complejos se llevan a cabo en disolución. Por lo cual, conocer la naturaleza de las especies complejas presentes a las condiciones catalíticas brinda información útil para el entendimiento de la reactividad y comportamiento de los sistemas [43,48].

Como se presentará más adelante (sección 3.4), los estudios catalíticos de los complejos descritos en este trabajo se llevaron a cabo en la mezcla de disolventes MeOH:H₂O y se observa una dependencia de la actividad de los complejos con la acidez del medio. Por tal motivo la especiación de estos sistemas en disolución se realizó mediante estudios potenciométricos en ese mismo medio y en función del pH. Sin embargo, para realizar determinaciones de pH en este medio se requirió de un tratamiento para la calibración del electrodo, mismo que se detalla en el capítulo 5.

Los datos obtenidos de dichos estudios se analizaron con el programa Hyperquad 2003 [69] y se obtuvieron los valores de las constantes de acidez de los ligantes (pK_a) y de las constantes de formación de los complejos ($\log \beta$). Este programa permite crear un modelo que ajuste una curva teórica a la curva de titulación experimental y determinar los equilibrios presentes en disolución, así como sus constantes. La decisión del mejor ajuste está regida por los parámetros estadísticos arrojados para cada refinamiento como lo son el grado de confianza, χ^2 , que se utiliza como una prueba de aleatoriedad y la desviación estándar, σ , que se refiere a la bondad de ajuste del modelo. Así, una $\chi^2 < 12.60$ y una $\sigma \approx 1$ son indicativos de un modelo estadísticamente adecuado.

Es importante mencionar que previo a los estudios potenciométricos de los ligantes y sus complejos dinucleares de cobre(II), se realizaron pruebas de solubilidad de disoluciones de estos sistemas con sales de dos contraiones distintos, nitratos y percloratos. Para esto se encontró que el sistema con el ligante *diep* precipita en un medio con percloratos, mientras que el sistema con el ligante *dmpa* en un medio con nitratos. Por esta razón, todas las disoluciones involucradas en los estudios en disolución se prepararon con nitratos para el ligante *diep* y con percloratos para el ligante *dmpa*.

Determinación de las constantes de acidez (pK_a)

Las constantes de acidez de los ligantes son necesarias para la posterior determinación de las constantes de formación de los complejos, por lo que se inició con la especiación de las especies ácidas del ligante dependientes del pH.

Es importante conocer la estructura de los ligantes para determinar el número de sitios posibles de protonación de cada uno y así diseñar más exitosamente la disolución a titular. Tanto el ligante *diep* como el ligante *dmpa* presentan 6 sitios posibles para ser protonados, provenientes de 6 átomos donadores por nitrógeno que posee cada uno de ellos (Figura 3.3.1). Por tal motivo, se prepararon disoluciones ácidas de los ligantes (L) con un exceso de ácido para asegurar la completa protonación de estos sitios ($1 \text{ eq. L} + 7 \text{ eq. H}^+$).

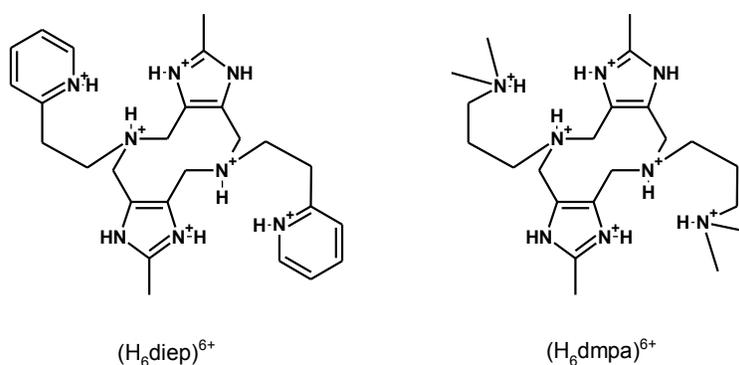


Figura 3.3.1. Estructura de los ligantes *diep* y *dmpa* totalmente protonados.

Dichas disoluciones preparadas en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v, se titularon por triplicado mediante adiciones de 0.01 mL de una disolución acuosa de NaOH 0.01070 M libre de carbonatos, a temperatura y fuerza iónica constante ($25 (\pm 0.05) ^\circ\text{C}$ y 0.1 M respectivamente).

A continuación se presentan las curvas de valoración de los ligantes *diep* y *dmpa* totalmente protonados con un exceso de un equivalente de ácido y su comparación con la titulación de 7 equivalentes de H^+ estandarizado.

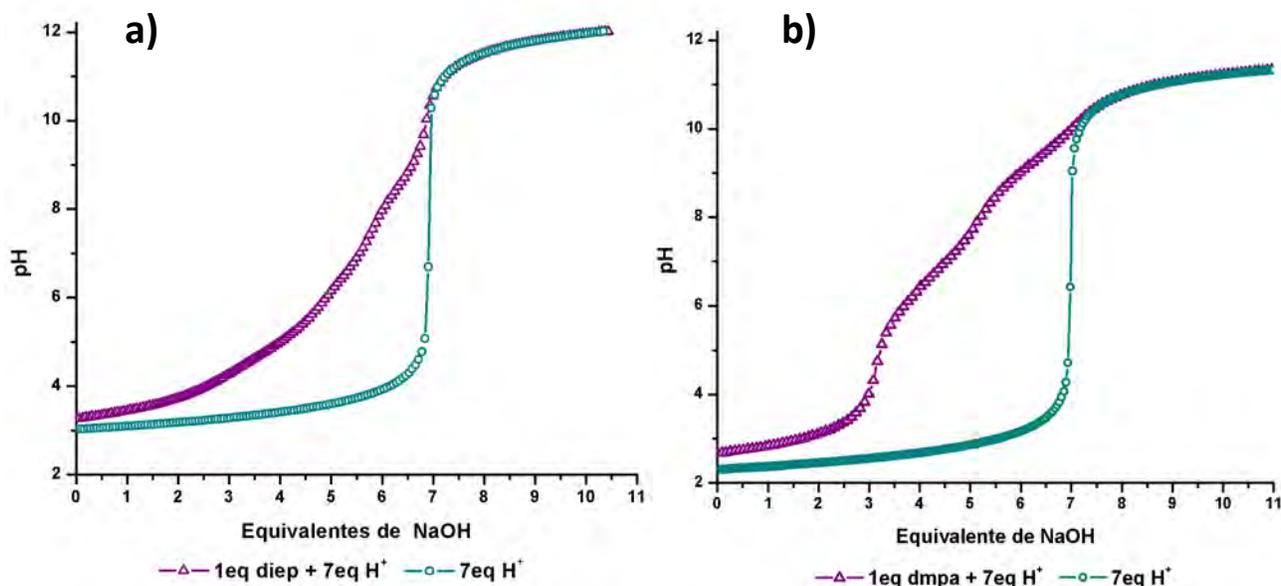


Figura 3.3.2. Curvas de titulación de una disolución 1mM de L + 7equivalentes de H^+ y una disolución 7mM de H^+ estandarizado; ambas en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v, a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M. **a)** L=diep, $H^+=HNO_3$ y fuerza iónica 0.1 M de KNO_3 , **b)** L=dmpa, $H^+=HClO_4$ y fuerza iónica 0.1M de $NaClO_4$.

En ambas gráficas, **a)** y **b)**, se puede apreciar que la parte final de la titulación de la disolución del ligante coincide con la titulación de 7 equivalentes de ácido fuerte, lo que demuestra que se titularon por completo los equivalentes de ácido agregados a la disolución del ligante.

También es posible observar en ambos casos que el pH inicial de la disolución del ligante es superior al pH inicial de la disolución de ácido fuerte. Esto se debe a que a pesar de que ambas disoluciones tienen la misma acidez total, la acidez libre es distinta. La disolución del ligante, al estar éste protonado, presenta una menor concentración de iones libres H^+ en comparación con la disolución de ácido fuerte, generando así un valor inferior de pH para esta última.

Por otro lado, si ahora se comparan entre ellas las gráficas **a)** y **b)** de la Figura 3.3.2, se puede notar que las curvas de titulación, tanto del ligante como del ácido fuerte, inician en un valor menor de pH para el sistema con el ligante *dmpa* (gráfica b). La diferencia radica en los ácidos empleados para la preparación de las disoluciones; y es que, aunque tanto el ácido nítrico como el ácido perclórico se consideran ácidos fuertes en agua, en el medio en el que se llevaron a cabo los estudios potenciométricos, MeOH:H₂O 1:1 v/v, es posible observar una diferencia de acidez de estos ácidos, siendo en este medio el ácido perclórico el más fuerte. De esta manera, el ácido perclórico se desprotona en mayor proporción que el ácido nítrico generando un pH inicial menor para el sistema con perclórico.

Una evidencia adicional de la diferencia del nivel de acidez de estos ácidos en MeOH:H₂O se tiene al poder refinar una constante de equilibrio para la desprotonación de ambos ácidos. Este refinamiento se ha obtenido en el grupo de trabajo mediante la titulación del ácido fuerte con NaOH en la mezcla de disolventes. Los datos potenciométricos se analizan mediante el programa Hyperquad 2003; con el cual al proponer un modelo que considera el equilibrio de disociación del ácido, se obtiene valor de pK_a para cada uno de los ácidos.

De dicho refinamiento se ha encontrado un valor de pK_a mayor para el ácido nítrico (pK_a = 2.60) en comparación del encontrado para el ácido perclórico (pK_a = 1.86).

A partir de los datos potenciométricos obtenidos para cada ligante se obtuvieron las constantes de acidez de éstos por medio del programa Hyperquad 2003. En la tabla 3.3.1 se presentan los valores obtenidos de dichos refinamientos y en la Figura 3.3.3 los diagramas de distribución de especies trazados a partir de estos datos mediante el programa MEDUSA [68].

	<i>diep</i>	<i>dmpa</i>
	$\chi^2 = 12.54$ $\sigma = 1.3$	$\chi^2 = 6.24$ $\sigma = 0.97$
	pK _w = 14.52 ± 0.002	pK _w = 13.78 ± 0.002
Equilibrio	pK _a	
1. (H ₆ L) ⁶⁺ ⇌ (H ₅ L) ⁵⁺ + H ⁺	3.57 ± 0.05	5.23
2. (H ₅ L) ⁵⁺ ⇌ (H ₄ L) ⁴⁺ + H ⁺	3.73 ± 0.06	---
3. (H ₄ L) ⁴⁺ ⇌ (H ₃ L) ³⁺ + H ⁺	4.63 ± 0.04	5.74
4. (H ₃ L) ³⁺ ⇌ (H ₂ L) ²⁺ + H ⁺	5.33 ± 0.04	6.91
5. (H ₂ L) ²⁺ ⇌ (HL) ⁺ + H ⁺	6.90 ± 0.03	8.55
6. (HL) ⁺ ⇌ L + H ⁺	8.88 ± 0.02	9.44

Tabla 3.3.1. Valores de pK_a obtenidos para los ligantes *diep* y *dmpa* en MeOH:H₂O 1:1 v/v a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M.

Del refinamiento con el ligante *diep* fue posible determinar 6 constantes sucesivas de desprotonación del ligante, mientras que para el ligante *dmpa* únicamente se determinaron 5 constantes de este tipo. Sin embargo, el valor obtenido de pK_{a1} de (H₆*dmpa*)⁶⁺ es lo suficientemente grande como para involucrar dos desprotonaciones equivalentes de este ligante.

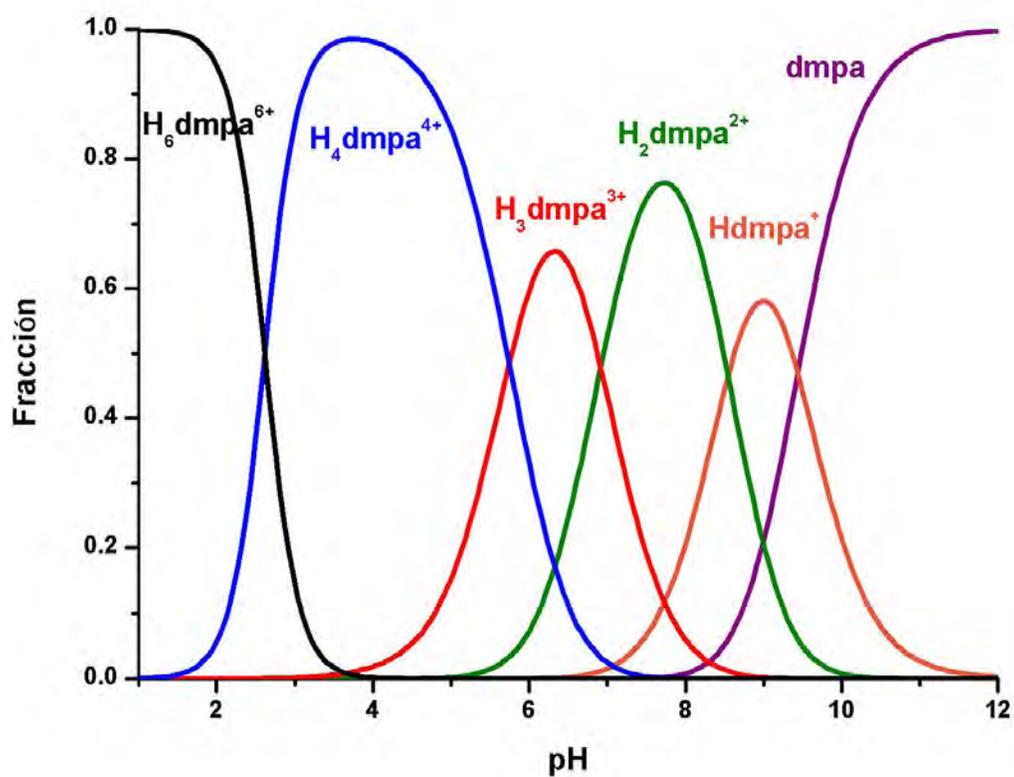
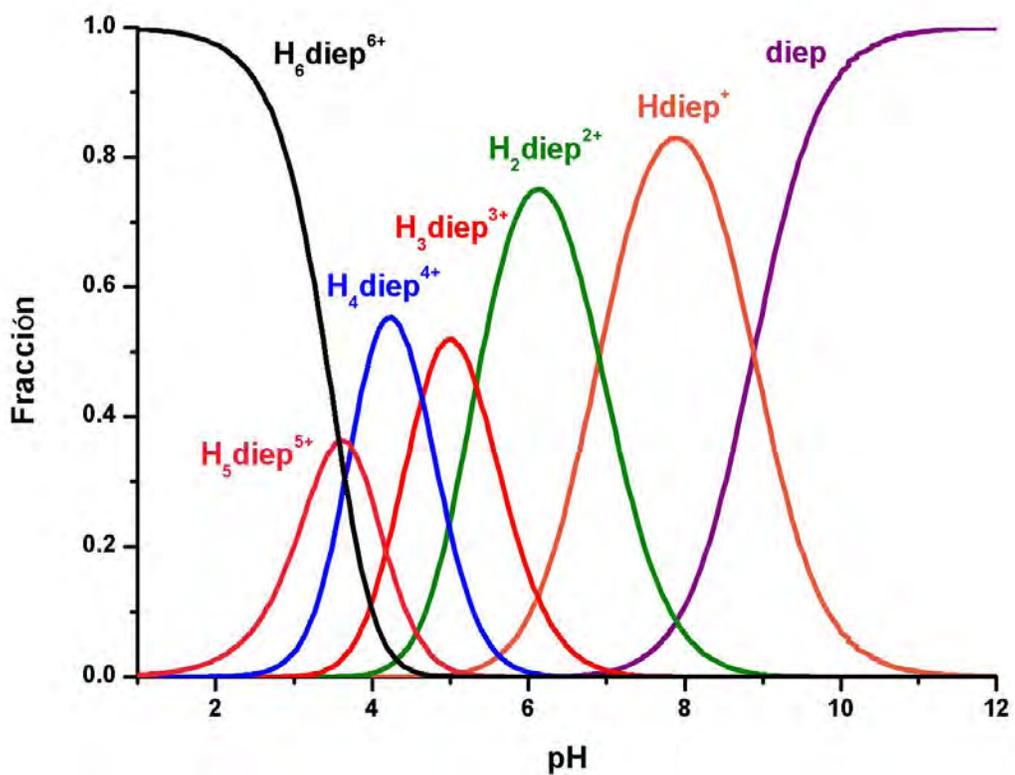


Figura 3.3.3. Diagramas de distribución de especies para los ligantes diep (superior) y dmpa (inferior) en MeOH:H₂O 1:1, con [L]=1 mM a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M.

Cabe mencionar que estos estudios no brindan información suficiente para la asignación de las constantes de acidez a los sitios protonables de cada ligante. Sin embargo es posible proponerlas con base en los valores descritos en la literatura para estos sitios [69].

El ligante *diep* contiene dos grupos piridínicos, que se sabe, presentan carácter básico debido al par electrónico libre del átomo de nitrógeno y un valor de pK_a alrededor de 5. También se observa la presencia de aminas terciarias provenientes de la diazecina, las cuales tienen valores de pK_a cercanos a 9. Por último se observa la presencia de anillos imidazólicos cuyos átomos de nitrógeno presentan valores de pK_a alrededor de 6, para el átomo de nitrógeno no protonado y superiores a 14, para el sitio protonado, el cual no se alcanzó a observar en la titulación potenciométrica. Estos dos últimos grupos funcionales también están presentes en el ligante *dmpa* y a diferencia del ligante *diep* que contiene piridinas, *dmpa* presenta otro grupo de aminas terciarias en la cadena lateral provenientes de la dimetilamina.

En la Tabla 3.3.2 y la Figura 3.3.4 se presentan las asignaciones de las constantes de acidez propuestas para cada ligante.

pK_a	Grupo	
	<i>diep</i>	<i>dmpa</i>
1. $(H_6L)^{6+}/(H_5L)^{5+}$	N-Piridinas	N-imidazoles
2. $(H_5L)^{5+}/(H_4L)^{4+}$		
3. $(H_4L)^{4+}/(H_3L)^{3+}$	N-imidazoles	N-dimetilaminas
4. $(H_3L)^{3+}/(H_2L)^{2+}$	N-diazecinas	N-diazecinas
5. $(H_2L)^{2+}/(HL)^+$		
6. $(HL)^+ / L$		

Tabla 3.3.2. Asignaciones propuestas de los pK_a s obtenidos para los ligantes *diep* y *dmpa*.

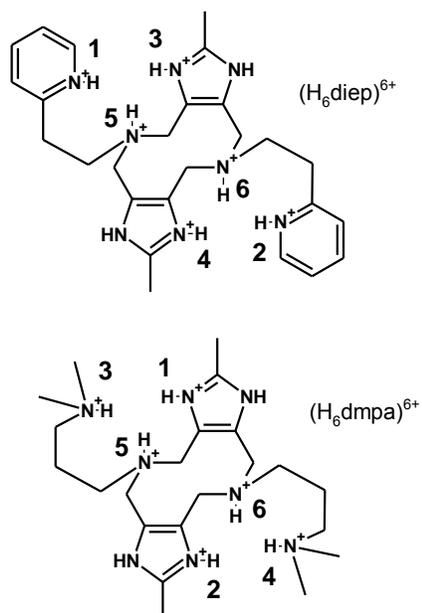


Figura 3.3.4. Asignaciones propuestas de los pK_a s obtenidos para los ligantes *diep* y *dmpa*.

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

Para la determinación de la composición de los complejos de Cu(II) en solución MeOH:H₂O, se realizaron nuevamente titulaciones potenciométricas de disoluciones 1mM de los complejos dinucleares formados *in situ*, con 7 equivalentes de ácido en la mezcla de disolventes 1:1 (1eq L + 2eq Cu²⁺ + 7eq H⁺). Éstas se realizaron por triplicado mediante adiciones de 0.01 mL de una disolución acuosa de NaOH estandarizada y libre de carbonatos, a 25 °C y fuerza iónica constante 0.1 M.

En la Figura 3.3.5 se muestran las curvas potenciométricas de los sistemas de los ligantes *diep* y *dmpa* en presencia de iones metálicos y se comparan tanto con la curva obtenida anteriormente de la disolución ácida del ligante, como con la titulación de 7 equivalentes de ácido estandarizado.

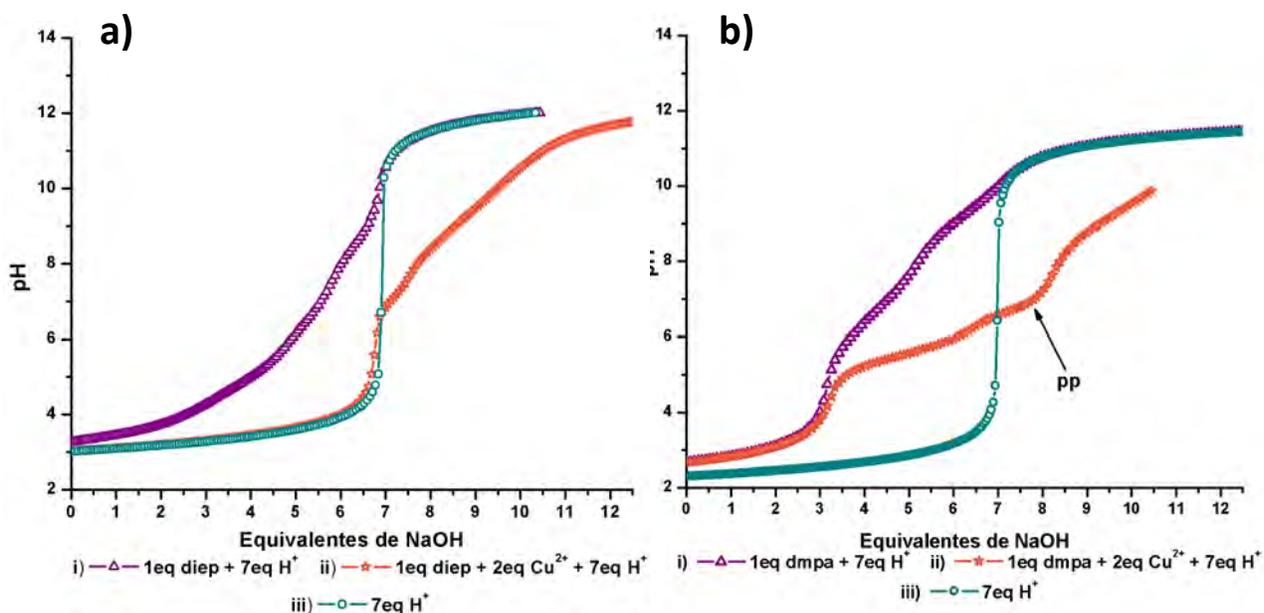


Figura 3.3.5. Curvas de titulación de disoluciones 1 mM de L + 7equivalentes de H⁺ en ausencia (i) y presencia de Cu²⁺ (2 mM) (ii), y una disolución 7mM de H⁺ estandarizado (iii); todas en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v, a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M. **a)** L=diep, H⁺=HNO₃ y fuerza iónica 0.1 M de KNO₃, **b)** L=dmpa, H⁺= HClO₄ y fuerza iónica 0.1M de NaClO₄.

En estas curvas es posible notar nuevamente la diferencia del nivel de acidez de los ácidos HClO₄ y HNO₃ en la mezcla de disolventes, al observarse un pH inicial menor en las curvas de titulación

llevadas a cabo con ácido perclórico; demostrando así una fuerza superior de este ácido en este medio.

Al analizar la gráfica de la titulación del sistema con el ligante *diep* (Figura 3.3.5 a)) se pueden observar los siguientes puntos:

1. Al comparar la parte inicial de las tres titulaciones (i), (ii), (iii)), se pueden apreciar diferencias en el pH inicial de las disoluciones, siendo estos valores iguales para las titulaciones de *diep* con iones metálicos (ii) y ácido nítrico (iii), y estos a su vez menores que para la titulación del ligante en ausencia del metal (i). **(pH inicial: (i) > (ii)=(iii))**

Un valor de pH inicial mayor para la curva de titulación del ligante en ausencia del metal (i) se debe a la menor cantidad de iones libres H^+ a consecuencia de la protonación del ligante. Por otro lado, la igualdad del pH inicial de las curvas (ii) y (iii) indica que en la disolución del sistema en presencia de Cu^{2+} , el ligante se desprotona completamente para coordinar a los iones metálicos, generando que los equivalentes de ácido presentes en ésta se encuentren como protones libres al igual que en la disolución de HNO_3 7 mM.

2. Comparando la curva de siete equivalentes de ácido (iii) con la curva de *diep* en presencia de Cu^{2+} (ii), se aprecia que ambas difieren después de la adición de 7 equivalentes de NaOH, observándose para esta última la titulación de hasta 4 equivalentes más para alcanzar un valor de pH equivalente al de las curvas (i) y (ii) en la parte final de la titulación.

Así, se titulan los siete equivalentes de ácido añadidos como ácido libre y posteriormente 4 equivalentes adicionales provenientes de la desprotonación completa del complejo dinuclear de cobre(II).

Ahora bien, si observamos detalladamente la gráfica de titulaciones del sistema con el ligante *dmpa* (Figura 3.3.5 b)) se observan marcadas diferencias en comparación de su análogo con el ligante *diep*. Del análisis estas curvas se puede destacar lo siguiente:

1. Al igual que en la Figura 3.3.5 a), se observan diferencias en el pH inicial de las tres curvas (i), (ii), (iii). Sin embargo, en este caso, los valores son iguales para las titulaciones del ligante en ausencia (i) y presencia (ii) de iones metálicos, y éstos a su vez mayores al de la titulación de 7 equivalentes de $HClO_4$. **(pH inicial: (i)=(ii) > (iii))**

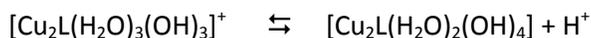
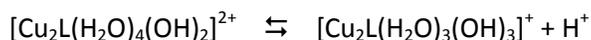
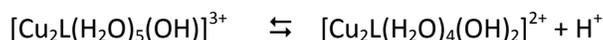
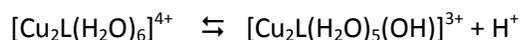
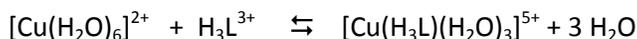
Como ya se había mencionado anteriormente en la determinación de constantes de acidez de este ligante, la diferencia del pH inicial entre las curvas (i) y (iii) se debe a la menor cantidad de iones libres H^+ en la disolución (i) a causa de la protonación del ligante. Que ahora el pH inicial sea igual en las curvas del ligante *dmpa* en ausencia y presencia de Cu^{2+} , indica que la presencia de estos iones metálicos no desplaza a los protones de los sitios básicos del ligante.

2. Al comparar el trascurso de las curvas (i) y (ii) en función de los equivalentes añadidos de NaOH se puede apreciar que presentan diferencias después de la adición del tercer

equivalente, debido probablemente a la coordinación de los iones metálicos al ligante. En esta última curva de titulación se alcanzan a valorar hasta 8 equivalentes antes de llegar a la precipitación (pp), hecho que no se observó en la titulación con el ligante *diep*, en donde se alcanzó a titular hasta 11 equivalentes. Así, en el caso del sistema con el ligante *dmpa* se titulan los equivalentes de ácido añadidos y únicamente 2 adicionales de la desprotonación del complejo.

A partir de los datos obtenidos de las titulaciones potenciométricas y una vez determinadas las constantes de acidez de los ligantes *diep* y *dmpa* en MeOH:H₂O, se realizó el ajuste y refinamiento de las constantes de formación (log β) de los complejos de Cu(II) por medio del programa Hyperquad 2003. Los resultados obtenidos de este análisis se presentan en la tabla 3.3.3, a partir de los cuales se pueden conocer los valores de las constantes de acidez para los equilibrios de hidrólisis de los complejos.

Los equilibrios correspondientes a la formación de los complejos y sus hidrólisis sucesivas se muestran a continuación:



$\beta_{xyz} = \frac{[\text{Cu}_x^{2+}\text{H}_y\text{L}_z]}{[\text{Cu}^{2+}]^x[\text{H}]^y[\text{L}]^z}$		$K_a^{(i)} = \frac{[\text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_2\text{O})_{6-i}(\text{OH})_i][\text{H}^+]}{[\text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_2\text{O})_{6-i+1}(\text{OH})_{i-1}]}$	
<i>diep</i>		<i>dmpa</i>	
Log $\beta_{131} = 26.42 \pm 0.01$		Log $\beta_{131} = 27.54 \pm 0.04$	
Log $\beta_{201} = 19.07 \pm 0.01$		Log $\beta_{201} = 14.24 \pm 0.03$	
Log $\beta_{2-11} = 11.50 \pm 0.02$	$\text{p}K_a^{(1)} = 7.57$	---	
Log $\beta_{2-21} = 2.63 \pm 0.02$	$\text{p}K_a^{(2)} = 8.87$	Log $\beta_{2-21} = 0.40 \pm 0.02$	$\text{p}K_a^{(2)} = 6.92$
Log $\beta_{2-31} = -7.13 \pm 0.02$	$\text{p}K_a^{(3)} = 9.76$	---	
Log $\beta_{2-41} = -18.10 \pm 0.03$	$\text{p}K_a^{(4)} = 10.97$	---	

Tabla 3.3.3. Valores de $\log \beta$ y $\text{p}K_a$ obtenidos para los complejos de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M.

En la Figura 3.3.6 se presentan los diagramas de distribución de especies trazados con el programa MEDUSA. Adicionalmente se presentan en la misma Figura los diagramas de distribución de los complejos dinucleares análogos con los ligantes *dimp* [25] y *dimeim* [24].

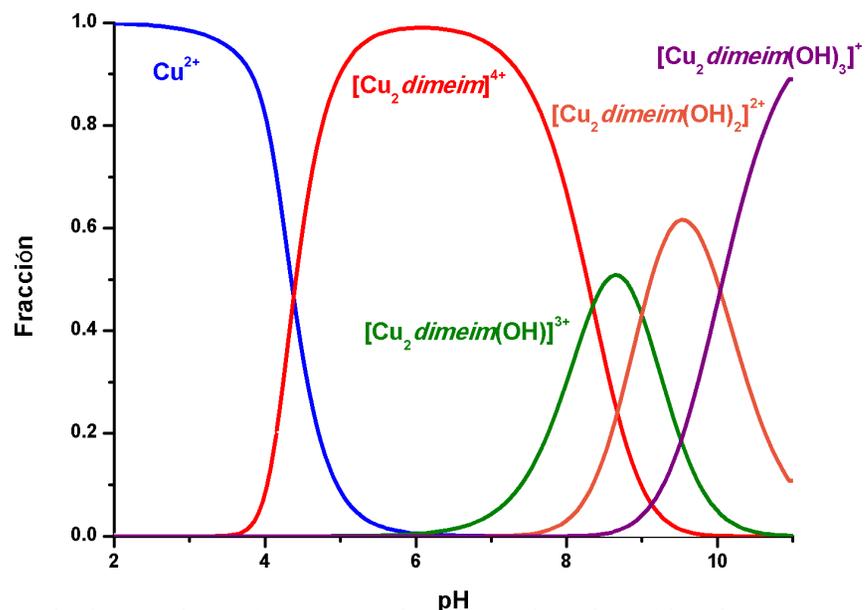
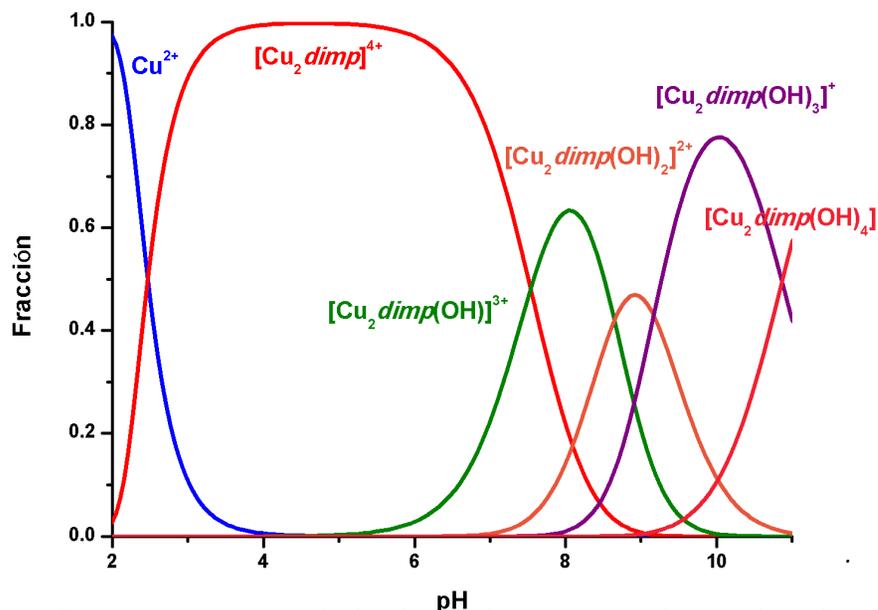
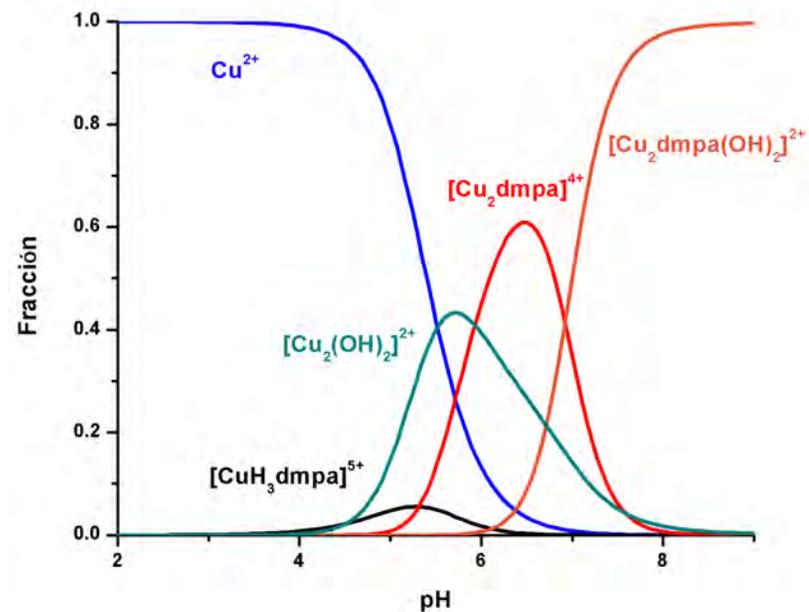
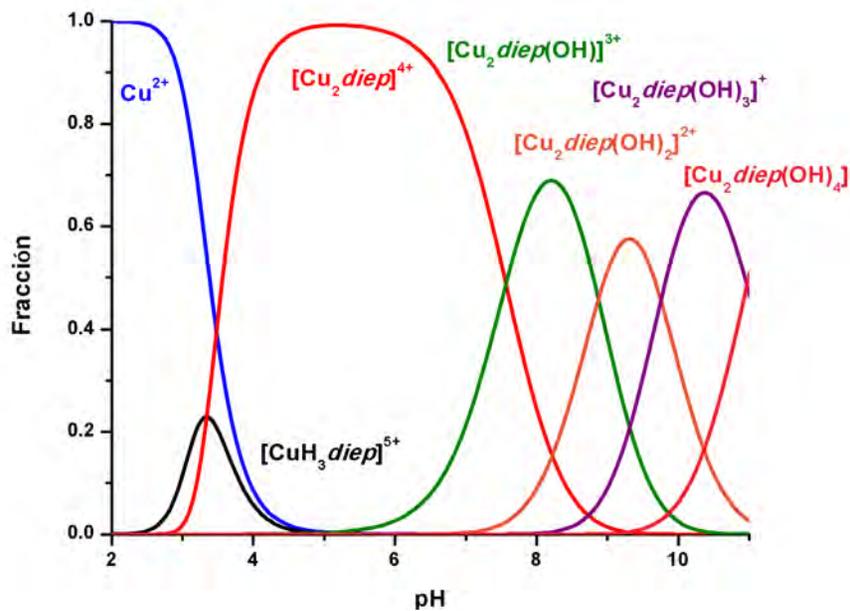


Figura 3.4.6. Diagramas de distribución de especies para los complejos de Cu(II) con los ligantes largos (superiores): diep (izquierda) y dmpa (derecha) en MeOH:H₂O1:1, con [L]=1 mM y [Cu²⁺]=2 mM a 25 °C y fuerza iónica 0.1 M. Diagramas de distribución de especies para los complejos de Cu(II) con los ligantes cortos (inferiores): dimp (izquierda) [25] y dimeim (derecha) [24].

Al comparar entre los diagramas de distribución de especies del sistema con el ligante *diep* y del sistema con el ligante *dmpa*, se observa que la formación del complejo dinuclear de cobre(II) comienza a valores de pH inferiores para el sistema con el ligante de grupos piridínicos (*diep*). De igual manera, al comparar entre sus análogos de cadena lateral más corta (*dimp* y *dimeim*), se observa el mismo patrón; el complejo dinuclear del ligante con átomos donadores nitrógeno provenientes de piridinas (*dimp*), comienza a predominar en la disolución a valores de pH más ácidos que el complejo dinuclear con el ligante con átomos donadores por nitrógeno de amina terciaria (*dimeim*). Esto nos habla de una mayor estabilidad de los complejos dinucleares con ligantes piridínicos a valores menores de pH en comparación con los complejos dinucleares con ligantes de amina terciaria.

Ahora bien, al comparar entre los sistemas del mismo grupo donador (piridina o dimetilamina), se puede apreciar que los complejos dinucleares de los ligantes de cadena lateral más corta (*dimp* y *dimeim*) comienzan a formarse a valores de pH inferiores que sus análogos de cadena larga (*diep* y *dmpa*), siendo el sistema con el ligante *dimp* el más estable a estos valores de pH y el sistema con el ligante *dmpa* el menos estable.

Los diagramas de distribución de especies de los sistemas análogos *diep* y *dimp*, que contienen los mismos átomos donadores, pero distinto tamaño de anillo quelato, son muy semejantes entre sí, con las diferencias que ya se señalaron anteriormente. Por el contrario, los sistemas *dmpa* y *dimeim*, que también difieren en el tamaño de la cadena lateral, presentan diagramas muy distintos. En el diagrama del sistema con *dmpa*, se observa que el complejo dinuclear de cobre comienza a tener una fracción significativa hasta pH 6.0 (predominio del 20 %), alcanzando su máximo de abundancia (60 %) a pH 6.5, e hidrolizándose significativamente a pH 7.0. Por el contrario, el complejo dinuclear con *dimeim* predomina en un 100 % en el intervalo de pH 5.5 a 6.5, la primera especie hidrolizada comienza a predominar hasta pH 8.0 y pueden determinarse hasta 3 especies hidrolizadas del complejo dinuclear de cobre(II), a diferencia del sistema con *dmpa*, en el cual sólo es posible identificar una especie hidrolizada del complejo dinuclear debido a la precipitación del sistema a pH cercano a 8.5.

3.4. Estudios cinéticos y mecanísticos de los complejos $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$

Con la finalidad de entender las propiedades catalíticas de la enzima catecol oxidasa, en los últimos años se han estudiado una gran variedad de compuestos de cobre como sistemas biomiméticos de ésta frente a reacciones de oxidación de catecoles.

Los estudios catalíticos realizados para los compuestos modelo descritos en literatura pueden agruparse conforme al enfoque de estudio de acuerdo a Reedijk [26] en cuatro grupos distintos; 1) estudios de la unión del sustrato, 2) estudios de la relación estructura actividad, 3) estudios cinéticos y 4) estudios estequiométricos.

En el grupo de investigación se han realizado estudios cinéticos de diversos compuestos dinucleares de cobre con átomos metálicos distantes, que consisten en la evaluación de la actividad catalítica de éstos frente a la reacción de oxidación del sustrato modelo 3,5-di-*ter*-butilcatecol (H_2DTBC) a 3,5-di-*ter*-butil-*o*-benzoquinona (DTBQ), de los cuales se han obtenido actividades catecolasa importantes.

Recientemente se han realizado estudios comparativos de compuestos análogos en los que se varía la naturaleza del grupo donador con la finalidad de entender los factores estructurales que rigen la actividad de estos compuestos. Dentro de este mismo enfoque, ahora se pretende evaluar el efecto del tamaño del anillo quelato en la actividad catecolasa, a través del estudio cinético de complejos análogos en los que se ha alargado en un átomo de carbono la cadena lateral. Así, se realizaron los estudios cinéticos de los complejos de cobre con los ligantes *diep* y *dmpa* frente a la reacción de oxidación de H_2DTBC en condiciones equivalentes a las utilizadas anteriormente para los sistemas análogos cortos *dimp* y *dimeim* [24,25]. Se pretende concluir acerca de los factores que rigen la actividad de estos sistemas.

Además para conocer más acerca del mecanismo de acción de estos sistemas, los estudios mecanísticos se extendieron más allá de los estudios cinéticos y se realizaron estudios de la interacción del sustrato con el catalizador y estudios de la reacción estequiométrica entre estas dos especies en condiciones anaerobias, así como estudios de identificación del producto de la reducción del oxígeno molecular, para determinar si se trata de agua o de peróxido de hidrógeno.

Parte muy importante para el entendimiento de la actividad catalítica de estos sistemas es la caracterización de éstos en el mismo medio de reacción. La información obtenida de los estudios catalíticos conjuntamente con la especiación realizada en el mismo medio, nos permitirá asignar posteriormente una especie responsable de dicha actividad.

3.4.1. Evaluación de la actividad catecolasa

Una vez realizada la especiación en disolución de MeOH:H₂O 1:1 v/v de los sistemas Cu₂L, se realizaron estudios espectrofotométricos de la oxidación del sustrato modelo H₂DTBC (Figura 3.4.1), catalizada por los complejos de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* en el mismo medio; monitoreando el incremento en la absorbancia a 400 nm correspondiente a la formación del producto DTBQ ($\epsilon_0 = 1627 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en MeOH:H₂O 1:1 v/v).

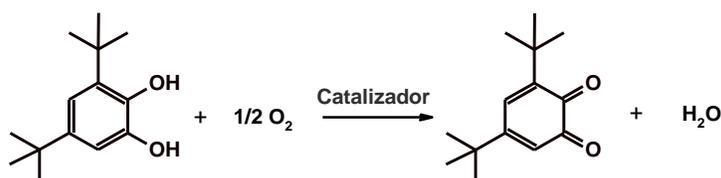


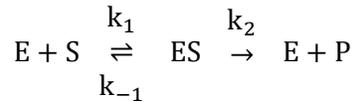
Figura 3.4.1. Esquema de reacción de oxidación de 3,5-di-tert-butilcatecol.

La reacción de oxidación del H₂DTBC a DTBQ en presencia de oxígeno molecular es ampliamente utilizada para la evaluación de la actividad catecolasa de una variedad de sistemas modelo o biomiméticos debido a su bajo potencial redox ($E_{\text{pirocatecol}} = -0.046 \text{ V}$, $E_{\text{H}_2\text{DTBC}} = -0.222 \text{ V}$; vs. Ag/AgCl [44]), la minimización de reacciones laterales gracias al impedimento estérico de los grupos terbutilo y a la facilidad de seguimiento espectrofotométrico del producto de reacción, DTBQ.

Esta reacción modelo se ha empleado anteriormente para la evaluación de la actividad catecolasa de los complejos de cobre(II) desarrollados en el grupo de investigación [57-64]. Para los cuales, se ha encontrado un comportamiento tipo Michaelis-Menten al variar la concentración del sustrato. Para el estudio cinético de los complejos de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* se propone el mismo modelo enzimático.

El modelo Michaelis-Menten [70,71] es aplicable a la explicación de la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas donde se observa un comportamiento de saturación con el sustrato: a concentraciones bajas de sustrato la velocidad inicial de reacción v_0 es proporcional a la concentración de éste y se considera que la reacción es de primer orden. Al incrementarse la concentración de sustrato, la velocidad inicial disminuye hasta llegar a ser prácticamente independiente de la concentración de éste y aproximarse asintóticamente a una velocidad constante, para lo que se considera un orden de reacción igual a cero.

Este modelo considera dos etapas para el proceso catalítico; la primera donde se produce el complejo catalizador-sustrato (ES) de manera reversible y la segunda donde se forma del producto (P) y se regenera el catalizador (E).



Donde la concentración total del catalizador $[E]_T$, se encuentra en forma libre $[E]$ y en forma del complejo ($[E]_T = [E] + [ES]$)

En este modelo se considera que la segunda etapa para la formación del producto es irreversible ya que en los primeros instantes de la reacción, cuando se evalúa la velocidad inicial, la cantidad de producto acumulado es mínima y puede despreciarse la reacción inversa. También considera la aproximación del estado estacionario, donde se asume que la concentración de ES no cambia con el tiempo, lo que indica que la velocidad de formación y de desintegración del complejo son iguales, es decir:

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Al reordenar la ecuación anterior se obtiene la constante de Michaelis-Menten (K_M):

$$\frac{[S]([E]_T - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1}k_2}{k_1} = K_M$$

De donde se puede despejar $[ES]$ para obtener:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$

Por último, el modelo considera que la reacción está limitada por la segunda etapa de la reacción catalítica que involucra la desintegración del complejo ES. Así, si la $[ES]$ es constante, la velocidad inicial se puede expresar como $v_0 = k_2[ES]$. Por tanto la ecuación de velocidad es la siguiente:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$

Cuando la concentración del sustrato es tan alta que prácticamente todo el catalizador se encuentra en la forma del complejo ES, se alcanza una velocidad máxima o de saturación, en donde $V_{max} = k_2[E]_T$. Al sustituir ésta en la expresión de la velocidad inicial se obtiene la ecuación de Michaelis Menten.

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

Tomando en cuenta este modelo enzimático, para la determinación de los parámetros cinéticos se empleó el método de las velocidades iniciales, ya que, como se ha mencionado antes, en los primeros instantes de la reacción la concentración del producto formado es muy pequeña y puede considerarse que la reacción inversa a la formación de éste es nula. Las velocidades iniciales (v_0) se determinaron de la pendiente de la gráfica de absorción a 400 nm durante los primeros segundos de la reacción, cuando la absorbancia a esta longitud de onda aumentaba linealmente.

Los estudios cinéticos consistieron en los siguientes puntos:

1. Efecto de la variación del pH en la velocidad inicial de reacción. Esto se evaluó con la finalidad de determinar el valor de pH al cual la actividad catalítica del complejo es mayor en comparación a la oxidación debida únicamente al medio (pH óptimo). Una vez determinado este valor, es posible identificar la especie activa en disolución al correlacionar el diagrama de distribución de especies determinado anteriormente (sección 3.3).
2. Efecto de la concentración del catalizador en la velocidad inicial de reacción. Este estudio se realizó para verificar que el comportamiento cinético es de primer orden con respecto al catalizador y se pueda emplear el modelo enzimático Michaelis-Menten.
3. Efecto de la variación de la concentración del sustrato en la velocidad inicial. Por medio de este estudio se evaluó el comportamiento de acuerdo al modelo Michaelis-Menten y se determinan los parámetros cinéticos K_M , V_{max} y k_{cat} , así como la eficiencia catalítica dada por el cociente k_{cat}/K_M , que permitirá comparar a estos sistemas con otros antes estudiados.

Es muy importante hacer notar que para estos estudios la estandarización de la metodología es primordial para la comparación posterior de los resultados obtenidos. Es de vital importancia considerar todos los factores que intervienen en la reacción catalítica para tener un mejor control de éstos. Así, todos los estudios cinéticos se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura constante $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$
- Presión atmosférica constante 0.74 atm (Cd. México)
- Medio de reacción MeOH:H₂O 1:1 v/v
- pH del medio constante mediante disoluciones amortiguadoras cuya concentración se encuentra en exceso.

Todas las mediciones se realizaron por quintuplicado y se trataron estadísticamente para la obtención de los valores de velocidad inicial promedio, con su correspondiente desviación estándar.

Efecto de la variación del pH en la velocidad de reacción.

Se ha publicado que el pH del medio puede cambiar la esfera de coordinación del complejo y por tanto sus propiedades reactivas [34,42]. Dado este antecedente, resultó importante realizar el estudio del efecto de la variación del pH en la actividad catalítica para los complejos de los ligantes *diep* y *dmpa*. En éste se mantuvieron constantes las concentraciones del catalizador (0.02 mM), del sustrato (2 mM) y de la solución amortiguadora (0.15 M); y se varió el valor de pH en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v a 25 °C.

Así, se tiene una relación de concentraciones en celda:

Sustrato: Catalizador: Amortiguador **100 : 1 : 7,500**

En la Figura 3.4.2 se muestra la gráfica de la velocidad inicial (v_0) en función del pH del medio, tanto de la reacción catalítica de cada complejo, como de la oxidación debida al medio.

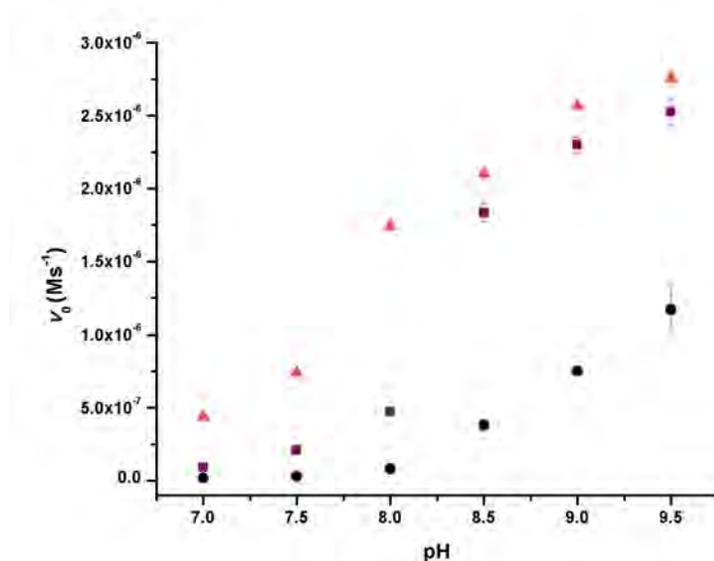


Figura 3.4.2. Dependencia de la velocidad inicial de reacción en el pH en el medio de MeOH:H₂O 1:1. (●) medio amortiguado, (■) Cu_2dmpa , (▲) Cu_2diep .

Se encontró una dependencia de la oxidación del H₂DTBC con el pH del medio, en donde se observa un incremento en la velocidad inicial de reacción a valores mayores de pH en ausencia y presencia de los complejos de cobre(II) (Figura 3.4.2). En el caso del estudio con el medio amortiguado, en ausencia de catalizador, se observa que la oxidación del sustrato comienza a aumentar a valores superiores a pH 8.0. En presencia de los complejos de cobre(II) se obtienen velocidades significativamente mayores a las obtenidas en ausencia de éstos, mostrando un incremento importante a partir de pH 8.0 para el sistema con *diep* y para el sistema con *dmpa* a partir de pH 8.5.

Para ambos sistemas se obtuvieron las diferencias de las velocidades iniciales dadas en presencia del catalizador y en ausencia de éste (Figura 3.4.3) con la finalidad de determinar el valor de pH óptimo de cada catalizador; en el cual la actividad catalítica del sistema Cu₂L es mayor en comparación a la actividad del medio.

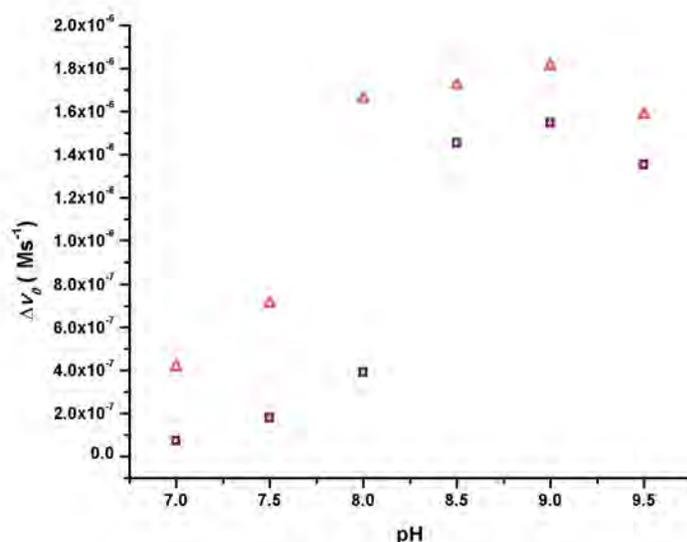


Figura 3.4.3. Diferencia de las velocidades iniciales de reacción dependientes del pH entre los sistemas en presencia y ausencia de los catalizadores con los ligandos (△) *diep* y (□) *dmpa* en MeOH:H₂O 1:1.

Se observa que la velocidad de reacción presenta un máximo alrededor de pH 9.0 para ambos catalizadores y desciende por arriba de pH 9.5. En la Figura 3.4.3 se evidencia nuevamente que el sistema con el ligante *diep* comienza a presentar mayor actividad a valores de pH inferiores en comparación con el sistema del ligante *dmpa*.

Al correlacionar estos resultados con los diagramas de distribución de especies presentados en la sección 3.3, es posible comprender esta diferencia entre los sistemas estudiados. El sistema con el ligante *diep* presenta una actividad significativa desde pH 7.0 y se incrementa considerablemente a pH 8.0. De acuerdo al diagrama de distribución de especies de este sistema, a este valor de pH comienza a predominar la especie dihidroxilada del complejo dinuclear de cobre(II). Por arriba de pH 9.5 la actividad decrece, efecto que coincide con el incremento en la proporción de la especie trihidroxilada del complejo dinuclear en el medio.

Para el sistema con el ligante *dmpa* a pH 7.0 se tiene la convivencia del complejo dinuclear de cobre(II) con la especie dihidroxilada de éste; conforme el predominio de la especie hidrolizada se incrementa, se observa un aumento en la actividad de este sistema, con un incremento significativo en la actividad a pH 8.5, al cual el predominio de la especie dihidroxilada es total.

Esto indica que los grupos OH⁻ presentes en los complejos dinucleares de cobre(II) favorecen la actividad catalítica de los compuestos al asistir la desprotonación del sustrato y favorecer su unión

a los sitios de cobre(II). Sin embargo, la presencia de más de dos grupos hidroxilo por unidad de complejo resulta en la disminución de actividad catalítica. Reportes previos de complejos de cobre(II) como sistemas biomiméticos de la catecol oxidasa también señalan un aumento en la actividad catalítica para los complejos hidrolizados [34,42,43], hecho que coincide con la estructura del estado nativo de la enzima reportada [14] que presenta un grupo OH, con la diferencia en este caso de que este grupo se encuentra puenteando a los dos sitios de Cu(II).

Así, se puede atribuir la mayor actividad catalítica de los sistemas con los ligantes *diep* y *dmpa* a la especie dihidroxilada del complejo ($[\text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^{2+}$).

A pesar de que el máximo de la velocidad para ambos sistemas se observa a pH 9.0, se decidió realizar los estudios siguientes a pH 8.5. A este valor también se tiene una predominancia significativa de la especie activa ($[\text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^{2+}$) y experimentalmente resulta más preciso ya que al ser bastante rápida la reacción a pH 9.0, los errores en las mediciones son mayores a este pH en comparación a los de pH 8.5. Por lo anterior, a partir de esta sección se considerará este último como el pH óptimo para ambos sistemas.

Efecto en la variación de la concentración del catalizador en la velocidad de reacción.

Este estudio resulta de gran importancia para conocer el orden de reacción con respecto al catalizador, ya que un comportamiento de primer orden con respecto a éste es condición necesaria para utilizar el modelo enzimático de Michaelis-Menten, sin embargo esto no asegura que el comportamiento con respecto al sustrato siga dicho modelo.

El estudio se realizó en la mezcla MeOH:H₂O 1:1, a 25 °C y al valor de pH óptimo determinado en el estudio de la variación del pH, al cual se asegura la presencia de la especie activa (pH=8.5). Se mantuvo constante este valor de pH de la disolución amortiguadora (0.15 M), la concentración del sustrato (2 mM); y se varió la concentración de los complejos dinucleares de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* (0.01 – 0.06 mM).

La relación de concentraciones para este experimento fue:

Sustrato:Catalizador:Amortiguador **300-200 : 1 : 15,000-2,500**

En la Figura 3.4.4 se presenta la variación de la velocidad inicial en función de la concentración de los complejos dinucleares de este estudio.

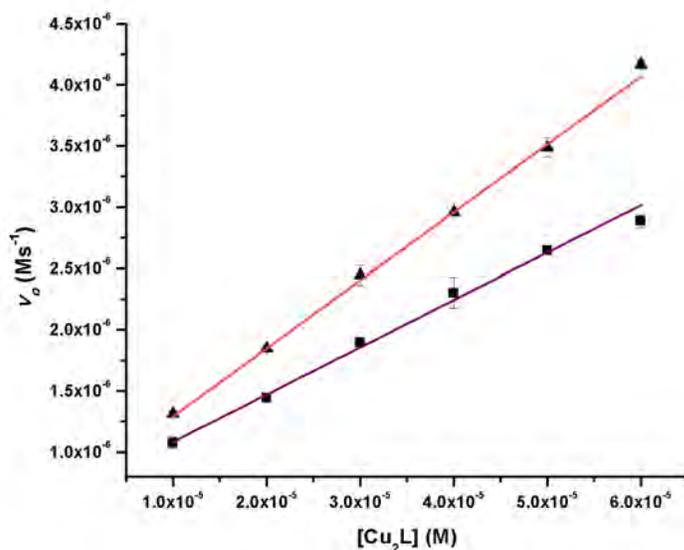


Figura 3.4.4. Dependencia de la velocidad inicial de reacción en la concentración de Cu_2L en la mezcla $MeOH:H_2O$ 1:1. Cu_2diep (▲); Cu_2dmpa (■).

Se encontró una dependencia lineal de la velocidad en la concentración de los catalizadores en todo el intervalo de concentraciones estudiado. Esto indica que el orden de reacción es de pseudo-primer orden con respecto a cada uno de los complejos, cuya ley de velocidad está dada por $v = k_{obs}[cat]$; donde k_{obs} es la constante de velocidad de primer orden observada y $[cat]$ es la concentración del catalizador.

Los valores de las constantes k_{obs} , dados por la pendiente de cada recta, se presentan en la tabla 3.4.1. Como se puede apreciar, el complejo con el ligante *diep* presenta mayor actividad catalítica sobre el complejo con el ligante *dmpa*.

Catalizador	k_{obs} (s^{-1})	R^2
Cu_2diep	0.056	0.999
Cu_2dmpa	0.039	0.994

Tabla 3.4.1. Valores de las constantes de primer orden de la variación de la concentración del catalizador en la mezcla $MeOH:H_2O$ 1:1.

Esta diferencia de actividad puede atribuirse a las diferencias en las estructuras de los ligantes. Mientras que el ligante *diep* contiene un nitrógeno aromático de la piridina como tercer átomo donador, el ligante *dmpa* un nitrógeno alifático de la dimetilamina. Está informado que los ligantes donadores por oxígeno se enlazan preferentemente a sitios de cobre(II) coordinados a ligantes aceptores- π , que a sitios coordinados a simples donadores- σ [65]; lo que coincide con el

aumento en la actividad catalítica para el sistema con el ligante *diep*. Este mismo efecto se pudo apreciar en los estudios previos de los complejos de los ligantes análogos *dimp* y *dimeim* respectivamente [24,25], donde el sistema con el ligante piridínico *dimp*, presentó mayor actividad.

Efecto en la variación de la concentración del sustrato en la velocidad de reacción.

Una vez determinado el orden de reacción de primer orden respecto a la concentración del catalizador, se evaluó el efecto de la concentración del sustrato en la velocidad inicial de reacción. Nuevamente este estudio se llevó a cabo en la mezcla MeOH:H₂O 1:1, a 25 °C, manteniendo constante en este caso el pH de la disolución amortiguadora (0.15 M, pH= 8.5) y la concentración del catalizador (0.01 mM). El intervalo de concentraciones del sustrato empleado en el estudio con cada uno de los complejos varió debido a que estos sistemas presentan saturaciones a valores distintos de concentración de sustrato. Así, los intervalos de [H₂DTBC] utilizados fueron para Cu₂*diep* 0.02 – 0.07 mM y para Cu₂*dmpa* 0.1 – 25 mM.

Así se tiene una relación de concentraciones:

Sustrato:Catalizador:Amortiguador **2-2500 : 1 : 7,500-6**

En la Figura 3.4.5 se muestran las curvas de velocidad inicial obtenidas en este estudio para cada complejo.

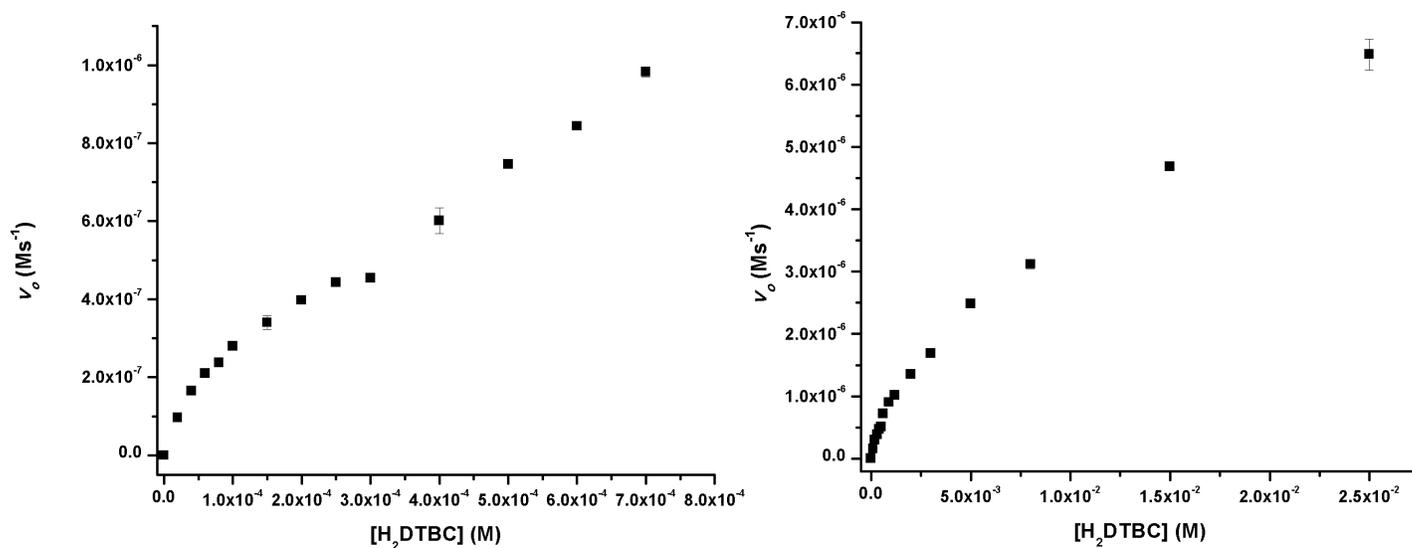


Figura 3.4.5. Dependencia de la velocidad inicial de reacción en la concentración del sustrato H₂DTBC. Izquierda: Cu₂*diep*, derecha: Cu₂*dmpa*.

En el intervalo de concentraciones en el que se realizó el estudio, se observan dos comportamientos distintos en cada caso; un comportamiento hiperbólico a concentraciones bajas de sustrato y un comportamiento lineal a altas concentraciones.

A proporciones bajas complejo:sustrato (<1:30 para el sistema con *diep* y <1:60 para el sistema con *dmpa*), la reacción muestra un comportamiento Michaelis-Menten, al presentar un efecto de saturación (Figura 3.4.6, izquierda). El ajuste no lineal de estas hipérbolas con la ecuación de Michaelis-Menten ($y = (V_{max} \times x)/(K_M + x)$), arroja los parámetros cinéticos K_M , V_{max} y k_{cat} los cuales también pueden obtenerse a partir del tratamiento de linealización de Lineweaver-Burk ($1/v_0 = (1/V_{max}) + (K_M/V_{max})(1/[Sust]_0)$) (Figura 3.4.6 derecha). En este trabajo se probaron ambos ajustes y se encontraron equivalentes al no haber diferencia en los valores obtenidos por cada uno.

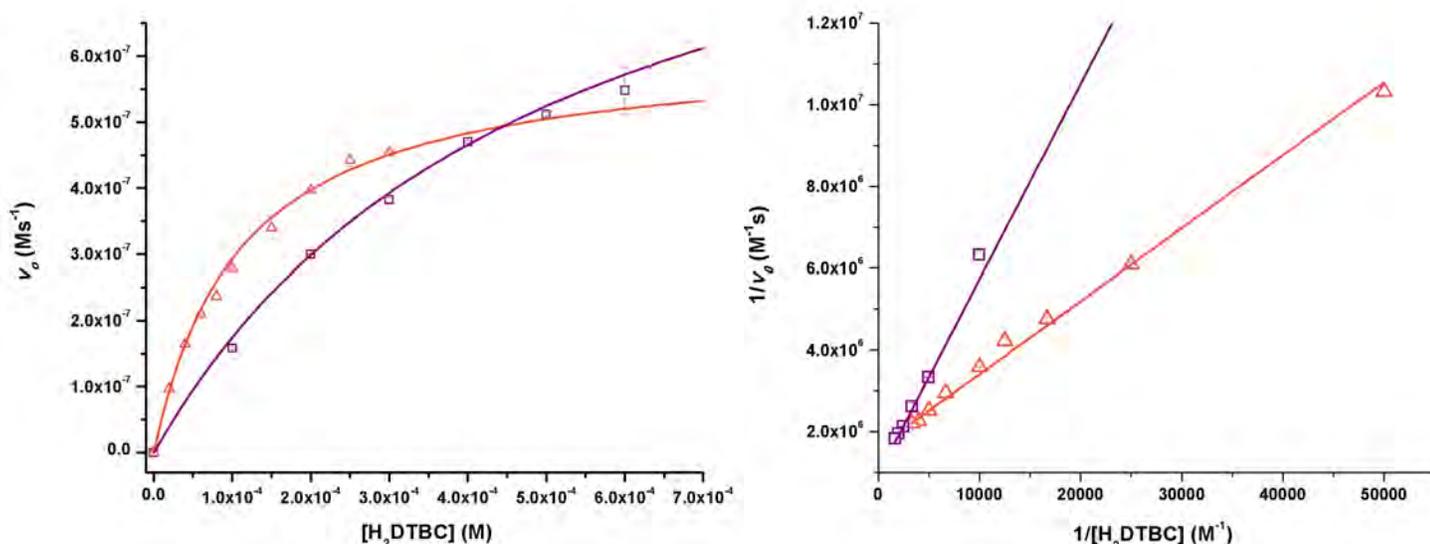


Figura 3.4.6. Izquierda: Dependencia de la velocidad inicial de reacción en la concentración del catecol para proporciones catalizador sustrato menores a 1:30 (Cu_2diep (Δ)) y menores a 1:60 (Cu_2dmpa (\square)). Las líneas representan los ajustes no lineales con la ecuación de Michaelis-Menten. Derecha: Gráfica de los recíprocos Lineweaver-Burk, Cu_2diep (Δ), Cu_2dmpa (\square) ($R^2 = 0.999$ y $R^2 = 0.996$ respectivamente).

A proporciones altas complejo:sustrato (>1:40 para el sistema con *diep* y >1:70 para sistema con *dmpa*), la reacción depende linealmente en la concentración del sustrato, con constantes de primer orden $k_3 = 1.08 \times 10^{-3} s^{-1}$ para el sistema con *diep* y $k_4 = 3.86 \times 10^{-4} s^{-1}$ para el sistema con *dmpa* ($R^2 = 0.975$ y $R^2 = 0.999$ respectivamente).

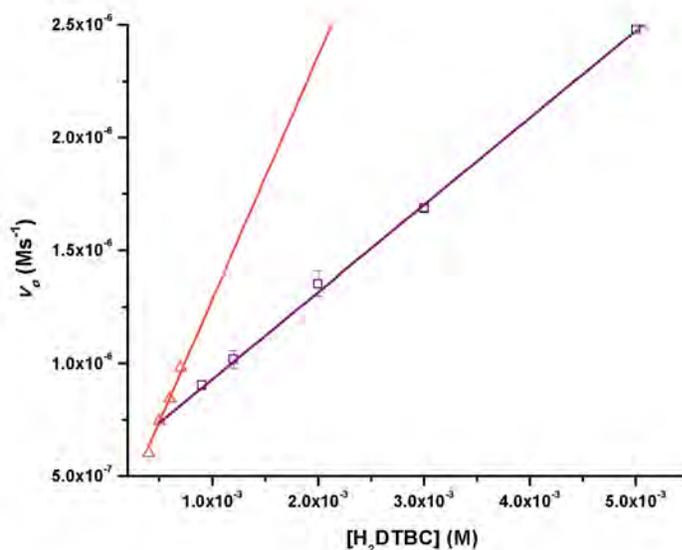


Figura 3.4.7. Dependencia de la velocidad inicial de reacción en la concentración del catecol a proporciones superiores catalizador sustrato. >1:40 (Cu_2diep (Δ)) y > 1:70 (Cu_2dmpa (\square)).

Del análisis realizado a bajas proporciones catalizador sustrato (Figura 3.4.6) se obtuvieron los parámetros cinéticos del modelo enzimático Michaelis-Menten obtenidos para la reacción catalizada por cada uno de los complejos dinucleares de cobre(II). Los valores se presentan en la siguiente tabla y se comparan con los valores publicados de sus complejos análogos con los ligandos *dimp* [25] y *dimeim* [24].

Complejo = catalizador	K_M (M)	V_{\max} (Ms^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Tipo de amina de la cadena lateral
Cu_2diep	1.10E-04	6.17E-07	0.0617	560.91	Aromática (R-piridina)
Cu_2dimp [25]	5.16E-04	2.36E-06	0.0788	152.71	
Cu_2dmpa	5.04E-04	1.05E-06	0.1054	209.13	Alifática (R-dimetilamina)
Cu_2dimeim [24]	1.60E-03	3.25E-06	0.1083	67.69	

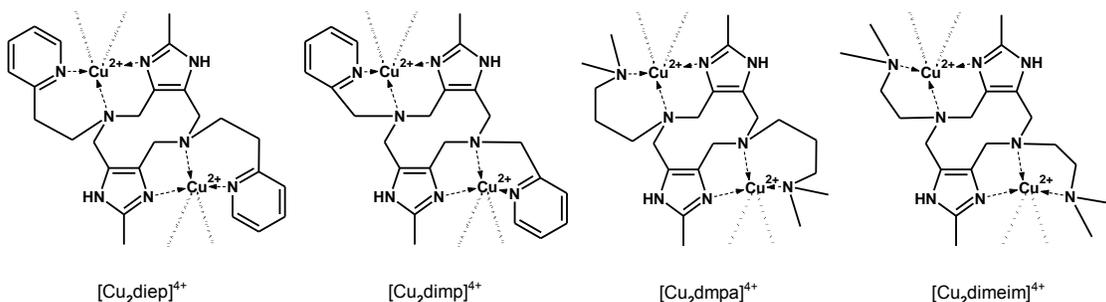


Tabla 3.4.2. Parámetros cinéticos de la oxidación del 3,5-di-ter-butylcatecol (H_2DTBC) en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 a pH óptimo y 25 °C. Parámetros de Michaelis-Menten de la velocidad inicial de reacción.

El análisis de los parámetros cinéticos se puede realizar en función de la estabilidad del complejo catalizador-sustrato (K_M), en términos de la transformación del sustrato al producto (k_{cat}) y por último en términos de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M).

De acuerdo al modelo enzimático Michaelis-Menten, el parámetro cinético K_M está asociado al equilibrio de disociación del complejo catalizador-sustrato, por lo que es una medida inversa de la afinidad del catalizador por el sustrato. Valores grandes de K_M indican una baja afinidad, mientras que valores pequeños una alta afinidad y un complejo catalizador-sustrato estable.

Al comparar los valores obtenidos de este parámetro para los complejos estudiados Cu_2diep y Cu_2dmpa , se encuentra que el complejo con el ligante *diep* presenta mayor afinidad por el sustrato H_2DTBC al tener un valor menor de K_M (Figura 3.4.8). Esta diferencia de afinidades es atribuible a la naturaleza del grupo donador en el que difieren dichos ligantes. El ligante *diep* al poseer un grupo aceptor- π como la piridina, genera un ambiente propicio en el átomo de cobre(II) que favorece la coordinación de ligantes donadores por oxígeno al centro metálico [65].

El sustrato H_2DTBC al ser un ligante donador por oxígeno se unirá preferentemente a sitios de cobre(II) coordinados a ligantes aceptores- π (piridina en *diep*) que a sitios coordinados a simples donadores- σ (propilendiamina en *dmpa*). De igual manera si se comparan los valores para sus análogos de cadena lateral corta (*dimp* y *dimeim*), se encuentra el mismo efecto; el complejo con el ligante piridínico (*dimp*) presenta mayor afinidad por el sustrato que el complejo con el ligante de amina terciaria (*dimeim*).

Ahora bien, al comparar entre los sistemas con el mismo grupo donador (piridina o amina terciaria) se encuentra que los complejos de cadena lateral más larga (Cu_2diep y Cu_2dmpa) son más afines al sustrato probablemente debido a la flexibilidad de estos ligantes frente a sus análogos de cadena lateral corta (Cu_2dimp y $Cu_2dimeim$) que permiten una mejor coordinación del sustrato a los centros metálicos.

Por otra parte, el parámetro cinético k_{cat} , proporcional al parámetro V_{max} , se refiere a la capacidad del catalizador para llevar a cabo la transformación de sustrato a producto. Así, comparando entre los sistemas con la misma longitud de cadena lateral, pero distinto grupo donador (Cu_2diep/Cu_2dmpa o $Cu_2dimp/Cu_2dimeim$), se observa que los sistemas con ligantes con aminas terciarias (*dmpa* y *dimeim*) realizan la transformación más rápido que los sistemas de los ligantes piridínicos (*diep* y *dimp*). Entre los sistemas con el mismo grupo donador, pero distinto tamaño de cadena lateral se encuentra que los sistemas de los ligantes con cadena lateral más corta (*dimp* y *dimeim*) presentan mayor capacidad para dicha transformación. (Figura 3.4.8)

Por último, el cociente k_{cat}/K_M se define como la eficiencia catalítica y es el parámetro por medio del cual se puede comparar la actividad de diversos sistemas biomiméticos. Este cociente engloba todo el proceso catalítico; tanto el equilibrio de formación del complejo catalizador-sustrato, como la transformación de sustrato a producto y proporciona la influencia de estos dos pasos en la actividad de cada compuesto.

Al comparar los valores del cociente para los compuestos en estudio, se encuentra que los sistemas con ligantes piridínicos presentan una mayor eficiencia catalítica en comparación con sus análogos de ligantes de amina terciaria. Esta tendencia se observa tanto para los sistemas cortos como para los largos. De cada una de estas parejas con el mismo grupo donador, pero distinta longitud de cadena lateral, se encuentra que los sistemas en los que se ha alargado la cadena lateral en un átomo de carbono son más eficientes frente a la reacción de oxidación. (Figura 3.4.8)

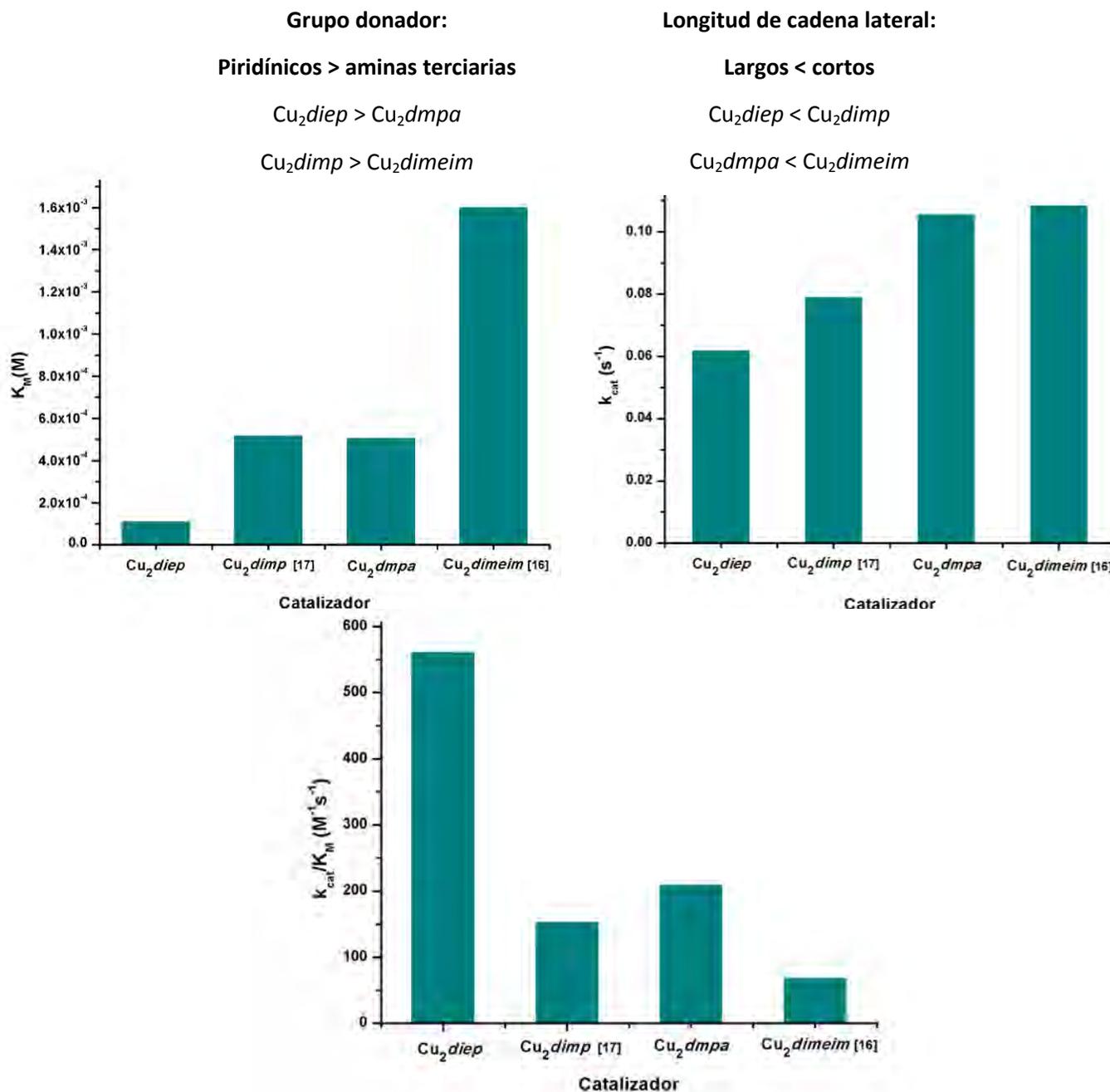
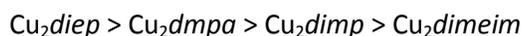


Figura 3.4.8. Comparaciones gráficas de cada parámetro cinético obtenido para la reacción de oxidación de H_2DTBC catalizada por los complejos dinucleares de cobre(II).

Así, en orden decreciente de eficiencia catalítica se tiene lo siguiente:



Los valores de eficiencia catalítica indican que tanto la naturaleza del grupo donador como la longitud de la cadena lateral influyen en la actividad catecolasa de estos compuestos, sin embargo, una vez ordenados los cuatro complejos dinucleares de cobre(II) es posible observar que los sistemas con ligantes largos encabezan la lista con valores considerablemente mayores; sugiriendo así que el factor estructural de mayor peso en la actividad catecolasa de estos compuestos es la longitud de la cadena lateral del ligante y en segundo término pero también importante, la naturaleza del grupo donador.

A continuación se presentan las diferencias de los valores de k_{cat}/K_M al comparar cada una de las variantes para cada combinación de parejas de ligantes.

Catalizador	Cu_2diep	Cu_2dmpa	Cu_2dimp [17]	Cu_2dimeim [16]
k_{cat}/K_M	560.91	209.13	152.71	67.69
Comparación k_{cat}/K_M Variable: longitud de cadena lateral		Comparación k_{cat}/K_M Variable: grupo donador de cadena lateral		
Cu_2diep vs. Cu_2dimp	Cu_2dmpa vs. Cu_2dimeim	Cu_2diep vs. Cu_2dmpa	Cu_2diep vs. Cu_2dimeim	
3.67 veces mayor Cu_2diep	3.09 veces mayor Cu_2dmpa	2.68 veces mayor Cu_2diep	2.26 veces mayor Cu_2dimp	

Tabla 3.4.3. Diferencia de las eficiencias catalíticas al variar el grupo donador y la longitud de la cadena lateral.

Con los valores dados en la tabla anterior es posible apreciar que la mayor diferencia de eficiencia entre una pareja de compuestos análogos se obtiene al variar la longitud de la cadena lateral. Se ha publicado en la literatura evidencia del aumento de la actividad catecolasa al aumentar el tamaño del anillo quelato [72].

Para explicar este incremento en la actividad catecolasa al aumentar en un átomo la cadena lateral, se considera el hecho de que en el ciclo catalítico el cobre cambia de estado de oxidación, $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$, con el consecuente cambio de geometría de pirámide base cuadrada a tetraédrico distorsionado. Para esto se sugiere que los ligantes de cadena lateral más larga presentan mayor flexibilidad que permite o favorece este cambio de geometría en el proceso catalítico; mientras que los sistemas análogos con ligantes cortos (*dimp* y *dimeim*) llegan a presentar la descoordinación de los iones Cu(I) , tal como se ha sugerido de los estudios electroquímicos de dichos sistemas cortos [25]. Así, al favorecer la geometría de ambos estados redox Cu(II/I) , los sistemas largos exhiben una mayor actividad catalítica frente a los sistemas cortos.

3.4.2. Interacción de los complejos $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ con H_2DTBC en ausencia de O_2 .

Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la enzima catecol oxidasa cataliza la oxidación de catecoles a quinonas sigue dos pasos. El primero consiste en la reacción estequiométrica en ausencia de oxígeno, del centro bimetálico de la enzima con un equivalente de catecol para producir quinona y el estado reducido Cu(I) *desoxy*. El segundo paso consiste en la regeneración del estado nativo *met* en presencia de O_2 y la oxidación de la segunda molécula de catecol a quinona.

Dado este antecedente, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiar la interacción anaerobia entre los complejos modelo de Cu(II) con el sustrato H_2DTBC , con la intención de caracterizar el paso inicial del mecanismo de acción de éstos [43,46,47]. La información que se ha obtenido de dichos estudios de la unión del sustrato consiste en la determinación de la estequiometría entre los complejos y el H_2DTBC , en algunos casos de la determinación del modo de coordinación de éste a los centros metálicos y en algunos otros en la identificación de especies intermediarias de reacción como semiquinonas.

Debido a la relevancia de la información obtenida de estos estudios para la elucidación del mecanismo de acción de estos sistemas, en este proyecto también se estudió la interacción de los complejos de los ligantes *diep* y *dmpa* con H_2DTBC en ausencia de oxígeno molecular mediante estudios espectrofotométricos. Dado que los estudios de la actividad catecolasa y la obtención de los parámetros cinéticos se realizaron en la mezcla $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ 1:1, en medio amortiguado de pH, estos estudios se realizaron en las mismas condiciones.

En la Figura 3.4.9 se muestran las series de espectros obtenidos de las titulaciones anaerobias para estos sistemas.

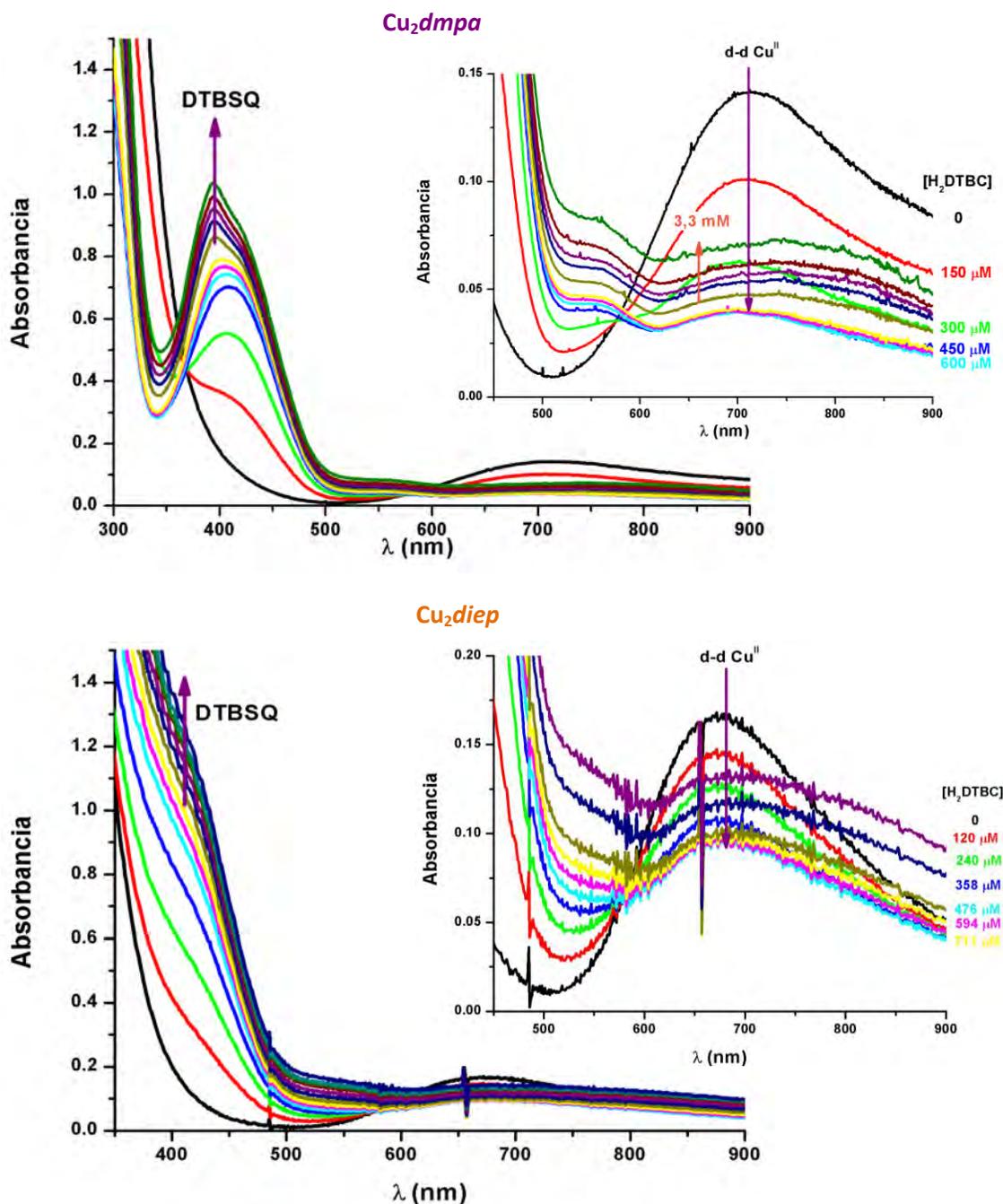


Figura 3.4.9. Cambios en el espectro UV-Vis tras la adición de H_2DTBC a una solución de Cu_2L (0.625 mM) en $MeOH:H_2O$ bajo condiciones anaerobias a pH 7.5 y 25 °C. Cu_2dmpa (superior) y Cu_2diep (inferior).

Tras la adición de H_2DTBC a disoluciones 0.625 mM de los complejos (Cu_2L), se observa el incremento en la absorbancia en la zona de 385 - 410 nm y un decremento en la absorbancia a 700 nm. La banda de absorción a 385 nm es característica de la formación del radical semiquinona [73], mientras que la banda menos intensa en 410 nm corresponde a la formación de quinona. La disminución de la señal a 700 nm, correspondiente a la transición d-d de los complejos de

cobre(II), se debe a la reducción de Cu(II) a Cu(I) como resultado de oxidar al sustrato en ausencia de O₂.

Esto sugiere que los complejos dinucleares de cobre(II) reaccionan con el sustrato H₂DTBC mediante una reducción de un electrón para producir el radical semiquinona (HDTBSQ). Dicho radical, en presencia de otro equivalente, puede dismutar para producir un equivalente de H₂DTBC y un equivalente de DTBQ, responsable del incremento en la absorción a 410 nm.

Esta evidencia difiere de la encontrada para la enzima catecol oxidasa, donde la oxidación del sustrato catecol, en un primer paso sin la intervención de oxígeno, es vía dos electrones para la producción de quinona [33]. En este punto resulta importante recordar que en la enzima COx los átomos de cobre(II) se encuentran a una distancia relativamente cercana ($\approx 3\text{\AA}$), mientras que los compuestos dinucleares de cobre(II) con los ligantes estudiados en el grupo de investigación, presentan distancias entre los sitios metálicos mayores a 7\AA . Debido a la diferencia estructural de estos sistemas biomiméticos con respecto al sitio activo de la enzima, no es posible observar la oxidación de una molécula de catecol por ambos sitios de cobre(II). Así, el mecanismo inicial de estos sistemas modelo consiste en la oxidación del sustrato vía un electrón, donde ambos sitios de cobre pueden actuar paralelamente y producir dos moléculas de HDTBSQ y un complejo Cu(I)-Cu(I) o bien actuar únicamente un sitio de vez en vez y generar un complejo de valencia mixta Cu(II)-Cu(I), que daría la disminución y no la desaparición de la banda de transiciones d-d.

Del análisis de los espectros de absorción obtenidos de la titulación anaerobia (Figura 3.4.9), se determinó que la estequiometría entre el sustrato y cada uno de los complejos de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* es 1:1. En la Figura 3.4.10 se presentan las gráficas del trazo de la absorbancia a 400 nm en función de la concentración de sustrato. Las líneas representan los ajustes lineales.

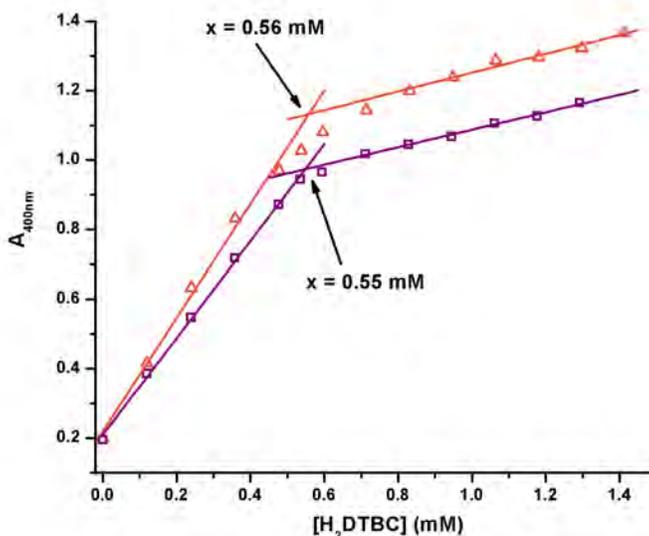
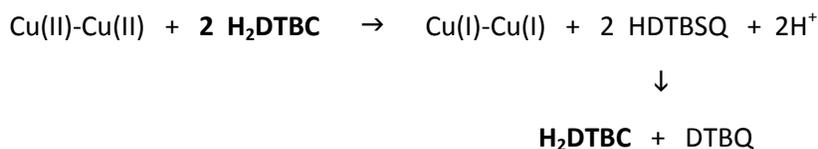


Figura 3.4.10. Incremento en la absorbancia a 400 nm en función de la concentración de H₂DTBC añadido a las disoluciones de Cu₂L 0.625 mM.MeOH:H₂O1:1, 25 °C.Cu₂diep (△) y Cu₂dmpa (□).

Se pueden apreciar en el estudio de ambos complejos dos tendencias en el trazo de absorbancia a 400 nm al incrementar la concentración de sustrato. La intersección de ambas tendencias brinda información acerca de la estequiometría entre las especies reaccionantes sustrato:catalizador, siendo en ambos casos a una proporción cercana a 1:1.

De este estudio se propone que en el mecanismo de oxidación anaerobia de ambos complejos de cobre(II), los dos centros metálicos actúan, aunque muy probablemente no simultáneamente, para generar dos moléculas de DTBSQ que dismutan en H₂DTBC y DTBQ, cumpliendo así una estequiometría sustrato:catalizador 1:1.



Por otra parte, en la Figura 3.4.10 se evidencia nuevamente que el complejo dinuclear de cobre(II) con el ligante *diep* presenta mayor actividad sobre su análogo con el ligante *dmpa*, al observarse un incremento mayor en la absorbancia a 400 nm en el mismo intervalo de concentraciones del sustrato.

Una vez realizada la caracterización de la interacción del complejo Cu₂L–H₂DTBC en ausencia de oxígeno molecular en el paso inicial, se expusieron las soluciones resultantes a O₂ para observar los cambios en el espectro UV-Vis, adquiriendo los espectros electrónicos cada 2 minutos por 1.5 horas. En la Figura 3.4.11 se presentan series de espectros seleccionados obtenidos de este estudio para los sistemas con el ligante *diep* y el ligante *dmpa*.

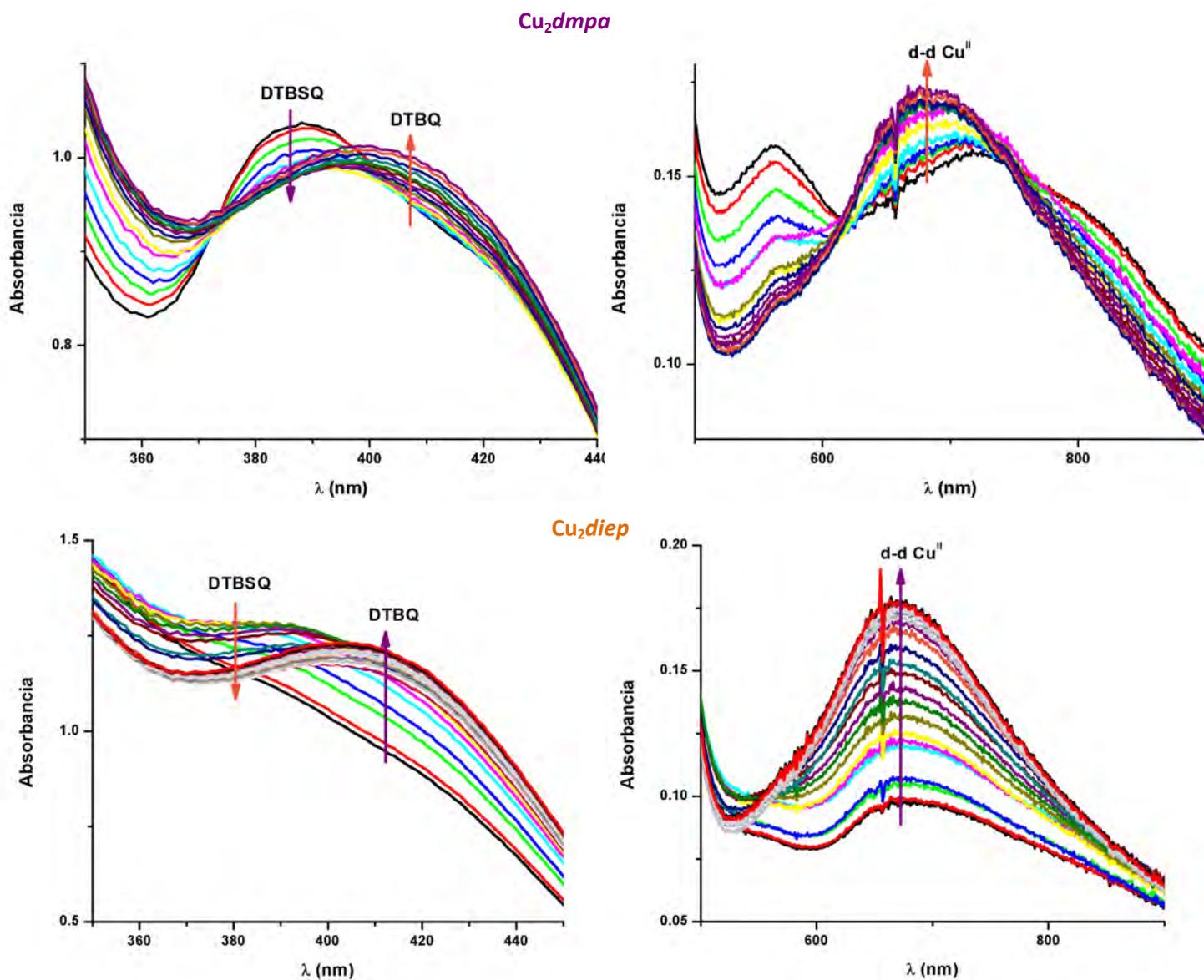


Figura 3.4.11. Cambios en el espectro UV-Vis de las mezclas anaerobias 1:1 $H_2DTBC:Cu_2L$ en medio amortiguado de $pH = 7.5$ en $MeOH:H_2O$ 1:1, a $25^\circ C$, tras la exposición de O_2 a presión atmosférica. Cu_2dmpa (superior) y Cu_2diep (inferior).

Al observar los espectros electrónicos obtenidos para ambos sistemas Cu_2diep y Cu_2dmpa en la zona de absorción de las quinonas (~ 400 nm), se aprecia que tras la exposición a O_2 , la banda característica de semiquinona en 385 nm disminuye gradualmente, mientras que la banda característica de DTBQ en este medio a 410 nm aumenta, indicando así la oxidación de la DTBSQ y del H_2DTBC por el oxígeno molecular.

Por otra parte, si ahora observamos los espectros en la zona de absorción de los complejos de cobre(II) (~ 700 nm), se puede notar que la banda característica de las transiciones d-d en 710 nm para Cu_2dmpa y 670 nm para Cu_2diep , aumentan gradualmente con la exposición de O_2 . Esto

indica la regeneración de los catalizadores al oxidarse los sitios de Cu(I)-Cu(I) para producir el complejo Cu(II)-Cu(II) que da lugar a las bandas de absorción de menor intensidad producidas por las transiciones prohibidas d-d. En la Figura 3.4.12 se presentan las comparaciones de los espectros electrónicos para cada una de las etapas de este experimento.

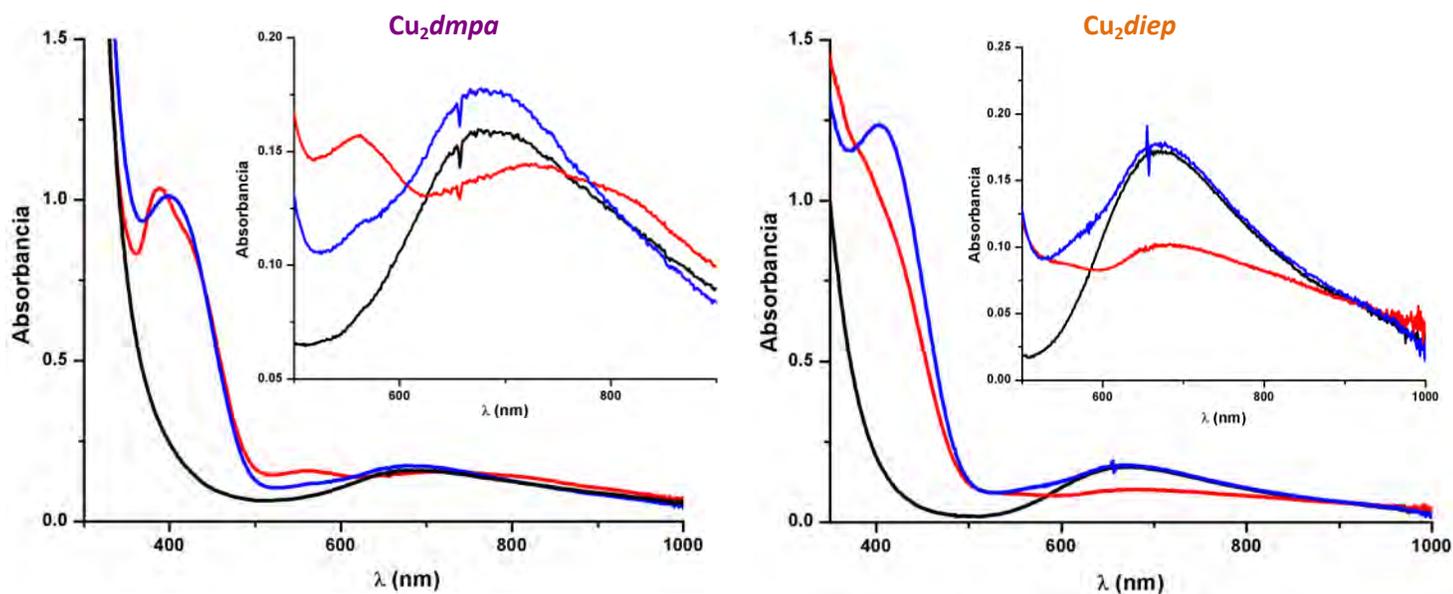


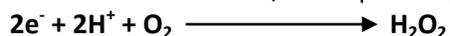
Figura 3.4.12. Espectros electrónicos adquiridos anaeróbicamente en MeOH:H₂O 1:1 a 25 °C de (a, línea negra) Cu₂L (0.625 mM) y (b, línea roja) su complejo con H₂DTBC (0.7 mM). El espectro (c, línea azul) se adquirió después de la exposición de las disoluciones a O₂ por 1.5 h. Cu₂dmpa (izquierda) y Cu₂diep (derecha).

3.4.3. Detección de H₂O₂ en la oxidación catalítica de H₂DTBC.

Una vez caracterizada la interacción de los complejos modelo con el sustrato H₂DTBC en ausencia de O₂, se continuó con la caracterización del segundo paso de la reacción catalítica de oxidación del sustrato modelo H₂DTBC por los complejos dinucleares con los ligantes *diep* y *dmpa*.

En el mecanismo propuesto para la enzima catecol oxidasa, en el segundo paso de la reacción se se oxida otro equivalente de catecol a quinona en presencia de O₂ acompañada de la regeneración del estado nativo *met* y la producción de agua. Sin embargo, de los estudios de los sistemas modelo de cobre(II) descritos en la literatura, se han encontrado dos mecanismos distintos para la oxidación catalítica en presencia de oxígeno molecular [47]:

- Mecanismo de dos electrones, en el que el O₂ se reduce a peróxido de hidrógeno.



- Mecanismo de cuatro electrones, en el que el O₂ se reduce a agua.



La formación de peróxido de hidrógeno se ha publicado sólo en algunos casos [17,22,37,49,50,74] y en la gran mayoría [17,22,37,50] se ha identificado mediante ensayos iodométricos [75].

Este ensayo se basa en la formación de I₃⁻, que tiene una banda de absorción intensa característica en 353 nm, por la reacción de KI con H₂O₂, en exceso del primer reactivo. (H₂O₂ + 2I⁻ + 2H⁺ → 2H₂O + I₂ y I₂(ac) + I⁻ → I₃⁻). Sin embargo este tipo de ensayo no es útil para nuestros sistemas ya que se ha encontrado que los complejos dinucleares de cobre del grupo de investigación, reaccionan con el yoduro de potasio para producir el I₃⁻, especie que en el método iodométrico se detecta como prueba positiva de la presencia de H₂O₂. Dado este fenómeno, la detección de peróxido de hidrógeno en la reacción catalítica con los sistemas Cu₂*diep* y Cu₂*dmpa* se realizó mediante estudios fluorimétricos en las condiciones de los estudios cinéticos.

Para este estudio se utilizó el ensayo del diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA), ampliamente utilizado para la identificación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en sistemas biológicos [76-78]. Este reactivo es estable en el estado reducido pero puede oxidarse por las especies ONOO⁻, H₂O₂ en presencia de peroxidasas y [•]OH. Esta oxidación está acompañada de cambios en los enlaces, de tal manera que genera una especie altamente resonante (fluoróforo) que resulta en el incremento en la fluorescencia (Figura 3.4.13). Así la especie reducida es incolora y no fluoresce, mientras que la especie oxidada es altamente colorida y fluorescente.

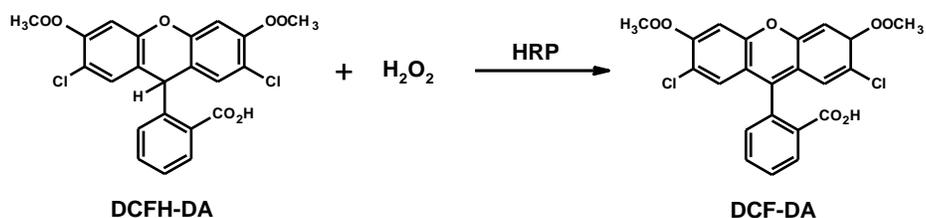


Figura 3.4.13. Esquema de reacción del estudio fluorimétrico para la identificación de H₂O₂ como producto de reacción en la oxidación catalítica de H₂DTBC catalizada por los complejos dinucleares de cobre(II).

Aunque se ha informado de la presencia de especies O₂^{•-} en el ciclo catalítico de algunos sistemas modelo, esta prueba fluorimétrica es adecuada para la identificación de peróxido de hidrógeno incluso en presencia de dicha especie, ya que la fluorescina no se oxida por acción de O₂^{•-} [77].

En la Figura 3.4.14 se presentan los espectros de emisión de fluorescencia de los estudios realizados en este proyecto.

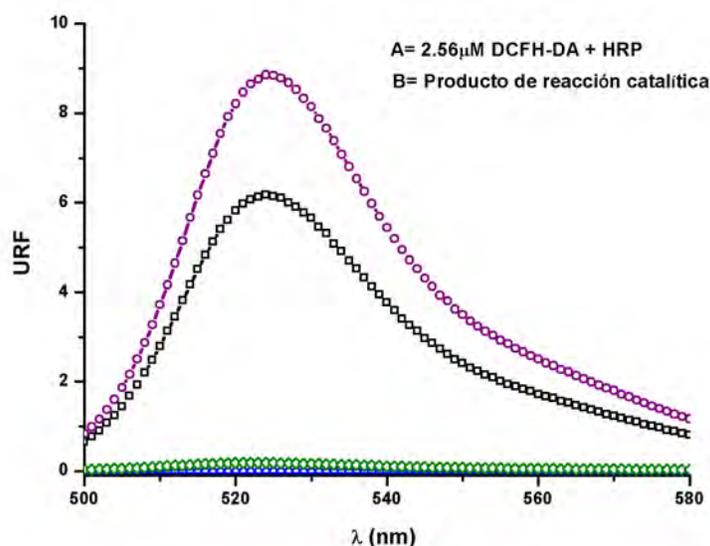


Figura 3.4.14. Estudio fluorimétrico para la determinación de producción de H₂O₂. (□) A + 0.5 μM H₂O₂ (control), (○) A + 40 μL B, (◇) DCFH-DA + 40 μL B, (△) DCFH-DA + 0.2 μM Cu₂L.

Se puede observar que hay un incremento en la fluorescencia al llevar a cabo la reacción con una alícuota del producto de la reacción catalítica. Este aumento en la fluorescencia se puede atribuir únicamente a la presencia de H₂O₂ como producto de reducción del O₂ durante el proceso catalítico, al descartarse la oxidación del compuesto DCFH-DA por acción de alguno de los componentes de la reacción de oxidación del H₂DTBC, tales como el complejo, el sustrato o el producto DTBQ.

La formación de H_2O_2 en el curso de la reacción catalítica, indica un mecanismo de dos electrones en la reducción O_2 para la reacción catalizada por los complejos dinucleares de cobre(II).

Adicionalmente, se determinó mediante un estudio UV-Vis que el H_2O_2 no se consumía en la reacción catalítica a concentraciones bajas de este reactivo ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{Cu}_2\text{L}$, 2.5 : 1), al no observarse un cambio en la absorbancia a 400 nm (Figura 3.4.15). Este fenómeno también ha sido observado anteriormente por Reedijk y colaboradores [47], en donde reportan una nula influencia en la velocidad de reacción en presencia de concentraciones bajas de H_2O_2 (por debajo de 20 equivalentes molares de H_2O_2 por una mol de complejo).

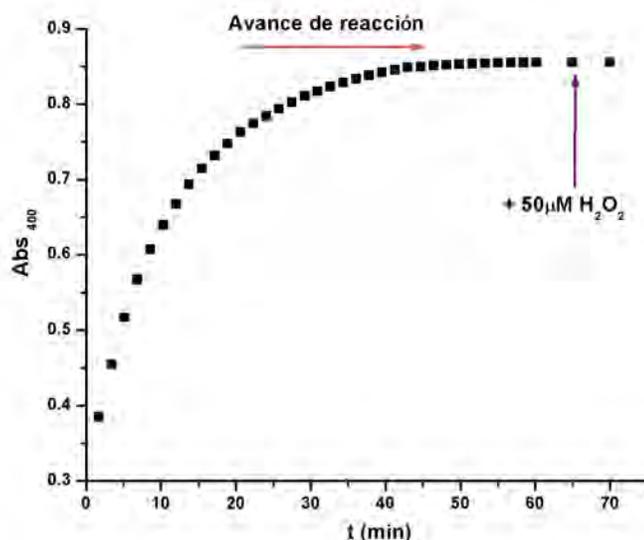


Figura 3.4.15. Curso de la formación de DTBQ durante la reacción catalítica en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1, en exceso de catecol (7.7 mM) y Cu_2L (0.02 mM) y cantidad mínima de O_2 (únicamente la cantidad disuelta en las disoluciones) a 25 °C.

De los estudios anteriores se sabe que en el segundo paso de la reacción catalítica se produce H_2O_2 como producto de la reducción del O_2 y que éste no se consume en concentraciones bajas.

3.4.4. Mecanismo catalítico

Basados en los resultados obtenidos de los estudios mecanísticos de los sistemas con los ligantes *diep* y *dmpa*, es posible sugerir un mecanismo para la oxidación de H₂DTBC catalizada por estos sistemas en la mezcla MeOH:H₂O, como se presenta en la Figura 3.4.16.

El ciclo catalítico comienza con la oxidación anaerobia del sustrato H₂DTBC por el complejo Cu₂L. Los grupos hidroxilo en el complejo asisten la desprotonación del sustrato y favorecen la coordinación de los sitios de cobre(II) a éste. Esto se sugiere con base en lo observado en los estudios de variación de pH y su correlación con la especiación de los sistemas en disolución; para lo que se encontró que la actividad catalítica de estos sistemas es mayor a pH 8.5 donde predominan las especies dihidroxiladas de cada uno de los complejos.

Cada uno de los sitios de cobre se coordina a una molécula de sustrato donde se da la oxidación del HDTBC vía la transferencia de un electrón. Este proceso se supone no ocurre simultáneamente en ambos sitios de cobre de la molécula del complejo (recciones a y b), sin embargo al final del proceso estequiométrico en ausencia de O₂, se obtienen dos equivalentes de radical semiquinona (HDTBSQ) por un equivalente de complejo con ambos sitios de cobre reducidos (Cu(I)-Cu(I)).

Los radicales semiquinona producidos pueden estar libres o unidos a los complejos parcial o totalmente reducidos (Cu^{II}Cu^I y Cu^ICu^I). Estos pueden dismutar para producir un equivalente de sustrato (H₂DTBC) y un equivalente de quinona (DTBQ) (reacción c), para generar una estequiometría DTBQ:catalizador 1:1 como se determinó de los estudios anaerobios. La evidencia de formación de radicales semiquinona como intermediarios en la oxidación del catecol ha sido documentada anteriormente en pocos casos por otros grupos de investigación [47,49,51,72].



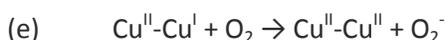
Esto difiere del mecanismo propuesto para la enzima COx, en que para ésta se propone que la oxidación del sustrato es mediante la transferencia de dos electrones, uno por cada centro metálico, para producir un equivalente de DTBQ y el estado reducido *desoxy* Cu(I)Cu(I).

Esto se puede explicar en términos del efecto de la distancia de los dos centros metálicos en el modo de coordinación. Distancias cortas, cercanas a 3 Å como en la COx, promueven la coordinación del sustrato de manera bidentada a los dos sitios de cobre(II). Lo que permite que ambos iones metálicos sean reducidos en la reacción estequiométrica con el sustrato dando lugar a la formación de quinona y especies reducidas Cu(I)-Cu(I).

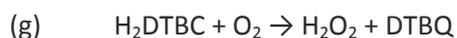
Por otra parte distancias mayores metal-metal, propician la coordinación del sustrato únicamente a uno de los dos centros metálicos. Así, se transfiere sólo un electrón del sustrato al ion de cobre(II) generando especies intermediarias semiquinona.

El ciclo continúa en condiciones aerobias, donde se sugiere que el oxígeno molecular se enlace a cada sitio de cobre reducido Cu(I) y se transfiera un electrón para producir especies Cu(II)-superoxo tal como lo ha sugerido Kodera [49], Kaizer [51] y Reedijk [47].

Así se regenera el estado oxidado del complejo Cu(II)-Cu(II), como se confirmó por espectroscopía UV-Vis y se producen dos radicales superóxido que dismutan para producir O_2 y H_2O_2 , producto identificado por fluorimetría (reacciones d-f). El radical superóxido no se ha podido confirmar debido a que los complejos de cobre catalizan la reacción de dismutación de esta especie y es sumamente difícil detectarlo por técnicas comunes [76-78]. Sin embargo su presencia no se contrapone a las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo.



Así la suma de las reacciones mencionadas nos da la reacción global (g):



Es importante mencionar que no es necesario que el complejo dinuclear de cobre(II) se reduzca completamente, el mecanismo puede funcionar con una secuencia de reacciones 2a, c, 2e, f. Esto explicaría que la banda de transiciones d-d de los iones de cobre(II) (600 -700 nm) no desaparezca completamente en los espectros obtenidos del estudio de la interacción de los complejos con el sustrato en ausencia de oxígeno molecular (sección 3.4.2).

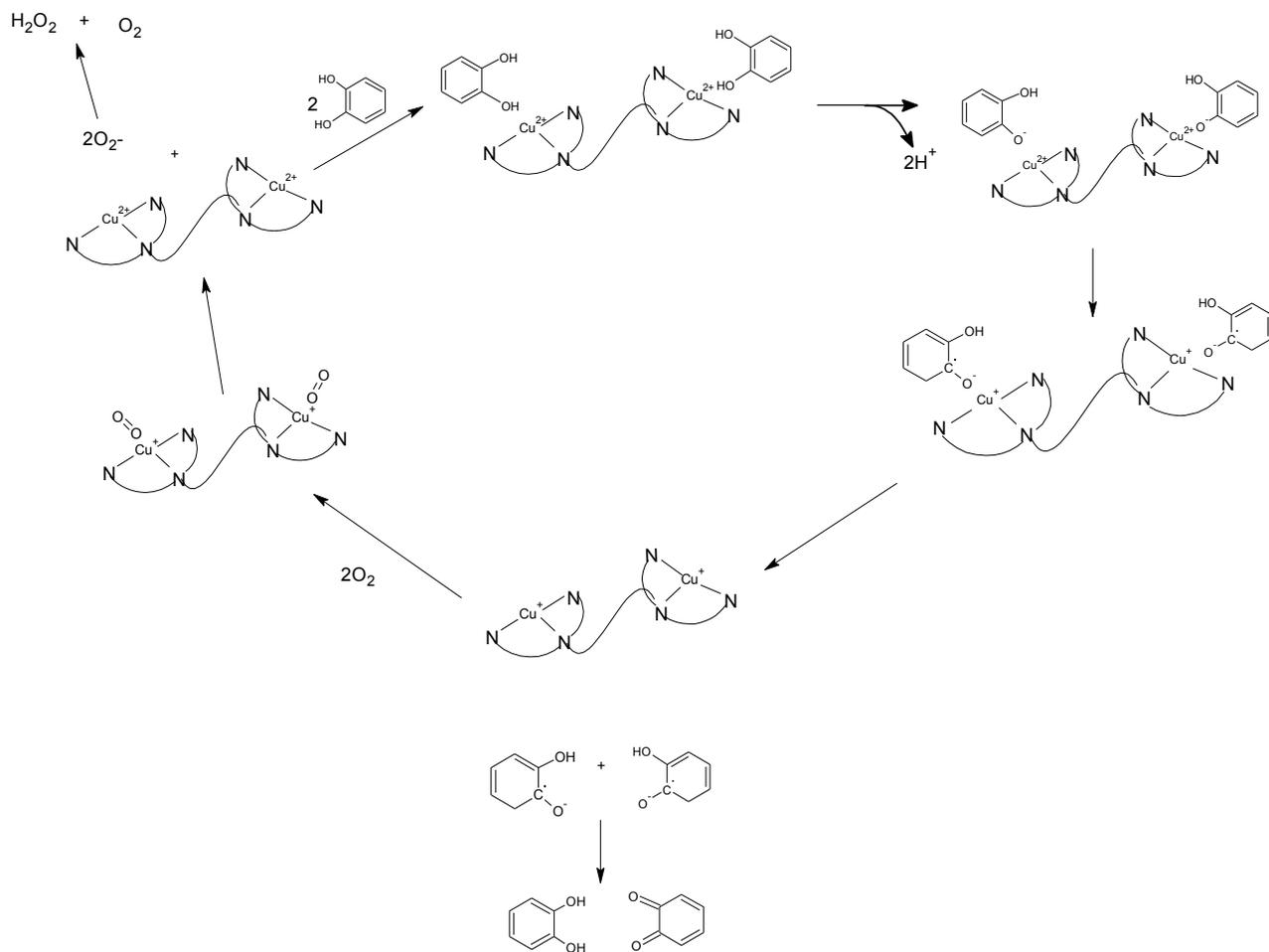


Figura 3.4.16. Mecanismo propuesto para la oxidación catalítica de H₂DTBC por los complejos Cu₂diep y Cu₂dmpa.

4. Conclusiones

Se sintetizaron los ligantes *diep* y *dmpa* mediante la reacción de Mannich en medio básico, los cuales coordinan a iones cobre(II) para producir complejos dinucleares.

De acuerdo con la caracterización en estado sólido por medio de difracción de rayos X del complejo con el ligante *diep*, se sabe que la geometría de cada centro metálico es de pirámide base cuadrada; con lo que se propone la misma geometría para los complejos dinucleares de Cu(II) con el ligante *dmpa*. Sin embargo para estos últimos se sugiere que puedan presentar un equilibrio de dos especies con modos distintos de coordinación; una en la que el átomo donador de la cadena lateral del ligante se posiciona en la base de la pirámide cuadrada y otra en la que se encuentra ocupando la posición apical.

El sistema con el ligante *diep* precipita en disolución al mantenerlo en un medio con percloratos, no así con aniones nitrato. Por el contrario, el sistema con el ligante *dmpa* precipita en un medio con nitratos, siendo soluble en medio de percloratos. Esta información fue relevante para elegir el medio adecuado para realizar los estudios en disolución como la especiación y los estudios cinéticos.

De los estudios potenciométricos se sabe que el complejo dinuclear $[\text{Cu}_2\text{dmpa}]^{4+}$ es significativamente menos estable que su análogo $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ al obtenerse un valor de constante de formación 100,000 veces menor.

Los complejos dinucleares de cobre(II) con los ligantes *diep* y *dmpa* presentan una actividad catecolasa a pesar de presentar distancias entre los dos centros metálicos mayores a 7 Å que imposibilita la acción simultánea de los dos iones de cobre(II) sobre una molécula de sustrato.

La actividad catecolasa para ambos complejos es mayor a pH 8.5 en donde predominan las especies di-hidroxiladas $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^{2+}$, las cuales favorecen la desprotonación del sustrato y su consecuente unión a los centros metálicos.

La actividad catecolasa de estos complejos dinucleares presenta comportamientos distintos al cambiar la proporción complejo:sustrato. A proporciones bajas, se observa un comportamiento

tipo Michaelis-Menten, mientras que a proporciones altas complejo:sustrato una dependencia lineal en la concentración del sustrato.

Al igual que lo detectado anteriormente para los complejos Cu_2dimp y Cu_2dimeim , la naturaleza de los grupos donadores influye considerablemente en la actividad de éstos. Los ligantes donadores por oxígeno se enlazan preferentemente a sitios de cobre(II) coordinados a ligantes aceptores- π , que a sitios coordinados a donadores- σ . Dado esto, el complejo $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ presenta mayor actividad que el complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}]^{4+}$.

Los complejos con los ligantes *diep* y *dmpa* presentan mayor eficiencia catalítica que sus análogos cortos *dimp* y *dimeim*. Lo que indica que el incrementar el tamaño del anillo quelato de 5 a 6 miembros favorece la actividad catalítica, debido a la mayor flexibilidad del ligante que facilita el cambio de geometría de los estados reducido Cu(I) y oxidado Cu(II).

El ciclo catalítico de estos complejos involucra dos pasos:

1. Proceso estequiométrico inicial entre el complejo y el sustrato en ausencia de O_2 , vía un electrón, con la consecuente producción de radical semiquinona que dismuta para producir DTBQ y H_2DTBC y la producción del estado reducido Cu(I)Cu(I).
2. La reoxidación del complejo Cu(I)Cu(I) en presencia de O_2 , para producir radicales superóxido que dismutan en presencia de los complejos de Cu(II) en H_2O_2 y O_2 .

Los sistemas modelos estudiados no son estrictamente biomiméticos, ya que presentan un mecanismo catalítico distinto al de la enzima catecol oxidasa a pesar de presentar actividad de este tipo. Tres principales diferencias son: (1) se oxida una molécula de catecol por ciclo mientras que en la enzima se oxidan dos; (2) se generan intermediarios semiquinonas de la acción de un sitio de cobre en una molécula de sustrato mientras que en la enzima ambos sitios actúan sobre una misma molécula, (3) el O_2 es reducido a H_2O_2 mientras que en la enzima es reducido a H_2O .

La correlación de la especiación en el medio de reacción con los resultados cinéticos permitió la identificación de la especie activa en las condiciones catalíticas y un mejor entendimiento del mecanismo de acción de los sistemas. De ahí la relevancia de la implementación de una metodología potenciométrica adecuada para la caracterización en disolución en las condiciones catalíticas (MeOH:H₂O 1:1 v/v).

En la mezcla de disolventes MeOH:H₂O 1:1 v/v los ácidos perclórico y nítrico no se comportan como ácidos fuertes, y se determinó que en este medio, el ácido perclórico es un ácido más fuerte que el ácido nítrico, con valores refinados de pK_a = 1.86 y pK_a = 2.60 respectivamente.

En la evaluación de la actividad catecolasa de los sistemas modelo intervienen diversos factores de las condiciones experimentales; por lo que la estandarización y control de la metodología son importantes para la obtención de resultados comparables.

5. Parte experimental

5.1. Reactivos y equipo

5.1.1. Reactivos

2-metilimidazol, 99 % Aldrich.

3-(dimetilamino)-1-propilamina, ≥ 99 %, Aldrich.

2-(2-aminoetil)piridina, 95 %, Aldrich.

Formaldehído, 37.5 % en H₂O, Mallinckrodt.

Perclorato de cobre, Cu(ClO₄)₂·6H₂O, 98 %, Aldrich.

Nitrato de cobre, Cu(NO₃)₂ · 2.5 H₂O, 99.9 %, J.T. Baker.

Hidróxido de potasio, 85 %, Merck.

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

Ácido nítrico, 65.2 %, J.T. Baker

Ácido perclórico, 70 % , Mallinckrodt.

Nitrato de potasio, KNO₃, 99+ %, Aldrich.

Perclorato de sodio, NaClO₄, 98+ %, Sigma-Aldrich.

Alcohol etílico absoluto anhidro, 99.9 %, J.T. Baker.

Metanol, ≥ 99.6 %, Sigma-Aldrich.

Metanol grado espectrofotométrico, ≥ 99.9 %, Sigma-Aldrich.

Ácido succínico, 100%, Mallinckrodt.

EDTA disódico, C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O, 99.3 %, J.T. Baker.

3,5-di-*ter*-butilcatecol, 99 %, Aldrich.

3,5-di-*ter*-butil-*o*-benzoquinona, 98 %, Aldrich.

HEPES, Ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfónico]), 99.5 %, Sigma.

TRIS, Tris(hidroximetil)-aminometano, 99.9+ %, Aldrich.

N₂ comprimido, Praxair.

DCFH-DA, diacetato de 2'7' diclorofluorescina, ≥ 97 %, Sigma.

HRP, peroxidasa de rábano, tipo IV, 250-330 unidades/mg, Sigma.

Peróxido de hidrógeno, 30% m, Sigma-Aldrich.

Agua deuterada, D₂O, 99.9 %D, Aldrich.

Ácido clorhídrico deuterado, DCl, 20% en D₂O al 99 %D, Aldrich.

5.1.2. Equipo

Análisis elemental. El análisis elemental de los compuestos se realizó en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM con un analizador elemental Fisons AE 1108.

Espectroscopía de Infrarrojo. Se obtuvieron los espectros en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR, Spectrum RX1 de la USAI.

Resonancia Magnética Nuclear. Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro Varian Unity INOVA 300MHz de la USAI.

Reflectancia difusa. Se obtuvieron los espectros en un espectrofotómetro Varian Cary 500 UV-Vis-NIR.

Espectroscopia UV-Vis. Los espectros electrónicos se obtuvieron con un espectrofotómetro de arreglo de diodos HP Agilent 8453 y el software UV-Visible Chemstation.

Resonancia paramagnética electrónica. Se obtuvieron los espectros en disolución congelada y en estado sólido a temperatura ambiente mediante un espectrofotómetro Bruker ELEXSYS E500 operando en frecuencia de banda-X de la USAI.

Difracción de Rayos X. La estructura cristalina se obtuvo en la USAI con un equipo SIEMENS P4.

Titulaciones potenciométricas. La determinación de las constantes de acidez y de formación de los complejos se realizó con un titulador automático Metrohm SM Titrino 702, en una celda termostataada. Se mantuvo con agitación mediante un agitador Metrohm 728 y las mediciones se realizaron con un electrodo Metrohm Ecotrodo Plus. El software utilizado fue Tiamo, titration and more 3.1 de Metrohm.

Fluorescencia. Los estudios fluorimétricos se realizaron con un espectrómetro de luminiscencia Aminco, Bowman, Serie 2.

5.2. Síntesis

5.2.1. Síntesis de los ligantes *diep* y *dmpa*

Síntesis del ligante *diep*

Se disolvieron 1.6432 g (20 mmol) de 2-metilimidazol en aproximadamente 40 mL de agua. A esta disolución se le adicionaron 2.38 mL (20 mmol) de 2-(2-aminoetil)piridina y posteriormente, gota a gota y con agitación constante, 4 mL (50 mmol) de formaldehído. Se aumentó el pH de la mezcla con una disolución de hidróxido de potasio (1.2 g, 20 mmol) también en agua (10 mL).

La mezcla de reacción se calentó en baño de aceite; al llegar a 60 °C comenzó a enturbiarse por lo que se le adicionaron 5 mL de etanol. Una vez obtenida la mezcla traslúcida, se dejó bajo agitación constante a 70 °C por 48 horas. Después de 2 horas a temperatura ambiente y bajo agitación se obtuvo un sólido blanco, se filtró al vacío y se lavó con agua fría (4°C).

Se obtuvo el producto blanco y puro (1.5436 g, 2.92 mmol, 14.60 %)

Análisis elemental C₂₆H₃₂N₈·4H₂O PM = 528.65 uma

Elemento	Calculado	Observado
C	59.07 %	59.65 %
H	7.63 %	8.27 %
N	21.20 %	20.65 %

RMN-¹H (400 MHz, D₂O/DCl, δ): 2.297 (s, 6H, CH₃-im.); 3.318 (m, 8H, piridina-CH₂-CH₂-N-); 3.856 (s, 8H, CH_{2α}-im.); 7.620 (ddd, ³J = 8.0 Hz, ³J = 6.0 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, H-aromát.); 7.753 (dt, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 2H, H-aromát.); 8.223 (td, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2H, H-aromát.); 8.377 (ddd, ³J = 6.0 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, 2H, H-aromát.).

RMN-¹³C ((400 MHz, D₂O/DCl, δ): 11.03 (2C, CH₃-im.); 30.10 (2C, -CH₂α-diazecina); 44.41 (4C, CH_{2α}-im.); 53.67 (2C, -CH₂β-diazecina); 124.83 (4C, posición 4 y 5 im.); 125.65, 127.68, 141.22, 147.34, 152.43 (10C, C-aromát.); 148.22 (2C, posición 2 im.).

Síntesis del ligante *dmpa*

Se disolvieron 1.6423 g (20 mmol) de 2-metilimidazol en aproximadamente 15 mL de agua. La disolución resultante se adicionó a una disolución de 3-(dimetilamino)-1-propilamina (2.5 mL, 20

mmol) en el mismo disolvente (30 mL). A esta mezcla incolora se le agregó, gota a gota y bajo agitación constante, 4 mL (50 mmol) de formaldehído disueltos en aproximadamente 15 mL de agua y una solución de hidróxido de potasio (1.2 g, 20 mmol) en dicho disolvente (10 mL).

La mezcla de reacción se calentó en baño de aceite a 60 °C por 78 horas con agitación constante. Transcurrido este tiempo, la mezcla tomó una coloración naranja. Posteriormente se aumentó la temperatura del baño a 85 °C y después de 4 horas de calentamiento el producto precipitó como un sólido blanco.

Este precipitado se filtró al vacío en caliente (85 °C), obteniéndose el producto blanco y puro (0.8360 g *dmpa*, 1.92 mmol, 9.62 %).

Análisis elemental $C_{22}H_{40}N_8 \cdot H_2O$ PM = 434.62 uma

Elemento	Calculado	Observado
C	60.80 %	60.50 %
H	9.74 %	10.03 %
N	25.78 %	25.53 %

RMN-¹H (400 MHz, D₂O/DCl, δ): 1.920 (q, ³J = 7.6 Hz, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-); 2.201 (s, 6H, CH₃-im.); 2.733 (s, 12H, -N-(CH₃)₂); 2.793 (t, ³J = 7.2 Hz, 4H, -CH₂ γ -diazecina); 3.086 (t, ³J = 7.6 Hz, 4H, -CH₂ α -diazecina); 3.238 (s, 8H, CH₂ α -im.).

RMN-¹³C ((400 MHz, D₂O/DCl, δ): 12.66 (2C, CH₃-im.); 22.63 (2C, -CH₂-CH₂-CH₂-); 42.85 (4C, -N-(CH₃)₂); 44.50 (2C, -CH₂ α -diazecina); 52.49 (4C, CH₂ α -im.); 56.26 (2C, -CH₂ γ -diazecina); 128.50 (4C, posición 4 y 5 im.); 146.81 (2C, posición 2 im.)

5.2.2. Síntesis de los complejos dinucleares de cobre(II)

Síntesis del complejo $[Cu_2diep(H_2O)_4](ClO_4)_4 \cdot 2H_2O$

En aproximadamente 15 mL de agua se disolvieron 0.0926 g (0.25 mmol) de $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ y se le adicionaron, lentamente y bajo agitación constante, 0.06652 g (0.125 mmol) del ligante *diep*. La disolución cambió de color azul cielo a un azul-verde intenso conforme se agregó el ligante. Se filtró y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta evaporación completa del disolvente. Se obtuvieron cristales color verde oscuro apropiados para difracción de rayos X. (0.1197 g, 0.110 mmol, 88 %). (PM = 1089.57 uma).

Análisis elemental C₂₆ H₄₄ Cl₄ Cu₂ N₈ O₂₂

Elemento	Calculado	Observado
C	28.66 %	28.30 %
H	4.07 %	4.11 %
N	10.28 %	10.20 %

Absorbancia

	Estado sólido	Disolución
$\lambda_{\text{máx}}$ TC	366 nm	--
$\lambda_{\text{máx}}$ d-d	629 nm	670 nm

Síntesis del complejo [Cu₂*diep*(NO₃)₄]

Se disolvieron 0.0582 g (0.25 mmol) de Cu(NO₃)₂·2.5 H₂O en aproximadamente 15 mL de H₂O y se le adicionaron lentamente y bajo agitación constante, 0.06608 g (0.125 mmol) del ligante *diep*. La disolución cambió de un color azul claro a verde claro conforme se agregó el ligante. En seguida de la adición total comenzó a precipitar un polvo fino. La mezcla resultante se dejó reposar para favorecer la evaporación del disolvente. Se obtuvieron microcristales color azul oscuro. (0.0157 g, 0.0189 mmol, 15.10 %) (PM = 831.70 uma).

Análisis elemental C₂₆H₃₂Cu₂N₁₂O₁₂

Elemento	Calculado	Observado
C	35.55 %	37.55 %
H	3.88 %	4.10 %
N	20.21 %	20.05 %

Absorbancia

	Estado sólido
$\lambda_{\text{máx}}$ TC	354 nm
$\lambda_{\text{máx}}$ d-d	629 nm

Síntesis del complejo [Cu₂*dmpa*] (NO₃)₄·H₂O

En aproximadamente 15 mL de metanol se disolvieron 0.0586 g (0.25 mmol) de Cu(NO₃)₂·2.5 H₂O y se le adicionaron, bajo agitación y lentamente, 0.0543 g (0.125 mmol) del ligante *dmpa*. En seguida de la adición total del ligante, precipitó un polvo fino verde claro. Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente hasta evaporación completa del disolvente. Se obtuvieron microcristales color verde claro. (0.0398g, 0.05 mmol, 39.32%). (PM =809.73 uma)

Análisis elemental C₂₂H₄₂Cu₂N₁₂O₁₃

Elemento	Calculado	Observado
C	32.63 %	32.89 %
H	5.23 %	5.31 %
N	20.76 %	20.32 %

Absorbancia

	Estado sólido
$\lambda_{\text{máx}}$ TC	359 nm
$\lambda_{\text{máx}}$ d-d	703 nm

Síntesis del complejo $[\text{Cu}_2\text{dmpa}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Se disolvieron 0.0940 g (0.25 mmol) de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en aproximadamente 15 mL de MeOH y se le adicionaron lentamente y con agitación, 0.0543 g (0.125 mmol) del ligante *dmpa*. La disolución se tornó verde oscuro conforme se agregaba el ligante. Se filtró y se dejó reposar hasta evaporación completa del disolvente. Se obtuvo un sólido muy fino color azul oscuro. (0.0257 g, 0.025 mmol, 19.59 %). (PM = 1049.59 uma).

Análisis elemental

Elemento	Calculado	Observado
C	25.18 %	24.78 %
H	4.99 %	4.89 %
N	10.68 %	10.62 %

Absorbancia

	Estado sólido	Disolución
$\lambda_{\text{máx}}$ TC	378 nm	400 nm
$\lambda_{\text{máx}}$ d-d	628 nm	683 nm

5.3. Difracción de rayos X

Para el estudio de difracción de rayos X del compuesto $[\text{Cu}_2\text{diep}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se eligió un monocristal de un tamaño aproximado de 0.55 X 0.52 X 0.31 mm³ y se colocó en el difractómetro a 298 K. La estructura se resolvió mediante métodos directos computacionales. Todos los átomos, excepto los átomos de hidrógeno se resolvieron anisotrópicamente.

A continuación se presentan los datos del refinamiento para este compuesto.

Fórmula Empírica	$\text{C}_{26} \text{H}_{44} \text{Cl}_4 \text{Cu}_2 \text{N}_8 \text{O}_{22}$
Peso Molecular	1089.57
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	$P2_1/c$
Dimensiones de la celda	$a = 10.5610(5) \text{ \AA}$ $b = 14.9935(7) \text{ \AA}$ $c = 13.4829(6) \text{ \AA}$
Ángulos de la celda	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 101.280(4)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen (\AA^3)	2093.73(17)
Z	2
Temperatura (K)	298(2) K

Longitud de onda (Å)	1.54180
Densidad _{calc.} (Mg/m ³)	1.728
Coefficiente de Absorción "μ" (mm ⁻¹)	4.426
Indices Finales R [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0439, wR2 = 0.1108
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0527, wR2 = 0.1162

5.4. Especiación en disolución de los sistemas L / Cu₂L

Previo a los estudios potenciométricos de los ligantes *diep* y *dmpa* y sus complejos dinucleares de cobre(II) se realizaron pruebas de solubilidad de disoluciones de estos sistemas con sales de dos contra iones distintos, nitratos y percloratos. Para esto se encontró que el sistema con el ligante *diep* precipita en un medio con percloratos, mientras que el sistema con el ligante *dmpa* en un medio con nitratos. Por esta razón, todas las disoluciones involucradas en los estudios en disolución se prepararon con nitratos para el ligante *diep* y con percloratos para el ligante *dmpa*.

5.4.1. Estudios potenciométricos

5.4.1.1. Calibración del equipo

En agua

Preparación y calibración del electrodo

Se activó la superficie del electrodo de vidrio sumergiéndolo por 3 min alternadamente en una solución de HNO₃ 0.1 M y NaOH 0.1 M bajo agitación constante por triplicado.

El electrodo se calibró en H₂O a 25 °C utilizando disoluciones amortiguadoras con pH=7, 4 y 10.

Preparación y normalización de NaOH en agua

La disolución de NaOH ≈0.1 M se preparó a partir de una disolución concentrada de este reactivo. Para esto se disolvieron 5 g de hidróxido de sodio en 5 mL de H₂O destilada. La disolución

resultante se dejó reposar por 3 días para asegurar la precipitación de carbonatos. De ésta se tomaron 2.5 mL y se aforaron a 500 mL con agua destilada hervida, evitando así una concentración significativa de carbonatos, >5%, que interfiera en el análisis de determinación de constantes del sistema de interés.

El hidróxido de sodio se normalizó con una disolución 0.02 M de biftalato de potasio como patrón primario. Se pesaron 0.4089 g de biftalato de potasio y se aforaron a 100 mL con una disolución 0.1 M de KNO_3 para fijar la fuerza iónica. Se titularon por triplicado 25 mL de la disolución a 25 °C, bajo agitación constante y atmósfera de N_2 , mediante adiciones de 0.01 mL de NaOH.

Los datos de las curvas de titulación obtenidos por el programa Tiamo 1.3 se analizaron con el programa Origin 8.0. El volumen al punto de equivalencia se obtuvo mediante el método matemático de la segunda derivada, obteniéndose una concentración promedio $[\text{NaOH}] = 0.1070$ M.

Normalización de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ y determinación del $\%\text{CO}_3^{2-}$

Se preparó una disolución de $\text{HNO}_3 \approx 0.1$ M a partir de una disolución concentrada de este reactivo. Se tomaron 3.5 mL de la disolución 14.44 M de ácido nítrico y se llevaron a 500 mL con agua destilada.

Para preparar la disolución de $\text{HClO}_4 \approx 0.1$ M se tomaron 4.305 mL de una disolución 70 % de ácido perclórico y se llevaron a 500 mL con agua destilada.

Ambas disoluciones de ácido se normalizaron con la disolución valorada de NaOH 0.1070 M. Se prepararon 100 mL de diluciones 1:4 de estos ácidos en un medio 0.1 M de KNO_3 para el caso del ácido nítrico y 0.1M de NaClO_4 para el ácido perclórico. Se titularon por triplicado alícuotas de 25 mL de estas disoluciones a 25 °C, bajo agitación constante y atmósfera de N_2 , haciendo adiciones de 0.01 mL de la disolución titulante.

Los datos obtenidos se analizaron de la misma manera que los obtenidos de la valoración de NaOH. La concentración promedio obtenida para cada ácido fue $[\text{HNO}_3] = 0.1010$ M y $[\text{HClO}_4] = 0.1054$ M.

Adicionalmente se realizó el análisis del porcentaje de carbonatos presentes en la disolución de hidróxido de sodio empleando el método de Gran [79].

Este método ha probado ser excelente para la determinación de los puntos de equivalencia (v_{eq}); de acuerdo a éste, en una titulación potenciométrica, los puntos anteriores al v_{eq} ajustan a una recta al aplicárseles la función $\phi = (V_{\text{ini}} + v) \times 10^{-\text{pH}}$, así como los puntos posteriores a v_{eq} al aplicársele la función $\phi' = (V_{\text{ini}} + v) \times 10^{\text{pH}}$. Ambas rectas se intersectan en $\phi = 0$ en el volumen de equivalencia. Sin embargo, si la disolución de la base está contaminada con carbonatos, los puntos posteriores al punto de equivalencia presentarán una curvatura en la región de v_{eq} .

El valor de $v_e = V_H[H^+]/[B]$ (donde $B = ([OH^-] + 2[CO_3^{2-}])$ es la concentración de la base) se puede encontrar utilizando los datos previos al punto de equivalencia. Si la función $\phi'(v)$ es lineal en un intervalo apreciable de v , al extrapolar dicha función intersectará al eje de las abscisas en $v_e' = V_H[H^+]/B'$ (donde B' es la concentración total de iones OH^- en la solución de la base).

De esta manera, para determinar las concentraciones de carbonatos en la disolución de hidróxido de sodio, se aplicaron las funciones ϕ y ϕ' a los datos obtenidos de la normalización de los ácidos HNO_3 y $HClO_4$, obteniéndose dos rectas. Se les realizó un ajuste lineal y se obtuvieron sus ecuaciones del tipo $y = mx + b$. Al igualar y_1 y y_2 a cero, se obtuvieron los valores de x_1 y x_2 , los cuales se introdujeron en la siguiente ecuación para determinar la concentración de carbonatos:

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

En mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v

Preparación y calibración del electrodo

Una vez calibrado el electrodo y normalizado las disoluciones de NaOH, HNO₃ y HClO₄ en medio acuoso, se realizó una calibración del electrodo en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v utilizando una solución amortiguadora de succinatos en dicha mezcla de disolventes. Esta disolución amortiguadora se preparó disolviendo 0.2124 g de ácido succínico en 100 mL de la mezcla MeOH:H₂O y se le adicionaron 0.45 mmol de NaOH. Con estas cantidades se obtiene una disolución amortiguadora de pH = 4.94 [80].

Se calibró el electrodo con un solo punto a 25°C y bajo agitación constante.

Determinación del factor de corrección de pH

Es posible realizar determinaciones potenciométricas en mezclas de disolventes mediante la corrección de los valores obtenidos de la titulación utilizando la siguiente expresión [81]:

$$pH_{corr} = pH_{exp} + \left[\frac{pH_{cal} - pH_{exp}}{pH_{cal}} \right] * Ef$$

donde pH_{corr} es el pH corregido, pH_{exp} el pH experimental; pH_{cal} el pH de calibración del electrodo de vidrio (4.94) y Ef es la eficiencia fem para el factor del sistema de medida.

Para esto se realizó la titulación de un ácido fuerte ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$) en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ con una base fuerte (NaOH). Debido a que la disolución titulante se encontraba en medio acuoso, se requirió preparar una disolución de ácido de una concentración tal que al titular 25 mL de ésta se requirieran 2.5 mL de NaOH como máximo (10 % en volumen) para evitar un cambio significativo en la composición de la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1. Se preparó una disolución de HNO_3 0.0107 M en la mezcla de disolventes. Se tomaron 10.549 mL de la disolución acuosa 0.1010 M de este ácido previamente preparada, se le adicionó el mismo volumen de MeOH y finalmente se aforó a 100 mL con una mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ con fuerza iónica 0.1 M de KNO_3 .

Se titularon por triplicado alícuotas de 25 mL de esta disolución a 25 °C, bajo agitación constante y atmósfera de N_2 realizando adiciones de aproximadamente 0.1 mL de NaOH . Para cada adición de titulante se adquirió el valor de pH y de potencial.

Los datos obtenidos se analizaron en una hoja de cálculo de Excel 2007. Conociendo los valores de pH_{exp} , dados por la lectura del equipo a cada volumen adicionado de NaOH , y el valor del pH_{cal} de la solución amortiguadora de succinatos se alimentó la ecuación antes mencionada dando un valor aleatorio a E_f . Se trazó el gráfico del potencial en función del pH corregido (pH_{corr}) y se varió el valor de E_f hasta obtener una pendiente $m = -59.16$, que es el coeficiente de la ecuación de Nernst cuando $n=1$. Se obtuvo un valor promedio de $E_f = 0.0122$

Adicionalmente se realizó el mismo procedimiento para la determinación del factor de corrección de pH con percloratos como contra iones. La disolución de HClO_4 0.0107 M se preparó a partir de 10.152 mL de la disolución 0.1054 M de éste ácido antes preparado. Se adicionó el mismo volumen de MeOH y se aforó a 100 mL con una disolución 0.1 M de NaClO_4 en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$.

Se tituló la disolución y se analizaron los datos de la misma manera que para el ácido nítrico obteniendo un valor promedio de $E_f = 0.1532$

Estos valores se utilizaron posteriormente en la corrección de los datos potenciométricos de las titulaciones de los sistemas L/Cu_2L .

5.4.1.2. Determinación de las constantes de acidez (pK_a) y constantes de formación ($\log \beta$)

Determinación de las constantes de acidez (pK_a s)

Se prepararon disoluciones ácidas de los ligantes (L) 1 mM en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v. Éstas se prepararon a partir de los ligantes *diap* y *dmpa* y las disoluciones acuosas de HNO_3 0.1010 M y HClO_4 0.1054 M respectivamente. La relación 1:1 v/v de los disolventes $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ se mantuvo al

agregar un volumen igual de metanol por cada volumen utilizado de las disoluciones acuosas. Se aforaron a 100 mL con disoluciones 0.1 M de KNO_3 y NaClO_4 en la mezcla de disolventes para mantener la fuerza iónica constante. Las concentraciones de cada especie en disolución son las siguientes:

$$[L] = 1 \text{ mM y } [\text{H}^+] = 7 \text{ mM}$$

Se titularon por triplicado alícuotas de 25 mL de las disoluciones anteriores a 25 °C, bajo agitación constante y atmósfera de nitrógeno, haciendo adiciones de 0.01 mL de la disolución valorada de hidróxido de sodio 0.1070 M.

Los datos obtenidos por el programa TIAMO 1.3 se analizaron mediante el programa Hyperquad 2003 y se obtuvieron los valores de las constantes de acidez de cada ligante. Con los valores obtenidos se trazaron los diagramas de distribución de especies con el programa MEDUSA.

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

Se prepararon disoluciones 1 mM de los complejos dinucleares de cobre(II) formados *in situ* en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 a partir de los ligantes *diep* y *dmpa*, las disoluciones acuosas de HNO_3 0.1010 M y HClO_4 0.1054 M y disoluciones acuosas estandarizadas de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.1596 M y $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 0.1958 M respectivamente. Para cada disolución se mantuvo la proporción $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v adicionando un volumen igual de metanol por cada volumen de disolución acuosa utilizada. Éstas se aforaron a 100 mL con disoluciones 0.1 M de KNO_3 (*diep*) y 0.1 M de NaClO_4 (*dmpa*) en la mezcla de disolventes para mantener la fuerza iónica. Las concentraciones obtenidas para cada especie son las siguientes:

$$[L] = 1 \text{ mM, } [\text{Cu}^{2+}] = 2 \text{ mM y } [\text{H}^+] = 7 \text{ mM}$$

Se titularon por triplicado alícuotas de 25 mL de estas disoluciones a 25 °C, bajo agitación constante y atmósfera de N_2 , haciendo adiciones de 0.01 mL de la disolución valorada de hidróxido de sodio 0.1070 M.

Los datos obtenidos por el programa TIAMO 1.3 se analizaron mediante el programa Hyperquad 2003 y se obtuvieron los valores de las constantes de formación de los complejos. Con los valores obtenidos se trazaron los diagramas de distribución de especies con el programa MEDUSA.

5.5. Estudios cinéticos y mecanísticos de los complejos $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$

5.5.1. Evaluación de la actividad catecolasa

La actividad catecolasa se evaluó con la reacción modelo de oxidación del 3,5-di-*ter*-butilcatecol (H_2DTBC) a 25 ± 0.1 °C en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v. La reacción se siguió a través del incremento de la banda característica del producto de oxidación 3,5-diter-butil-o-benzoquinona (DTBQ) a 400 nm en función del tiempo. El coeficiente de absortividad molar de la DTBQ se determinó mediante una curva patrón en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v, obteniéndose un ϵ_0 de $1627 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 400 nm.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de la misma manera; se colocó en una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm, 1 mL de disolución amortiguadora (HEPES o TRIS), 1 mL de la disolución de catalizador ($[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$) y 1 mL de la disolución de sustrato (H_2DTBC); siempre en ese orden. Inmediatamente después de la adición del sustrato, se agitó la mezcla de reacción y se adquirieron los espectros de absorción de 200 a 1100 nm cada 0.5 s por 120 s. Cada una de las mediciones se realizó por quintuplicado

De la gráfica de la absorción a 400 nm en función del tiempo, se determinaron las velocidades iniciales dadas por la pendiente, en unidades $\Delta A/s$, de los segundos iniciales después de la adición del sustrato, en los que la variación de la absorbancia era lineal. Estos datos se convirtieron a unidades de concentración de DTBQ producida utilizando el coeficiente de extinción molar de esta especie.

Las disoluciones de partida se prepararon en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v a 25 °C; condiciones que se mantuvieron después del mezclado en la celda. Después del mezclado las concentraciones de cada reactivo se reducen a un tercio de las concentraciones originales. El metanol utilizado en todos los casos fue grado espectrofotométrico. Como blanco para cada estudio se utilizó la disolución amortiguadora en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 en concentración igual a la utilizada en los experimentos.

Es importante hacer notar que todo el material necesario tanto para la preparación como el almacenamiento de la disolución de H_2DTBC , estuvo previamente sumergido en una disolución acuosa de EDTA 0.025 M. Antes de ser utilizado se enjuagó exhaustivamente con abundante agua destilada y metanol para evitar impurezas. Las disoluciones de H_2DTBC se contuvieron en material ámbar para protegerlo de la luz solar.

Se realizaron tres estudios distintos con la finalidad de evaluar la dependencia de la velocidad de la reacción con respecto al pH, a la concentración del catalizador ($[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$) y a la concentración del sustrato (H_2DTBC).

Variación de pH

Para determinar la influencia del pH sobre la actividad catalítica se mantuvieron constantes las concentraciones de los catalizadores $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ y del sustrato H_2DTBC y se varió el valor de pH en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v a 25 °C.

Se prepararon 25 mL de disoluciones amortiguadoras 0.45 M en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v. En la siguiente tabla se muestran las disoluciones preparadas de cada amortiguador.

Amortiguador	pH
HEPES	7.0
	7.5
	8.0
TRIS	8.5
	9.0
	9.5

El valor de pH se ajustó en cada caso con NaOH y HNO_3 para el estudio del complejo con el ligante *diep* y HClO_4 en el caso del estudio con el ligante *dmpa*.

También se prepararon 50 mL de disoluciones 0.06 mM de los complejos $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ y $[\text{Cu}_2\text{dmpa}]^{4+}$ a partir de disoluciones stock 3 mM y 6 mM de éstos respectivamente y 50 mL de una disolución 6 mM de H_2DTBC ; todas en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v.

Se realizaron los estudios cinéticos de la manera antes descrita, obteniéndose las siguientes concentraciones en celda:

$$[\text{Amortiguador}] = 0.15 \text{ M}, [\text{Cu}_2\text{L}] = 0.02 \text{ mM y } [\text{H}_2\text{DTBC}] = 2 \text{ mM}.$$

Para este estudio fue necesario tomar un blanco a cada valor de pH utilizado.

Se realizó de manera paralela un estudio de la influencia del pH en la oxidación del H_2DTBC sin catalizador. Para lo cual, se sustituyó el volumen adicionado del complejo por el mismo volumen de la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v para obtener información de la oxidación debida únicamente al

medio.

Cada una de las mediciones se realizó por quintuplicado, de modo que los resultados presentados son un promedio de dichas lecturas.

De este estudio también se determinó el pH óptimo de la reacción catalizada por cada uno de los complejos estudiados. Este valor de pH se eligió en donde la diferencia entre la velocidad dada por la reacción de oxidación catalizada y la velocidad de la reacción de oxidación debida al medio fuese la mayor.

Variación de la concentración del catalizador

Para la determinación de la influencia de la concentración del catalizador en la velocidad de reacción, se realizaron las mediciones catalíticas manteniendo constante el pH del amortiguador ($\text{pH}_{\text{óptimo}}=8.5$) y la concentración del sustrato.

Se prepararon 5 mL de disoluciones de los complejos de diversas concentraciones a partir de las disoluciones concentradas 3 mM del complejo $\text{Cu}_2\text{diép}$ y 6 mM del complejo Cu_2dmpa . También 50 mL de una disolución 0.45 M del amortiguador TRIS a pH 8.5, y 50 mL de una disolución 6 mM de H_2DTBC , preparada en el instante previo al inicio de la experimentación. Todas ellas en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v. La tabla muestra las concentraciones de cada reactivo para este estudio.

$[\text{Cu}_2\text{L}]_{\text{disolución}}$ (mM)	$[\text{Cu}_2\text{L}]_{\text{celda}}$ (mM)	$[\text{TRIS}]_{\text{celda}}$ (M)	$[\text{H}_2\text{DTBC}]_{\text{celda}}$ (mM)
0.03	0.01	0.15	2.0
0.06	0.02		
0.09	0.03		
0.12	0.04		
0.15	0.05		
0.18	0.06		

Variación de la concentración del sustrato

El efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción se determinó para ambos complejos manteniendo constante el pH de la disolución amortiguadora y la concentración del catalizador.

Se prepararon 5 mL de disoluciones de H₂DTBC de concentraciones variadas en el intervalo 0.3 a 75 mM en el caso del estudio con el complejo [Cu₂*dmpa*]⁴⁺, y en el intervalo 0.06 a 2.1 mM para el complejo [Cu₂*diep*]⁴⁺.

En el caso del estudio con el complejo [Cu₂*dmpa*]⁴⁺ dichas disoluciones se prepararon a partir de una disolución stock 75 mM de H₂DTBC en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v. Se pesaron 0.4188 g de este reactivo, se disolvieron en 12 mL de metanol y se le agregaron poco a poco 12 mL de agua. Finalmente se aforó la disolución a 25 mL con la mezcla de disolventes. De la misma manera se preparó una disolución stock 4 mM del sustrato para preparar a partir de ésta las disoluciones de concentraciones necesarias para el estudio con el complejo [Cu₂*diep*]⁴⁺.

Se prepararon también 50 mL de una disolución 0.45 M del amortiguador TRIS a pH 8.5, y 50 mL de una disolución 0.03 mM de los complejos Cu₂*diep* y Cu₂*dmpa* a partir de disoluciones stock 3 mM y 6 mM de éstos respectivamente; todas ellas en la mezcla MeOH:H₂O 1:1 v/v. En la siguiente tabla se resumen las concentraciones utilizadas en este estudio.

Concentración en celda: [TRIS] = 0.15 M, [[Cu ₂ L] ⁴⁺] = 0.01 mM					
<i>dmpa</i>			<i>diep</i>		
[H ₂ DTBC] _{disolución} (mM)	[H ₂ DTBC] _{celda} (mM)	Relación Cu ₂ L: H ₂ DTBC	[H ₂ DTBC] _{disolución} (mM)	[H ₂ DTBC] _{celda} (mM)	Relación Cu ₂ L: H ₂ DTBC
0.3	0.1	1:10	0.06	0.02	1:2
0.6	0.2	1:20	0.12	0.04	1:4
0.9	0.3	1:30	0.18	0.06	1:6
1.2	0.4	1:40	0.24	0.08	1:8
1.5	0.5	1:50	0.3	0.1	1:10
1.8	0.6	1:60	0.45	0.15	1:15
2.7	0.9	1:90	0.6	0.2	1:20
3.6	1.2	1:120	0.75	0.25	1:25
6.0	2.0	1:200	0.9	0.3	1:30
9.0	3.0	1:300	1.2	0.4	1:40
15.0	5.0	1:500	1.5	0.5	1:50
24.0	8.0	1:800	1.8	0.6	1:60
45.0	15.0	1:1500	2.1	0.7	1:70
75.0	25.0	1:2500			

5.5.2. Interacción de los complejos $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ con H_2DTBC en ausencia de O_2 .

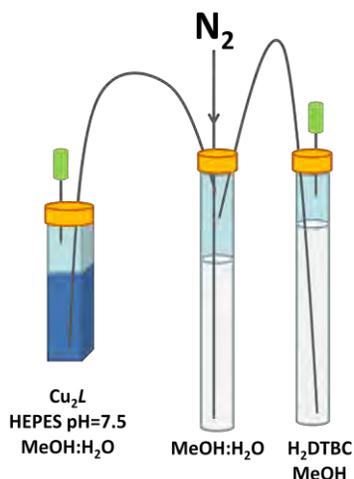
Se estudió espectrofotométricamente la interacción de cada uno de los complejos de $\text{Cu}(\text{II})$ con el sustrato en ausencia de O_2 , para lo cual se realizaron titulaciones espectrofotométricas en ausencia de O_2 de una solución de $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ en un medio amortiguado de pH con una disolución de H_2DTBC .

Se prepararon 10 mL de disoluciones 1 mM de los complejos $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ y $[\text{Cu}_2\text{dmpa}]^{4+}$, 25 mL de disolución amortiguadora 0.45 M HEPES pH = 7.5 y 15 mL de H_2DTBC 60 mM. Las primeras dos en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) v/v y la última en MeOH . En todos los casos el metanol utilizado fue grado espectrofotométrico.

Se colocaron 3.125 mL de la disolución de $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ y 1.665 mL de la disolución amortiguadora HEPES en una celda de cuarzo de paso óptico de 1 cm y finalmente 0.210 mL de la mezcla de disolventes para completar un volumen total en celda $V_t = 5$ mL, de tal forma que las concentraciones en celda fueron las siguientes:

$$[\text{Amortiguador}] = 0.15 \text{ M}, [\text{Cu}_2\text{L}] = 625\mu\text{M}$$

Todas las disoluciones se evacuaron de O_2 mediante el burbujeo continuo de N_2 en una atmósfera saturada de la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) previo a la titulación y durante ésta. Para ello se utilizó un sistema desoxigenado como el que se muestra a continuación:



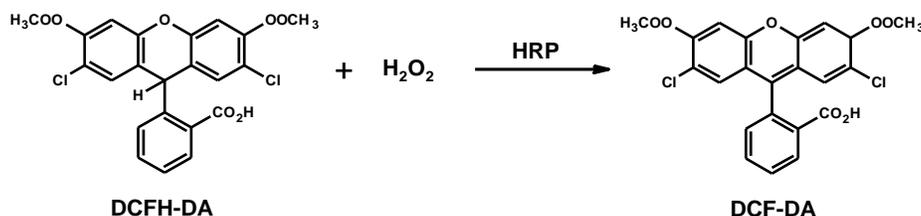
Como blanco se utilizó la disolución amortiguadora en una concentración igual a la utilizada en los experimentos. Se tomó el espectro electrónico del complejo en solución amortiguadora y se realizaron adiciones de 10 μL de la solución 60 mM de H_2DTBC hasta llegar a un volumen

adicionado de 120 μL , adquiriendo el espectro electrónico en el intervalo de 200 a 1100 nm para cada volumen agregado. La relación estequiométrica ($[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}:\text{H}_2\text{DTBC}$) varió de 1:0.2 a 1:2.3.

Adicionalmente se realizó el mismo procedimiento, con la única diferencia que en este caso la titulación se frenó al llegar a la proporción estequiométrica $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}:\text{H}_2\text{DTBC}$ 1:1. Posteriormente se dejó entrar O_2 y se adquirieron los espectros electrónicos cada 2 minutos por 1.5 horas.

5.5.3. Detección de H_2O_2 en la oxidación catalítica de H_2DTBC

La determinación de peróxido de hidrógeno como producto de la reacción catalítica se realizó mediante técnicas fluorimétricas. Para ello se utilizó la siguiente reacción, en la que se produce el fluoróforo DCF como producto de la oxidación [77].



Se preparó una disolución 2 mM de DCFH-DA. Se pesó 1 mg de DCFH-DA y se disolvió en 1 mL de disolución amortiguadora acuosa 0.15 M de TRIS pH = 8.5.

También se preparó una disolución de la peroxidasa de rábano (HRP) en agua (1.2 mg en 0.6 mL de H_2O) que se mantuvo en baño de hielo; una disolución 0.4 mM de H_2O_2 en agua y finalmente la mezcla catalítica de la reacción de oxidación de H_2DTBC (0.75 mL de TRIS 0.15 M pH=8.5 + 0.03 mL de $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ 1mM + 0.72 mL de H_2DTBC 16 mM, todas ellas preparadas en la mezcla $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1), la cual se dejó reaccionar por 1.5 horas en cantidad mínima de O_2 (únicamente la cantidad disuelta en las disoluciones).

A partir de las disoluciones anteriores se prepararon las siguientes mezclas:

- A:** 4mL disolución amortiguadora + 5 μL DCFH-DA + 20 μL HRP + 5 μL H_2O_2 (control positivo).
- B:** 4mL disolución amortiguadora + 5 μL DCFH-DA + 20 μL HRP + 40 μL del producto de reacción catalítica.
- C:** 4mL disolución amortiguadora + 5 μL DCFH-DA + 40 μL del producto de reacción catalítica.
- D:** 4mL disolución amortiguadora + 5 μL DCFH-DA + 40 μL de $[\text{Cu}_2\text{diep}]^{4+}$ 1mM.

Todas las mezclas se dejaron reposar 1.5 horas en ausencia de luz para que la reacción se llevase a cabo completamente.

Se fijaron las longitudes de onda de excitación (485 nm) y de emisión (520 nm) del fluoróforo y se midió la fluorescencia de cada una de las mezclas en el intervalo de 500 a 580 nm con un barrido de 1 nm/s en una celda para fluorescencia con paso óptico de 1 cm.

Una vez detectado el peróxido de hidrógeno como producto de la reacción catalítica, se determinó mediante estudios espectroscópicos UV-Vis si éste se consumía en la reacción de oxidación del H₂DTBC. Para esto se llevó a cabo la oxidación catalítica en exceso de catecol y cantidad mínima de O₂, únicamente la cantidad disuelta en las disoluciones.

Se preparó una disolución amortiguadora 0.3M de TRIS pH=8.5, una disolución 16 mM de H₂DTBC, una disolución 1 mM del complejo [Cu₂*diep*]⁴⁺ y una disolución 2 mM de H₂O₂, todas ellas en la mezcla MeOH:H₂O 1:1.

Se colocó en una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm, 2.1 mL de disolución amortiguadora, 0.084 mL de la disolución del complejo y 2.016 mL de H₂DTBC y se dejó llevar a cabo la reacción de oxidación a celda cerrada. El avance de la reacción se monitoreó mediante el aumento en la absorbancia a 400nm, correspondiente a la formación del producto de oxidación DTBQ. Al finalizar la reacción a consecuencia del insuficiente O₂, dejó de observarse un cambio en la absorbancia. A la mezcla de reacción restante que contenía aún H₂DTBC y [Cu₂L]⁴⁺ se le agregaron 10 µL de H₂O₂, con lo cual no se observó un nuevo aumento en la absorbancia a 400 nm, indicando así que el peróxido de hidrógeno no oxidó al H₂DTBC.

6. Referencias

- [1] S. J. Lippard, J.M. Berg. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, 1ª Ed., Estados Unidos, **1994**.
- [2] R. M. Roat-Malone. *Bioinorganic Chemistry, a Short Course*, John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos, **2002**.
- [3] J. J. R. Fraústo da Silva, R.J.P. Williams. *The Biological Chemistry of the Elements: the Inorganic Chemistry of Life*. Oxford University Press, 2ª Ed., Reino Unido, **2001**.
- [4] K. D. Karlin, *Science*, **1993**, 261, 701-708.
- [5] C. Gerdemann, C. Eicken, B. Krebs, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, 35, 183-191.
- [6] E. I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S.-K. Lee, A. E. Palmer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 4570-4590.
- [7] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin. *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 2563-2605.
- [8] E. I. Solomon, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 3656-3669.
- [9] S. Schindler, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 2311-2326.
- [10] E. A. Lewis, W. B. Tolman, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 1047-1076.
- [11] G.F.Z. da Silva, W.M. Tay, L.-J. Ming, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 16601-16609.
- [12] N. Durán, E. Esposito, *Appl. Catal. B*, **2000**, 28, 83-99.
- [13] R. Hage, A. Lienke, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 206-222.
- [14] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.*, **1998**, 5, 1084-1090.
- [15] A. Rompel, H. Fischer, D. Meiwes, K. Büldt-Karentzopoulos, R. Dillinger, F. Tucek, H. Witzel, B. Krebs, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**, 4, 56-63.
- [16] N. Oishi, Y. Nishida, K. Ida, D. Kida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, 54, 2847-2850.
- [17] J. Ackermann, F. Meyer, E. Kaifer, H. Pritzkow, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 247-258.
- [18] C. H. Kao, H. H. Wei, Y. H. Liu, G. H. Lee, Y. Wang, C. J. Lee, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 84, 171-178.
- [19] J. Mukherjee, R. Mukherjee, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 337, 429-438.
- [20] E. Monzani, L. Quinti, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, P. Faleschini, G. Tabbi, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 553-562.

- [21] E. Monzani, G. Battaini, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Santagostini, G. Nardin, L. Randaccio, S. Geremia, P. Zanello, G. Opromolla, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 5359-5369.
- [22] K. Selmeçzi, M. Réglie, M. Giorgi, G. Speier, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 245, 191-201.
- [23] K. Selmeçzi, M. Réglie, M. Giorgi, G. Pintler, *React. Kinet. Catal. Lett.*, **2004**, 81, 143-151.
- [24] L. Gasque, V. M. Ugalde-Saldívar, I. Membrillo, J. Olguín, E. Mijangos, S. Bernès, I. González, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 1227-1235.
- [25] L. González-Sebastián, V. M. Ugalde-Saldívar, E. Mijangos, M. R. Mendoza-Quijano, L. Ortiz-Frade, L. Gasque, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 1112-1118.
- [26] I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeçzi, J. Reedijk, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 814-840.
- [27] P. K. Bhattacharya. *Metal Ions in Biochemistry*, Alpha Science International Ltd., India, **2005**.
- [28] J. Reedijk, E. Bouwman. *Bioinorganic Catalysis*. Marcel Dekker, Inc, 2^a Ed., Estados Unidos, **1999**.
- [29] I. S. MacPherson, M. E. P. Murphy, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2007**, 64, 2887-2899.
- [30] T. E. Meyer, A. Marchesini, M. A. Cusanovich, G. Tollin, *Biochemistry*, **1991**, 30, 4619-4623.
- [31] A. M. Mayer, E. Harel, *Phytochemistry*, **1979**, 18, 193-215.
- [32] N. Kitajima, K. Fujisawa, Y. Moro-oka, *Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8975-8976.
- [33] C. Eicken, B. Krebs, J.C. Sacchettini, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 677-683.
- [34] C. Belle, K. Selmeçzi, S. Torelli, J.-L. Pierre, *C. R. Chimie.*, **2007**, 10, 271-283.
- [35] I. A. Koval, M. Huisman, A. F. Stassen, P. Gamez, O. Roubeau, C. Belle, J.-L. Pierre, E. Saint-Aman, M. Lüken, B. Krebs, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 4036-4045.
- [36] M. G. Guichinga, S. Striegler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 5150-5156.
- [37] A. Neves, L. M. Rossi, A. J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, C. Wiezbicke, E. Schwingel, W. Haase, S. Ostrovsky, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 1788-1794.
- [38] V. K. Bhardwaj, N. Aliaga-Alcalde, M. Corbella, G. Hundal, *Inorganica Chimica Acta*, **2010**, 363, 97-106.
- [39] M. Thirumavalavan, P. Akilan, M. Kandaswamy, K. Chinnakali, G. Senthil Kumar, H. K. Fun, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 3308-3317.
- [40] C.-H. Kao, H.-H. Wei, Y.-H. Liu, G.-H. Lee, Y. Wang, C.-J. Lee, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 84, 171-178.
- [41] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 3526-3536.
- [42] C. Fernández, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, A. S. Mangrich, E. Rentschler, B. Szpoganicz, E. Schwingel, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 320, 12-21.

- [43] A. Granata, E. Monzani, L. Casella, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, 9, 903-913.
- [44] M. Pascaly, M. Duda, F. Schweppe, K. Zurlinden, F.K. Müller, B. Krebs, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2001**, 828-837.
- [45] J. Reim, B. Krebs, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 3793-3804.
- [46] S. Torelli, C. Belle, S. Hamman, J. L. Pierre, E. Saint-Aman, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 3983-3989.
- [47] I. Koval, K. Selmeczi, C. Belle, C. Philouze, E. Saint-Aman, I. Gautier-Luneau, A. M. Schuitema, M. van Vliet, P. Gamez, O. Roubeau, M. Lüken, B. Krebs, M. Lutz, A. L. Spek, J.-L. Pierre, J. Reedijk, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 6138-6150.
- [48] G. Battaini, L. Casella, M. Gullotti, E. Monzani, G. Nardin, A. Perotti, L. Randaccio, L. Santagostini, F. W. Heinemann, S. Schindler, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 1197-1205.
- [49] M. Kodera, T. Kawata, K. Kano, Y. Tachi, S. Itoh, S. Kojo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2003**, 76, 1957-1964.
- [50] G. Speier, Z. Tyeklár, and P. Tóth, E. Speier, S. Tisza, A. Rockenbauer, A. M. Whalen, N. Alkire, C. G. Pierpont, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 5653-5659.
- [51] J. Kaizer, J. Pap, G. Speier, L. Párkányi, L. Korecz, A. Rockenbauer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 91, 190-198.
- [52] T. Plenge, R. Dillinger, L. Santagostini, L. Casella, F. Tuczek, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2003**, 629, 2258-2265.
- [53] F. B. Stocker, J.L. Kurtz, B. L. Gilman, D. A. Forsyth, *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, No 4. 883-887.
- [54] G. Mendoza-Díaz, W. L. Driessen, J. Reedijk, S. Gorter, L. Gasque, K. R. Thompson, *Inorg. Chimie. Acta*, **2002**, 339, 51-59.
- [55] S.K. Mandal, L.K. Thompson, M.J. Newlands, E.J. Gabe, F.L. Lee, *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 3556-3561.
- [56] K. S. Luna-Ramírez, *Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol y aminoácidos*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2003**.
- [57] A. M. Sosa-Reyes, *Estudio de las propiedades electroquímicas de complejos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol en relación con su actividad catalítica*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, **2006**.
- [58] P. G. Zerón-Espinosa, *Estudio del complejo dinuclear de cobre(II) con un ligante derivado de 2-metilimidazol y etanolamina*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2010**.
- [59] L. González-Sebastián, *Estructura y reactividad del complejo dinuclear de Cu(II) con un ligante derivado de imidazol y piridina*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2005**.
- [60] I. A. Membrillo-Solís, *Estudio de las propiedades electroquímicas y catalíticas de complejos dinucleares de cobre(II)*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2006**.

- [61] I. A. Membrillo-Solís, *Síntesis y caracterización cinética y electroquímica de complejos mononucleares de cobre(II) análogos a sistemas dinucleares*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, **2008**.
- [62] E. E. Mijangos-Aranda, *Estudio estructural, magnético y catalítico de sistemas polinucleares de Cu con ligantes derivados de imidazoles y aminoácidos*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, **2008**.
- [63] E. Mijangos, J. Reedijk, L. Gasque, *Dalton Trans.*, **2008**, 1857–1863.
- [64] I. Monte- Pérez, L. M. Gasque. Publicación en proceso.
- [65] H. Sigel, "Structural Aspects of Mixed-Ligand Complex Formation in Solution", *Met. Ions Biol. Syst.* **2**, **1973**, 63-125.
- [66] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part. B*. Wiley –Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., 5ta Ed., **1986**.
- [67] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, **1996**, **43**, 1739-1753.
- [68] I. Puigdomenech, MEDUSA (Making Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms) <http://www.kemi.kth.se/medusa/>, **2010**.
- [69] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical stability constants*, Plenum Press, N.Y, **1977**.
- [70] A. L. Lehninger. *Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ediciones Omega S. A., 2ª Ed., Barcelona, **1989**. J. S. Thompson, J. C. Calabrese, *Inorg. Chem.*, **1985**, **24**, 3167-3171.
- [71] J. E. House. *Principles of Chemical Kinetics*, Elsevier, Inc. 2a Ed., Estados Unidos, **2007**.
- [72] C.-T. Yang, M. Vetrivelan, X. Yang, B. Moubaraki, K. S. Murray, J. J. Vittal, *Dalton Trans.*, **2004**, 113-121.
- [73] J. S. Thompson, J. C. Calabrese, *Inorg. Chem.*, **1985**, **24**, 3167-3171.
- [74] J. Balla, T. Kiss, R.F. Jameson, *Inorg. Chem.*, **1992**, **31**, 58-62.
- [75] R.M. Johnson, I.W. Siddiqi, *The determination of Organic Peroxides*, Pergaman Press, London, **1970**.
- [76] W. Jakubowski, G. Bartosz, *Cell Biology International*, **2000**, **24**, 757-760.
- [77] O. Myhre, J. M. Andersen, H. Aarnes, F. Fonnum, *Biochemical Pharmacology*, **2003**, **65**, 1575-1582.
- [78] P. Wardman, *Free Radical Biology & Medicine*, **2007**, **43**, 995-1022.
- [79] F. J. C. Rossotti, H. Rossotti, *J. Chem. Ed.*, **1965**, **42**, 375-378.
- [80] T. Mussini, A. K. Covington, P. Longhi, S. Rondinini, *Pure & Appl. Chem.*, **1985**, **57**, 865-876.
- [81] B. Gómez-Zaleta, M. T. Ramírez-Silva, A. Gutiérrez, E. González-Vergara, M. Güizado-Rodríguez, A. Rojas-Hernández, *Spectrochimica Acta Part A*, **2006**, 1002-1009.