



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**FORMACIÓN Y EFECTO CATALÍTICO DEL PUENTE IMIDAZOLATO
EN COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE Cu(II)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. INÉS MONTE PÉREZ



TUTORA: Dra. Laura María Gasque Silva

AÑO: 2011



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.

A mi mamá, mi papá y mi hermano
Con todo mi cariño

Este trabajo se realizó en:

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:

Cuarto Encuentro de Química Inorgánica

Toluca, Estado de México, del 19 al 21 de agosto de 2009

“Especiación de compuestos biomiméticos de Cu(II) con fenmeim en relación con su actividad catalítica”

44° Congreso Mexicano de Química

Puebla, Puebla, del 26 al 30 de septiembre de 2009

“Complejos dinucleares de Cu²⁺: formación de puente imidazolato e influencia en la actividad catalítica”

2° QUIMIUNAM

México D.F., México, del 24 al 26 de noviembre de 2010

“Formación y efecto catalítico del puente imidazolato en compuestos de coordinación de Cu(II)”

Agradecimientos

Agradezco a la UNAM, a la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas por ser las instituciones que me han formado y a las cuales pertenezco orgullosamente.

Al CONACyT por el apoyo financiero recibido durante mis estudios de maestría.

Al PAPIIT por el financiamiento otorgado al proyecto IN210509 que permitió realizar esta investigación.

A los miembros del jurado, de quienes recibí valiosos comentarios que me ayudaron a concluir y mejorar este trabajo.

A mis maestros en esta etapa: Laura Gasque, Armando Marín, Rafael Moreno, Alberto Rojas, David Díaz, Carlos Amador, Mauricio Castro. Gracias por todas las enseñanzas y sobre todo por hacerme disfrutar cada vez más de la química.

A la Dra. Laura Gasque Silva por todo: por permitirme ser parte de un proyecto muy interesante y de un grupo de trabajo cada vez más bonito, pero sobre todo por el apoyo y el cariño que he recibido de ella a lo largo de los años.

Al Dr. Victor Ugalde Saldivar, porque sus asesorías, ideas y sugerencias han sido parte importante de mi formación y de este proyecto.

A la Dra. Núria Aliaga Alcalde por su apoyo y su colaboración en el proyecto y por el gusto de haber trabajado con ella un par de meses muy significativos.

Gracias a mis compañeros del laboratorio 216: Ma. Rosa Mendoza, Carmen Leal y Guillermo Zerón, por formar parte de este proyecto y sobre todo porque cada día es un placer ir a trabajar cuando ustedes están ahí.

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	3
2.1 El cobre en los sistemas biológicos	3
2.2 Sistemas Modelo	7
2.3 La actividad Catecolasa	7
2.4 Estudios en disolución	10
2.5 Construcción de ligantes imidazólicos mediante la reacción de Mannich	11
2.6 Estudios previos de sistemas con ligantes abiertos y puente imidazolato	12
Capítulo 3. Objetivos	16
Capítulo 4. Resultados	17
4.1 Especiación y caracterización de las especies presentes en disolución	17
4.1.1 Estudios potenciométricos	18
4.1.1.1 Calibración en las mezclas de disolventes	19
4.1.1.2 Curvas de titulación	20
4.1.1.3 Determinación de las constantes de equilibrio	24
4.1.2 Estudios espectrofotométricos	32
4.1.3 Estudios por RPE	35
4.1.4 Estudios magnéticos en estado sólido	38
4.1.4 Estudios electroquímicos	44
4.2 Evaluación cinética de la actividad catecolasa	48
4.2.1 Efecto de la variación de $[Cu_2L]$ a distintos valores de pH	52
4.2.2 Efecto de la variación de pH	55
4.2.3 Efecto de la variación de $[3,5-DTBC]$	57
Capítulo 5. Conclusiones	61
Capítulo 6. Parte Experimental	62
6.1 Reactivos utilizados	62
6.2 Equipo utilizado	63
6.3 Metodología	63
6.3.1 Síntesis	63
6.3.1.1 Síntesis del ligante fenmeim	63
6.3.1.2 Síntesis del ligante leumeim	64
6.3.1.3 Síntesis del complejo Cu_2 fenmeim	65
6.3.2 Especiación y caracterización de las especies presentes en disolución	65
6.3.2.1 Estudios potenciométricos	65
6.3.2.1.1 Titulaciones en H_2O	67
6.3.2.1.2 Titulaciones en $MeOH:H_2O$	67
6.3.2.1.3 Titulaciones en $MeCN:H_2O$	69
6.3.2.2 Estudios espectrofotométricos	70
6.3.2.3 Estudios con RPE	70
6.3.2.4 Estudios magnéticos en estado sólido	71
6.3.2.5 Estudios electroquímicos	72
6.3.3 Evaluación de la actividad catecolasa	73
6.3.3.1 Efecto de la variación de $[Cu_2L]$ a distintos valores de pH	74
6.3.3.2 Efecto de la variación de pH	76
6.3.3.3 Efecto de la variación de $[3,5-DTBC]$	78
Capítulo 7. Referencias	80

Lista de abreviaturas

fenmeim	4,5-bis(fenilalanil-N-metil)-2-metilimidazol
leumeim	4,5-bis(leucil-N-metil)-2-metilimidazol
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrilo
L	Ligante (a partir de los objetivos se utilizará para referirse a los ligantes fenmeim y leumeim en particular)
Cu ₂ L	Complejo dinuclear de Cu(II) con un ligante L
3,5-DTBC	3,5-diterbutilcatecol
3,5-DTBQ	3,5-diterbutilquinona
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
UV-vis	Ultravioleta- visible
TCLM	Transferencia de carga del ligante al metal
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'[2-etanosulfónico])
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
ϵ	Coefficiente de absortividad molar
v_0	Velocidad inicial
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_{max}	Velocidad máxima
k_{cat}	Constante catalítica

Capítulo 1. Introducción

Desde hace algunos años, la química inorgánica y la bioquímica se aliaron en la búsqueda de una mejor comprensión de los procesos biológicos mediados por metales; surgió así una nueva disciplina llamada química bioinorgánica. Ciertas propiedades únicas de los metales, que les permiten llevar a cabo procesos complejos de óxido reducción y cumplir con funciones estructurales propias, siguen siendo motivo de sorpresa y objeto de estudio de muchos científicos.

Típicamente, en los sistemas biológicos los metales se encuentran en el sitio activo de diversas metaloenzimas, cuyo estudio presenta un problema importante: por su tamaño y complejidad, su manipulación es sumamente compleja. Gran parte de su peso molecular está dado por la parte proteica, fundamental para su funcionalidad, pero que dificulta el conocimiento del sitio activo. Por este motivo, se suele trabajar con modelos sintéticos que imitan únicamente al sitio activo.

El cobre es uno de los elementos que se presenta más frecuentemente en la naturaleza, donde suele llevar a cabo procesos relacionados con el metabolismo de oxígeno y el transporte de electrones. En el sitio activo de diversas metaloenzimas, lo encontramos coordinado a imidazoles y en muchos casos formando sistemas dinucleares. Estas características estructurales son reproducidas por los sistemas modelo que comúnmente se evalúan como catalizadores en reacciones de oxidación.

Una de las propiedades más importantes y definitorias de la química biológica es que ésta se lleva a cabo en medio acuoso; una consecuencia fundamental de trabajar en estas condiciones, es que las reacciones son profundamente dependientes del pH. Para una mejor comprensión de la naturaleza de las metaloproteínas y metaloenzimas, el trabajo con sistemas modelo en medios acuosos o parcialmente acuosos y la evaluación del impacto del pH en ellos resulta fundamental.

En este trabajo se presenta el estudio de los compuestos de coordinación de Cu(II) con dos ligantes (L) derivados del imidazol: leumeim y fenmeim. Estos ligantes pueden formar complejos dinucleares y tienen como principal característica su capacidad para formar una estructura conocida como puente imidazolato, la cual permite a los dos átomos metálicos comunicarse magnéticamente y por lo tanto actuar como modelo de las metaloenzimas de cobre de tipo III, entre las que se incluye la catecolasa.

El interés de este proyecto es conocer las condiciones en las cuales los sistemas Cu_2L presentan el puente imidazolato en disolución y evaluar si esta estructura tiene influencia en la actividad catecolasa de los sistemas. Para conseguirlo se realizaron las titulaciones potenciométricas de los sistemas Cu_2L en H_2O , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$, de su análisis se obtuvieron las constantes de formación de complejos y con ellas se construyeron los diagramas de distribución de especies en cada medio.

Las titulaciones se siguieron también espectrofotométricamente y por RPE para corroborar la presencia de la especie puenteada y caracterizarla en disolución. Para conocer la magnitud de la interacción entre los dos iones metálicos, se realizaron también estudios magnéticos en estado sólido del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ con puente imidazolato. Adicionalmente se llevaron a cabo estudios electroquímicos que permitieron diferenciar el comportamiento de las distintas especies presentes en disolución.

Finalmente se hicieron estudios cinéticos de los sistemas Cu_2L , para evaluar su actividad en la reacción de oxidación del 3,5-diterbutilcatecol (3,5-DTBC) en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$. Los resultados de estos estudios se correlacionaron con los diagramas de distribución obtenidos para contestar la pregunta que motivó este proyecto.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 El cobre en los sistemas biológicos

En nuestro universo existen 111 elementos químicos, los cuales componen absolutamente todo lo que conocemos y estudiamos. De éstos sólo 25, incluyendo al cobre, son esenciales para la vida [1]. Plantas y animales necesitan del cobre para poder llevar a cabo sus funciones pues este elemento se encuentra formando el sitio activo de diversas metaloproteínas.

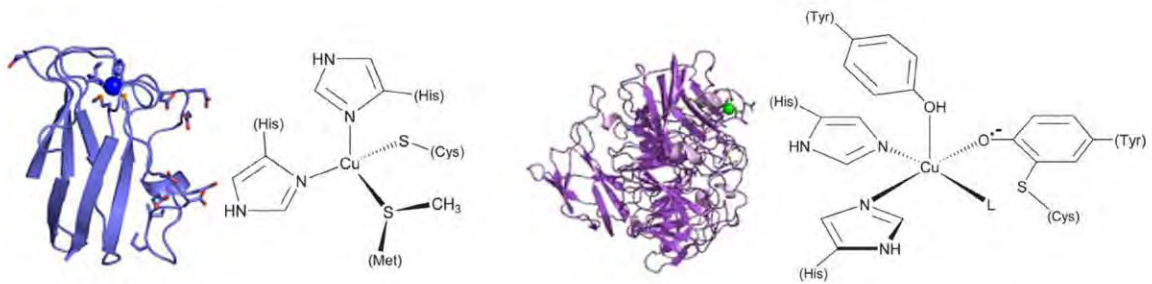
Evolutivamente, el cobre se considera un bioelemento moderno [2], pues sólo cobró importancia biológica una vez que la atmósfera se volvió oxidante. Al inicio, la atmósfera estaba constituida principalmente por N_2 y CO_2 . Se trataba de un ambiente reductor donde el cobre estaba en forma de Cu(I) insoluble y el hierro en forma de Fe(II) soluble. En estas condiciones los compuestos de hierro eran los fundamentales para realizar las funciones vitales de los organismos. Éstos organismos empezaron a producir O_2 y la nueva atmósfera oxidante permitió que el Cu(I) se oxidara a Cu(II). El Cu(II) soluble empezó a ser también biológicamente relevante. Ahora existen muchas enzimas de cobre y de hierro que realizan funciones análogas, diferenciadas por sus potenciales rédox y sus ambientes de coordinación.

Las metaloproteínas de cobre han sido muy estudiadas y se han usado diversos criterios para clasificarlas. Las dos clasificaciones más importantes se basan: una en la función que desempeñan y la otra en la estructura de su sitio activo. Ninguna de las clasificaciones es excluyente y ambas nos dan información acerca del cobre en los seres vivos.

En la tabla 1 se presenta la clasificación de las proteínas de cobre según la estructura de su sitio activo [3] y en la figura 1 se pueden observar algunos ejemplos.

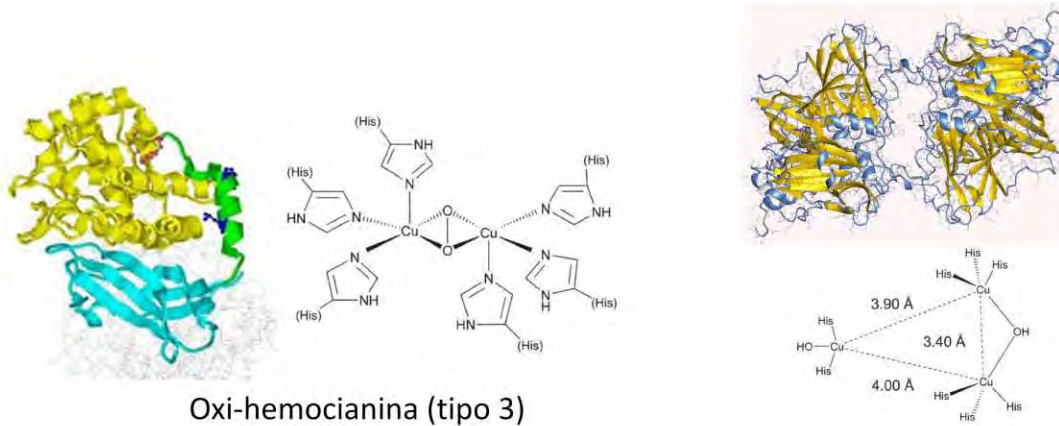
Tabla 1. Clasificación de metaloproteínas de cobre según la estructura de su sitio activo.

Sitio activo	Estructura	UV-vis	RPE	Ejemplos
Tipo 1 Proteínas azules de cobre	Cu coordinado a dos histidinas (donadoras por N) y una cisteína (donador por S)	Azul: banda intensa TCLM $\approx 600\text{nm}$		Plastocianina Azurina Ascorbato oxidasa Nitrito reductasa
Tipo 2 Proteínas "normales" de cobre	Cu coordinado a 4 átomos donadores por N y/o O en geometría plana cuadrada o tetraedro distorsionado	Azul: banda de transición d-d (menos intensa)	Similar a complejos comunes de Cu(II)	Cu-Zn superóxido dismutasa Galactosa oxidasa Fenilalanina hidroxilasa
Tipo 3	Sitio dinuclear de Cu(II) donde ambos están coordinados a 3 histidinas (donadoras por N)		Fuerte acoplamiento antiferromagnético. EPR silencioso	Hemocianina Tirosinasa Catecol oxidasa
Tipo 4	Sitio activo compuesto por un sitio tipo 2 y otro tipo 3 formando un cúmulo trinuclear triangular. Algunas veces contienen también un sitio tipo 1.		Señal de RPE debida al sitio de tipo 2	Metano mono-oxigenasa Laccasa Ascorbato oxidasa Ceruloplasmina
Cu_A Sitio de valencia mixta	Sitio dinuclear de Cu con estado de oxidación +1.5 para cada metal. Ambos metales con geometría tetraédrica y puenteados por dos cisteínas. Cada Cu coordinado a una histidina (donador por N).		Espectro con patrón característico de 7 líneas.	Citocromo c oxidasa Óxido nitroso-reductasa
Cu_B	Un Cu mononuclear coordinado por tres histidinas (donadoras por N) en una geometría piramidal trigonal. Sin ligante en la cuarta posición. Cercano a un centro de hierro.		Fuerte acoplamiento antiferromagnético Cu-Fe	Citocromo c oxidasa
Cu_Z	Cuatro iones de Cu arreglados en un tetraedro distorsionado puenteados por un sulfuro inorgánico y coordinados por 7 histidinas (donadores por N) y un hidróxido.		Espectro de 4 líneas provenientes de dos esquemas de estados de oxidación distintos.	Óxido nitroso-reductasa



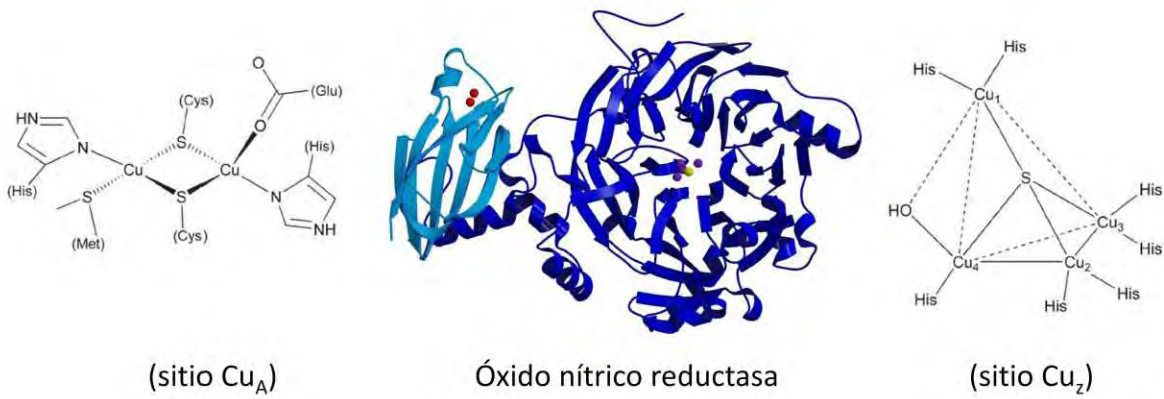
Plastocianina (tipo 1)

Galactosa oxidasa (tipo 2)



Oxi-hemocianina (tipo 3)

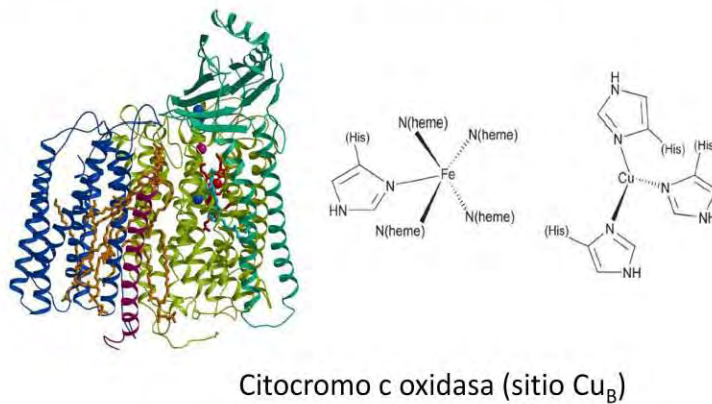
Ascorbato oxidasa (tipo 4)



(sitio Cu_A)

Óxido nítrico reductasa

(sitio Cu₂)



Citocromo c oxidasa (sitio Cu_B)

Figura 1. Tipos de sitios activos de algunas metaloproteínas de cobre.

Algo que resulta importante destacar de esta clasificación es el hecho de que en todos los casos el cobre se encuentra coordinado a imidazoles provenientes de histidinas, siendo esta la característica estructural común y más significativa en todas las metaloenzimas de cobre.

En cuanto a la clasificación según su función, se han identificado 4 procesos que llevan a cabo las proteínas de cobre:

1. Transporte, almacenamiento y recepción de iones metálicos
2. Transferencia electrónica
3. Transporte, almacenamiento y recepción de dioxígeno
4. Catálisis

La actividad que resulta particularmente interesante para nuestro grupo es la de la catálisis. Las proteínas que se encargan de catalizar reacciones químicas se conocen como enzimas y en particular las enzimas que contienen átomos metálicos en su sitio activo son llamadas metaloenzimas.

En las metaloenzimas la catálisis se lleva a cabo con la intervención del metal, así que la naturaleza de éste y la funcionalidad de la enzima se encuentran directamente relacionadas. En las enzimas de cobre, muchos de los procesos catalíticos involucran reacciones de óxido reducción y particularmente aquellas asociadas al metabolismo del dioxígeno.

La bioquímica del oxígeno es profundamente interesante [4, 5]. La molécula de dioxígeno posee un estado basal triplete ($S=1$) a diferencia de casi todas las moléculas orgánicas que tienen un singulete ($S=0$) como estado basal. Esto hace que la adición de oxígeno a moléculas orgánicas esté prohibida por espín y permite que exista vida en una atmósfera tan oxidante como la nuestra.

Existen dos maneras en las que se puede superar la prohibición por espín: por un lado, mediante la combustión a altas temperaturas por medio de radicales libres, donde se producen luz y calor sin ningún control, y por el otro mediante la oxidación lenta que permite el metabolismo del dioxígeno de forma controlada y para la cual se requiere una regulación enzimática sutil, dada precisamente por las metaloenzimas.

De ahí que el estudio de estos procesos sea tan importante e interesante y que la actividad del cobre en este tipo de reacciones sea de gran interés y ampliamente estudiada desde hace algún tiempo.

2.2 Sistemas Modelo

El estudio de las metaloenzimas y los mecanismos que emplean para llevar a cabo su función catalítica es un tema de gran interés. Sin embargo, debido a los problemas que se derivan de su obtención, manipulación y modificación, se han establecido otras herramientas que nos pueden dar información de lo que sucede en el sitio activo de algunas de ellas.

Una de estas herramientas es el uso de lo que se denomina “sistemas modelo” [6]. Estos son modelos del sitio activo de la metaloenzima. Se trata de compuestos de coordinación de bajo peso molecular que reproducen una o varias de las características del sitio, ya sea física o funcionalmente.

Los sistemas modelo de metaloenzimas de cobre, cuentan con uno o más átomos de cobre coordinados a ligantes nitrogenados derivados del imidazol, lo cual es una característica fundamental del cobre en los sistemas vivos. Son particularmente interesantes los modelos de metaloenzimas de cobre del tipo III pues, como ya se mencionó, son sistemas dinucleares que presentan acoplamiento entre los dos metales para llevar a cabo su función catalítica lo cual los hace sistemas muy atractivos para su estudio.

2.3 La actividad catecolasa

Los sistemas modelo no solamente imitan las características físicas de los sitios activos, también se pretende reproducir las características funcionales de las metaloenzimas. Hay mucho trabajo hecho en este sentido [3, 7-10] no sólo para entender mejor qué sucede en el sitio activo de las enzimas sino también para diseñar y la obtener nuevos catalizadores [3]. Las enzimas son los mejores catalizadores existentes y contar con su efectividad en procesos químicos, no únicamente biológicos, podría mejorar la eficiencia de muchos procesos industriales.

Para el caso de compuestos bimetálicos de cobre, la eficiencia catalítica se evalúa con una reacción modelo que permite comparar la actividad de distintos sistemas. Se trata de la reacción de oxidación de catecoles a quinonas en presencia de oxígeno. A este proceso se le conoce con el nombre de “actividad catecolasa” la cual es realizada por la enzima catecol oxidasa (figura 2) en los sistemas vivos.

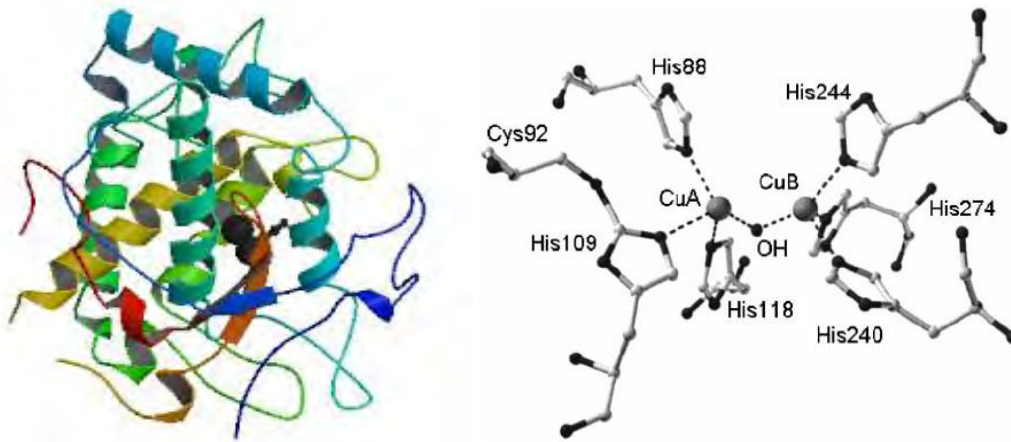


Figura 2. Estructura del monómero de la enzima catecol oxidasa y vista de su sitio activo (metaloproteína de cobre de tipo 3)

Las catecol oxidasas son metaloenzimas de cobre presente en plantas con sitio activo del tipo III, que catalizan la oxidación de una variedad de catecoles hacia sus respectivas quinonas, acoplándola a la reducción de cuatro electrones de dioxígeno a agua. El mecanismo que se propone para explicar estas conversiones se describe a continuación [9].

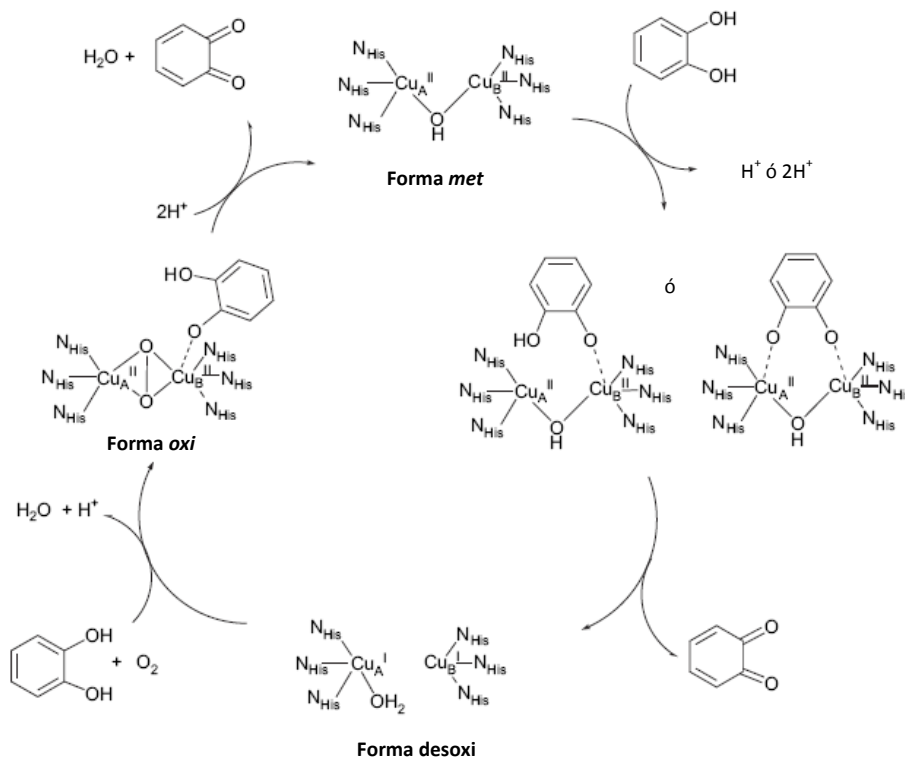


Figura 3. Mecanismo propuesto para la oxidación enzimática de catecol a su respectiva quinona.

1. La enzima empieza en su forma *met*, con un puente OH formado entre los dos átomos de cobre fuertemente acoplados antiferromagnéticamente.
2. La primera oxidación de catecol es estequiométrica (1:1 con el sistema dimetálico), se lleva a cabo en ausencia de oxígeno y produce la forma reducida *desoxi* del sitio activo.
3. La reoxidación de sitio activo se lleva a cabo únicamente en presencia de oxígeno, cuando se unen al sitio activo tanto el oxígeno (forma *oxi*), como un segundo catecol.
4. La última etapa consiste en la regeneración de la forma *met* de la enzima y la liberación de una segunda quinona y agua.

Existen aún algunas preguntas respecto a este mecanismo, y se ha encontrado que los ciclos catalíticos de diversos sistemas modelos difieren del propuesto para la enzima [7, 8, 11]. Por lo que se puede afirmar que el estudio mecanístico de distintos sistemas catalíticos biomiméticos en esta reacción particular dista mucho de estar terminado. En nuestro grupo de trabajo se están llevando a cabo actualmente estudios dirigidos en este sentido [12] pero este tema escapa a los intereses del proyecto.

Para probar la actividad catecolasa de nuevos sistemas se suele utilizar el 3,5-diterbutilcatecol (3,5-DTBC) como sustrato. Los grupos terbutilo, al ser muy voluminosos, le confieren estabilidad al catecol frente a oxidaciones posteriores y a la ruptura del anillo. Además el 3,5-DTBC cuenta con un potencial rédox bajo lo que facilita su oxidación [13]. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Figura 4. Esquema de la reacción modelo de oxidación de *o*-catecoles.

El producto de esta reacción es fácilmente monitoreable mediante espectrofotometría UV-vis, pues la 3,5-diterbutilquinona (3,5-DTBQ) presenta una banda característica con un máximo en longitudes de onda cercanas a 400 nm.

Como se mencionó en párrafos anteriores, la importancia de que exista una reacción modelo es que permite comparar la actividad de distintos catalizadores sintetizados. Debido a problemas de

solubilidad del catecol, esta reacción no puede llevarse a cabo en agua y se suelen usar disolventes como metanol, acetonitrilo o mezclas de éstos con agua. Sin embargo, aún nos topamos con dificultades al momento de hacer comparaciones, pues las metodologías no están completamente estandarizadas. Por esto, resulta de importancia estandarizar las condiciones de manera que permitan la comparación de las actividades.

2.4 Estudios en disolución

Gran parte de las reacciones químicas de los sistemas vivos ocurren en disolución acuosa. El cuerpo humano, por ejemplo, está constituido en un 66% por agua, de ésta aproximadamente el 60% se encuentra dentro de las células y es precisamente ahí donde ocurren la mayoría de las reacciones metabólicas [14].

Al trabajar con sistemas modelo se busca una mejor comprensión de la química que sucede en los seres vivos, ya sea por el simple placer de conocer a la naturaleza o pensando en una posible aplicación industrial y una de las propiedades más importantes y definitorias de la química biológica es que ésta sucede en un medio acuoso.

Una consecuencia fundamental derivada de trabajar en medio acuoso, es que las reacciones biológicas son profundamente dependientes del pH del medio. En varios casos esta dependencia se debe al cambio en la estructura de alguno de los reactivos o del catalizador al cambiar el pH. Basta con pensar en la estructura terciaria de las proteínas, ésta es en gran medida responsable de su actividad catalítica y depende por completo del pH del medio, por lo que la actividad de una enzima, su estructura y el pH de trabajo están íntimamente relacionados.

También la estructura de los sistemas modelo es dependiente del pH, pues se trata de compuestos de coordinación que involucran enlaces entre un metal y ligantes con átomos donadores capaces, en muchos casos, de hidrolizarse y protonarse según el pH al que se encuentren. Por eso resulta muy importante realizar una correcta caracterización de los sistemas modelo en disolución y así conocer la estructura de la especie presente en solución en las condiciones de trabajo.

La actividad catecolasa de sistemas modelo se evalúa en disolventes como MeOH y MeCN o en mezclas de éstos con agua. En nuestro grupo de trabajo consideramos que, para comprender mejor la relación estructura-actividad de nuestros sistemas, es fundamental obtener la especiación también en estos medios y no únicamente en agua, pues esto nos permite conocer la

estructura de la especie activa en las condiciones exactas de trabajo. En este proyecto se hará especial énfasis en este punto y particularmente en el establecimiento de metodologías para conseguirlo.

2.5 Construcción de ligantes imidazólicos mediante la reacción de Mannich

El trabajo de nuestro grupo reside en el campo de la catálisis biomimética. Nuestro interés es sintetizar compuestos bimetálicos de cobre, variando propiedades estructurales de los ligantes y relacionándolas con la actividad catalítica de los complejos en la reacción modelo. Resulta de gran interés conocer lo que sucede con estos sistemas en disolución en los medios en que se lleva a cabo la catálisis y determinar las características de la especie activa.

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, la característica principal del cobre en sistemas biológicos es que se encuentra coordinado a histidinas mediante el heterociclo conocido como imidazol. Los sistemas biomiméticos de cobre, entonces, suelen incluir imidazoles en la estructura de sus ligantes. Una manera de obtener ligantes derivados del imidazol capaces de formar complejos dinucleares es mediante la reacción de Mannich [15].

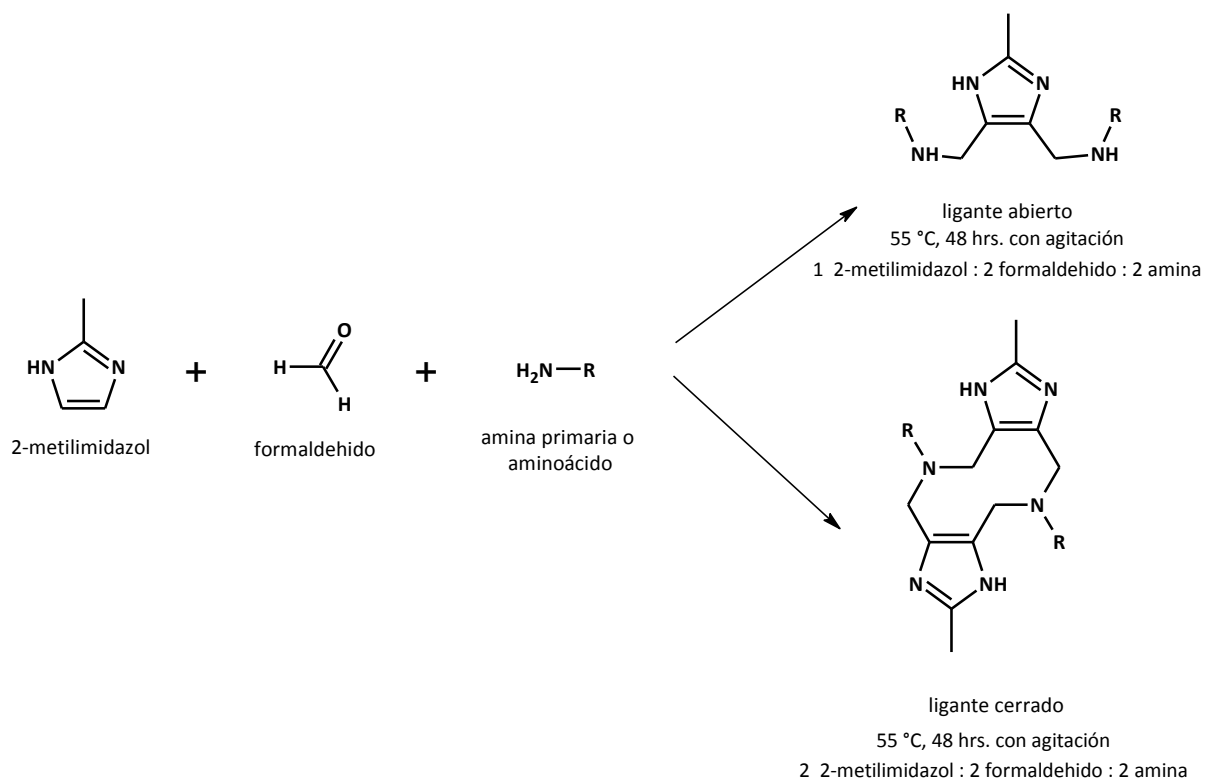


Figura 5. Reacción de Mannich para obtener ligantes abiertos y cerrados.

La reacción de Mannich permite, en un solo paso, introducir grupos amino o aminoácido a un anillo imidazólico [16]. Esta reacción en medio básico ha sido utilizada desde hace algunos años por nuestro grupo de trabajo para sintetizar una gran variedad de ligantes que se han clasificado en dos grandes familias: ligantes abiertos y ligantes cerrados (figura 5). Solamente se han obtenido ligantes del tipo abierto al usar aminas quirales en el carbono α a la amina, pero las condiciones para obtener uno u otro no son muy claras y se siguen estudiando.

Los ligantes de tipo cerrado se caracterizan por tener sitios de coordinación equivalentes para los átomos de cobre, sin embargo en el complejo estos últimos se encuentran distantes y coordinados a imidazoles distintos. Este tipo de ligantes se han obtenido utilizando aminas como 2-(2-aminoetil)-piridina (diep) [12], n-propilamina (promeim) [17], glicina (glimeim) [18] y etanolamina (dihe) [19] entre otras.

Los ligantes de tipo abierto, por otra parte, se caracterizan por tener dos sitios de coordinación para átomos de cobre que pueden ser equivalentes en caso de que el anillo de imidazol pierda el protón del nitrógeno y se convierta en un imidazolato. En este caso los átomos de cobre quedan unidos por la estructura conocida como “puente imidazolato”. Se han obtenido ligantes de este tipo usando los aminoácidos alanina (alameim) [20], L-fenilalanina (fenmeim), L-leucina (leumeim) y metionina (metmeim) [13].

En este trabajo se estudiarán los sistemas dinucleares de cobre con dos ligantes de tipo abierto: fenmeim y leumeim, cuyas estructuras se presentan en la figura 6.

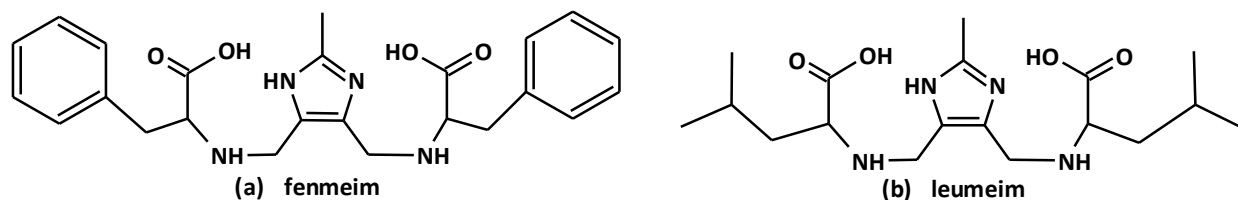


Figura 6. Estructura de los ligantes de tipo abierto fenmeim (a) y leumeim (b).

2.6 Estudios previos de sistemas con ligantes abiertos y puente imidazolato

El interés en los ligantes abiertos reside en la posibilidad que tienen de formar el puente imidazolato. Ésta es una estructura presente en enzimas como la superóxido dismutasa [21] donde un imidazolato se encuentra formando un puente entre un Cu(II) y un Zn(II), como puede observarse en la figura 7.

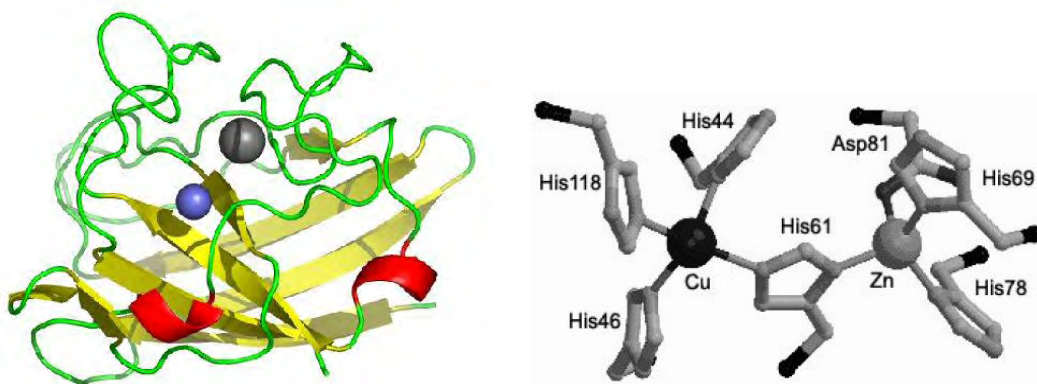


Figura 7. Estructura y representación esquemática del sitio activo de la superóxido dismutasa.

Se ha encontrado que el imidazolato, al actuar como puente entre los dos centros metálicos paramagnéticos, permite que haya un acoplamiento antiferromagnético importante entre ellos [22, 23, 24, 25]. Esto hace que sistemas con esta estructura puedan ser buenos modelos de sitios activos de cobre de tipo 3, que se caracterizan por tener dos átomos de cobre fuertemente acoplados (espectro de RPE silencioso).

En el grupo de trabajo se han obtenido 4 ligantes que pueden presentar esta estructura: alameim [20], metmeim, leumeim y fenmeim [13]. De los sistemas Cu_2L (donde L=ligante abierto)¹, solamente se han obtenido dos estructuras cristalinas: $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y $\text{Cu}_2\text{leumeim}$. Dichas estructuras se presentan a continuación:

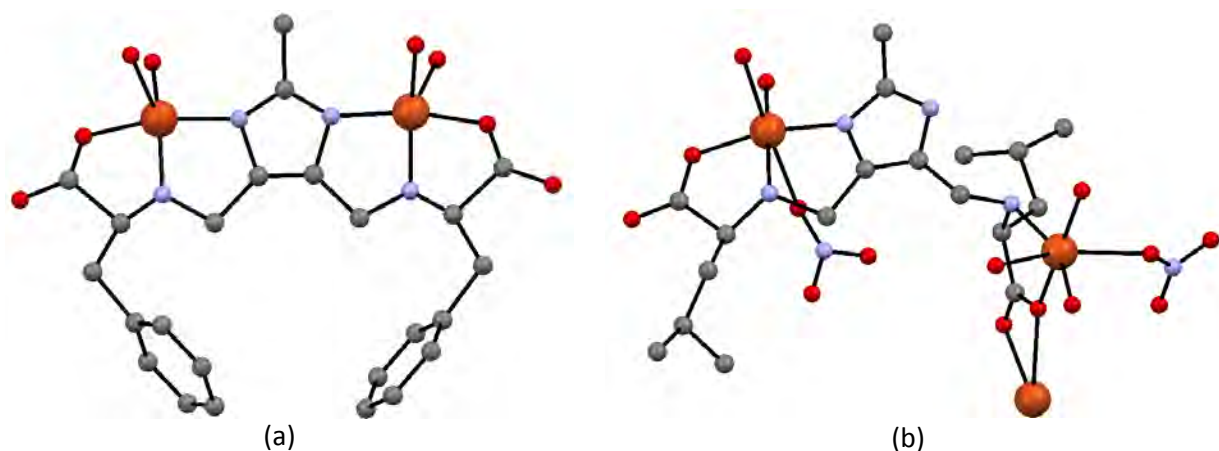


Figura 8. Estructuras obtenidas mediante difracción de Rayos X de los compuestos $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ (a) y $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ (b).

¹ La abreviatura L se usará, a partir de este momento, para referirse en conjunto a los dos ligandos que son tema de estudio: fenmeim y leumeim.

Los cristales de los que se obtuvo la estructura del complejo $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ se obtuvieron en agua en medio ácido y utilizando nitratos como contraiones [26]; mientras que los usados para determinar la estructura del $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ se obtuvieron en la mezcla $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v:v) utilizando nitratos o percloratos como contraiones [13]. Como se puede observar, las estructuras obtenidas son muy distintas: el compuesto $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ no presenta puente imidazolato mientras que el compuesto $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ sí.

Las estructuras obtenidas mediante difracción de rayos X no nos hablan directamente de lo que sucede en la disolución, pero sí indican que existen tanto la especie puenteada como la que no presenta el imidazolato. Será de interés conocer las condiciones a las cuales está presente cada una de estas estructuras y qué efecto tienen en la actividad de los sistemas. Para contestar a estas interrogantes será necesario realizar un amplio estudio en disolución y una detallada evaluación catalítica.

Para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ se llevó a cabo, en un trabajo previo [27], un amplio estudio electroquímico y un estudio cinético preliminar, ambos en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ a $\text{pH}=7.5$. Como parte del estudio electroquímico del complejo, se obtuvo el conjunto de voltamperogramas que se presenta en la figura 9. En él se pueden observar dos picos de reducción con un solo pico de oxidación asociado (la señal de oxidación que aparece cerca de -0.1V se debe a la re-oxidación de cobre metálico formado en el electrodo cuando se llega a potenciales muy bajos).

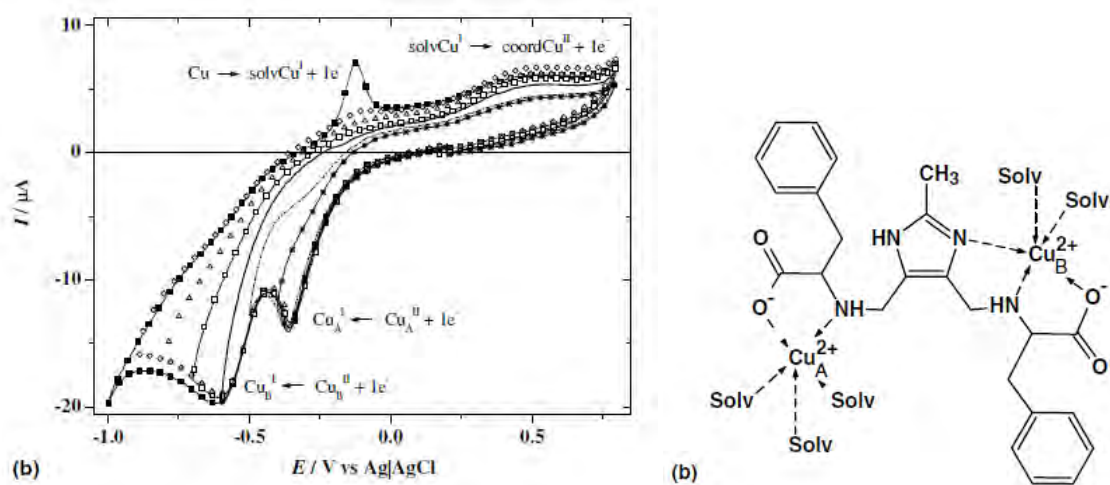


Figura 9. Voltamperograma obtenido en un estudio previo para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ a $\text{pH}=7.5$ y estructura propuesta del sistema en disolución.

La presencia de dos señales de reducción se explicó considerando que en disolución el puente imidazolato no se encuentra formado y por lo tanto hay dos átomos de cobre no-equivalentes (Figura 9 (b)). Se propuso que cada uno de los átomos metálicos se reduce de forma independiente, que los Cu(I) formados se solvatan y se disocian del ligante y que, por último, se oxidan de forma equivalente regresando a su forma oxidada y coordinada.

Sin embargo, existen otras propuestas para explicar las dos señales de reducción en sistemas simétricos con puente imidazolato. Varios autores han propuesto que el hecho de que el cobre se reduzca en dos pasos es indicativo de que los átomos de cobre están interactuando lo suficiente para hacerlos inequivalentes frente a la reducción [22, 28]. La reducción en dos pasos de sistemas con puente imidazolato se ha observado en varios sistemas [22, 23, 25, 28].

Esto nos llevó a pensar que en el sistema Cu₂fenmeim en las condiciones de estudio, posiblemente sí esté formado el puente y pueda ser necesaria una re-interpretación de los voltamperogramas.

Para corroborar o refutar la propuesta de los átomos de cobre no equivalentes en disolución, es necesario realizar una especiación detallada y buscar otras evidencias que nos ayuden a elucidar si el puente imidazolato se forma en disolución en el sistema Cu₂fenmeim (recuérdese que en estado sólido sí se forma) y también para el sistema Cu₂leumeim, del que se tiene evidencia en estado sólido de los dos átomos de cobre no equivalentes.

Como ya se mencionó, además del estudio electroquímico, en el trabajo previo se realizó un estudio preliminar de la actividad catecolasa del sistema Cu₂fenmeim en MeCN:H₂O a pH=7.5. Los resultados fueron muy desalentadores pues el sistema presentó una actividad despreciable. Sin embargo, en otros trabajos del grupo [18, 29, 30], se ha observado que las condiciones en que fue evaluada la actividad catalítica son en las que se obtiene la menor actividad. Los complejos suelen ser más activos en MeOH:H₂O y a valores de pH más altos. Se requiere hacer una evaluación cinética más completa para el sistema Cu₂fenmeim, así como para Cu₂leumeim.

En este trabajo, esperamos poder relacionar la actividad catalítica con la especiación, lo que nos indicará cuáles especies en disolución son activas y cuáles no, y así contribuir a los estudios de la relación estructura-actividad de los sistemas modelo. Particularmente queremos dilucidar si la especie con puente imidazolato se forma en disolución y si presenta alguna actividad catalítica, como es de esperarse.

Capítulo 3. Objetivos

- Determinar, para los sistemas $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y $\text{Cu}_2\text{leumeim}$, las condiciones en las que la estructura que incluye al puente imidazolato está presente en disolución en 3 distintos medios: H_2O , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$.
- Buscar evidencias de la existencia en disolución de una estructura con puente y otra sin puente según las condiciones de trabajo para los sistemas Cu_2L .
- Evaluar si la presencia del puente imidazolato en la estructura tiene algún efecto en la actividad catalítica del sistema en la reacción modelo de oxidación del 3,5-ditertbutilcatecol, tanto en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ como en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$.

Capítulo 4. Resultados

De acuerdo con los objetivos planteados, este proyecto puede dividirse en 2 grandes apartados:

- a. Especiación y caracterización de los sistemas Cu_2L en disolución en los 3 medios: H_2O , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ ².
- b. Evaluación cinética de la actividad catecolasa de los sistemas Cu_2L en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$.

Los resultados obtenidos para cada uno de estos puntos se detallarán y discutirán a continuación.

4.1 Especiación y caracterización de las especies presentes en disolución

Para este apartado se realizaron varios estudios en disolución. Se inició con los estudios potenciométricos, a partir de los cuales se obtuvieron las constantes de equilibrio para los sistemas Cu_2L y con ellas se trazaron los diagramas de distribución de especies. Posteriormente, esta especiación se corroboró con los estudios espectrofotométricos y de RPE mediante los que se detectó la presencia de la especie puenteada en disolución. La magnitud de la interacción magnética entre los dos centros metálicos se determinó mediante estudios de su comportamiento en estado sólido. Finalmente se llevaron a cabo los estudios electroquímicos con los que se logró caracterizar el comportamiento electroquímico de la especie puenteada respecto al de la especie no puenteada.

² Las mezclas $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ que se mencionan a lo largo del texto, se refirieren específicamente a las mezclas 1:1 en volumen.

4.1.1 Estudios potenciométricos

La potenciometría es una técnica electroanalítica mediante la cual se detecta la concentración de una especie en disolución usando un par de electrodos, uno de trabajo y otro de referencia [31]. En este trabajo se utilizará este término para hacer referencia a un caso muy particular de esta técnica: determinaciones del ión H^+ mediante un electrodo de vidrio o, en otras palabras, mediciones de pH. Éstas se realizaron con un electrodo combinado, que consta de un electrodo de vidrio selectivo a iones H^+ y un electrodo de referencia de $Ag^0/AgCl$ [32].

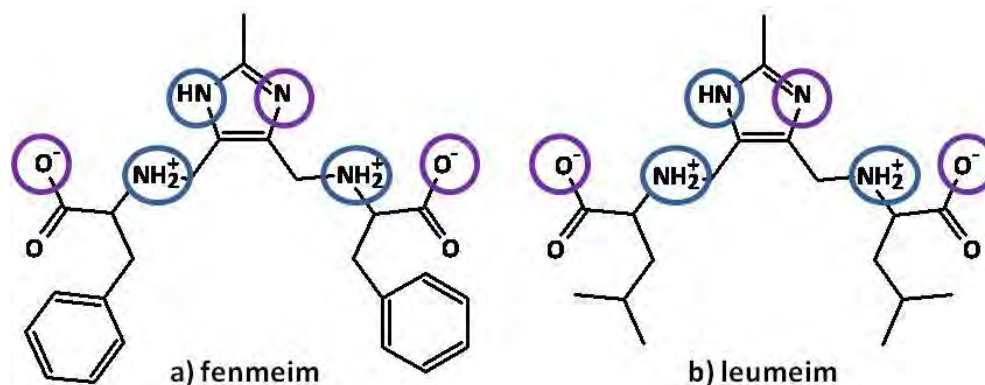


Figura 10. Sitios con posible actividad ácido-base de los ligantes fenmeim y leumeim. En azul se muestran los sitios protonados en su forma neutra y en morado los sitios protonables.

Los ligantes en estudio poseen varios sitios con posible actividad ácido-base, como se observa en la figura 10. Si todos estos sitios se protonan y este sistema se va titulando con adiciones muy pequeñas de NaOH mientras se mide el pH de la mezcla de reacción en cada punto, entonces es posible determinar el pK_a de cada sitio del ligante. Esto se consigue analizando la curva de titulación con programas especializados como Hyperquad 2003 [33].

Si al ligante completamente protonado se le adiciona $Cu(II)$ y se titula el nuevo sistema con las mismas precauciones, la curva de titulación será distinta. Se podrán observar desprotonaciones posteriores debidas a la hidrólisis únicamente en presencia del metal. Además, conociendo los valores de pK_a del ligante, se podrán determinar las constantes de formación de los complejos $Cu_xL_yH_z$ presentes en disolución.

Esto es precisamente lo que se hizo para obtener la especiación de los sistemas Cu_2L en cada uno de los tres medios. Por tratarse de medios acuosos, en los tres se puede trabajar empleando determinaciones de pH, pero la calibración del electrodo en las mezclas de disolvente requiere de un tratamiento especial.

4.1.1.1 Calibración en las mezclas de disolventes

La calibración del electrodo de vidrio en agua se suele hacer utilizando 3 amortiguadores que cubren aproximadamente toda la escala de pH (generalmente pH= 4.0, 7.0 y 10.0). Para las mezclas de disolventes metanol-agua y acetonitrilo-agua no hay amortiguadores informados en la literatura que abarquen toda la escala de pH, por lo cual se realizó la calibración con uno solo.

Existen varios trabajos referidos a la calibración de electrodos en mezclas de disolventes orgánicos con agua [34 - 38]. En el caso de mezclas con MeOH, se han informado amortiguadores de succinatos y de oxalatos [37]. Se eligió trabajar con succinatos debido a que estos fijan un pH más cercano al centro de la escala (los oxalatos fijan un pH cercano a 2 mientras que los succinatos uno cercano a 5). Para mezclas con MeCN, sólo se encontró publicado un amortiguador con biftalato de potasio [38] y se trabajó con él.

En las referencias se informa el pH que fijará una concentración fija del soluto amortiguador³ en distintas mezclas con porcentaje variable de disolvente orgánico. En ellas, no hay valores reportados del valor de pH que se obtendría en las concentraciones de MeOH y MeCN utilizadas en este trabajo (MeOH:H₂O 1:1 v:v = 44.44% p/p de MeOH y MeCN:H₂O 1:1 v:v = 43.88% p/p de MeCN).

Para saber qué pH fijan en nuestros medios los solutos reportados, se graficó el porcentaje de disolvente orgánico en la mezcla contra el pH que fija el amortiguador, se obtuvo una ecuación que define al conjunto de datos e interpolando se obtuvo el valor de pH para nuestras condiciones. Se obtuvieron valores de pH=4.94 para MeOH:H₂O y pH=5.37 para MeCN:H₂O.

Los amortiguadores se prepararon empleando las concentraciones especificadas y se fijaron los valores de pH mencionados en el párrafo anterior. Para completar la calibración en cada medio se titularon por separado HClO₄ y HNO₃ en la mezcla de disolventes con NaOH acuosa. Para cada punto de la titulación se midieron los valores de pH y potencial (E/mV) y se graficaron. Con los valores obtenidos se ajustó la siguiente ecuación:

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

³ ácido succínico 0.01 M + oxalato mono-ácido de litio 0.01 M para MeOH-H₂O y biftalato de potasio 0.05 M para MeCN-H₂O

Al fijar el valor de la pendiente de esta recta a la pendiente Nernstiana (-59.16), se obtuvo un valor de E_f para cada calibración, el cual se utilizó posteriormente para corregir los datos de las titulaciones de los sistemas de interés. Este paso de la calibración permite hacer un mejor ajuste a los valores de pH más alejados del pH de calibración y así corregir de forma ponderada los datos obtenidos, ajustándolos a la respuesta Nernstiana ideal [39].

4.1.1.2 Curvas de titulación

Como parte de la calibración en MeOH:H₂O y MeCN:H₂O, se tituló un ácido: HClO₄ ó HNO₃, con una base fuerte: NaOH. Tanto el ácido perclórico como el ácido nítrico son ácidos fuertes en agua y por lo tanto no es posible asignarles un valor de pK_a. Sin embargo, en las mezclas de disolventes no sólo es posible sino necesario para el análisis posterior, determinar un valor de pK_a para cada ácido.

Así mismo, es necesario determinar el valor de autoprotólisis del medio para las dos mezclas de disolventes. Ambos valores se obtienen del análisis de las curvas de titulación antes mencionadas con el programa Hyperquad 2003. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 2 y se utilizaron como datos para la posterior determinación de constantes de equilibrio de los sistemas en estudio.

Tabla 2. Valores de pK_a de HClO₄ y de HNO₃ y constantes de autoprotólisis del medio obtenidos en MeOH:H₂O y MeCN:H₂O.

	MeOH:H ₂ O	MeCN:H ₂ O
pK _i	-14.28	-14.74
pK _a HNO ₃	2.6	2.1
pK _a HClO ₄	1.8	1.0

Una vez solucionados todos los pormenores que surgen al trabajar con mezclas de disolventes, se pudo hacer la determinación de las constantes mediante datos potenciométricos tal como se planteó al inicio de la sección. Para llevar a cabo la especiación de los sistemas Cu₂L, se titularon con NaOH dos sistemas distintos para cada uno de los ligantes y en cada uno de los tres medios de estudio:

- a. $L + 4 H^+$
- b. $L + 2 Cu(II) + 4 H^+$

Debido a que los datos de estas titulaciones se utilizaron para determinar constantes de equilibrio, resultó muy importante hacerlas a temperatura constante (25°C) y fijar la fuerza iónica ($I=0.1$ M), pues las constantes de equilibrio son muy sensibles a estos parámetros.

Se han observado diferencias en la solubilidad y el comportamiento de los complejos al fijar la fuerza iónica con sales de distintos aniones. Los aniones más utilizados son los percloratos y los nitratos. Para estudiar las diferencias que podrían presentarse en la especiación al utilizar uno u otro ión en disolución, la determinación de constantes del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ se realizó comparando ambos contraiones.

En la tabla 3 se presenta un resumen de las titulaciones realizadas en este proyecto y en la figura 11 las curvas obtenidas para cada una de ellas.

Tabla 3. Titulaciones potenciométricas realizadas para este estudio.

Ligante	Sistema	Medio	Contraión
Fenmeim	$\text{Fenmeim} + 4\text{H}^+$	H_2O	NO_3^-
			ClO_4^-
		$\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$	NO_3^-
			ClO_4^-
	$\text{Fenmeim} + 2\text{Cu(II)} + 4\text{H}^+$	H_2O	NO_3^-
			ClO_4^-
		$\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$	NO_3^-
			ClO_4^-
Leumeim	$\text{Leumeim} + 4\text{H}^+$	H_2O	ClO_4^-
		$\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$	ClO_4^-
		$\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$	ClO_4^-
	$\text{Leumeim} + 2\text{Cu(II)} + 4\text{H}^+$	H_2O	ClO_4^-
		$\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$	ClO_4^-
		$\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$	ClO_4^-

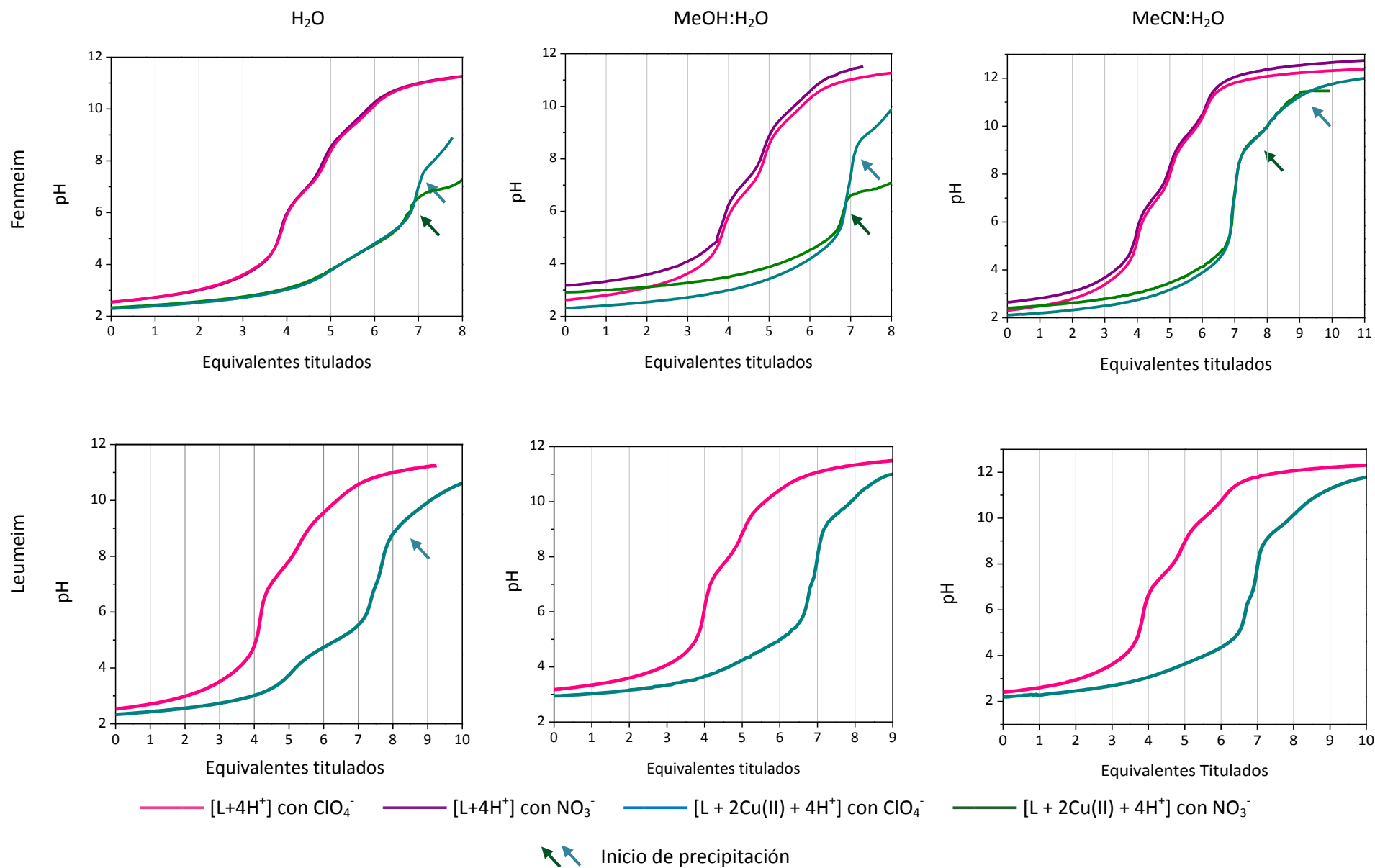


Figura 11. Curvas de titulación de los sistemas $[L + 4H^+]$ y $[L + 2Cu(II) + 4H^+]$ en H_2O , $MeOH:H_2O$ y $MeCN:H_2O$ usando NO_3^- y ClO_4^- para fijar la fuerza iónica según se indica, donde L = ligante = fenmeim, leumeim.

De la observación de las curvas de titulación y la comparación entre ellas, se puede destacar lo siguiente:

- Primero es importante notar que, para todos los experimentos, la forma de las curvas de titulación del ligante y del complejo es muy distinta. Al adicionar cobre al sistema, es posible titular dos equivalentes de ácido adicionales: la presencia del cobre favorece la salida de protones que no salen en ausencia del metal.
- Para cada ligante se puede observar que la forma de sus curvas de titulación en todos los medios es muy similar. Sin embargo la forma de la curvas de titulación de los sistemas Cu_2L es distinta, es notable el cambio en el pH de precipitación en cada medio.
- Resulta interesante también analizar el estudio realizado con el ligante fenmeim en el que se cambió el contra-ión utilizado. Tanto en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ como en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ la forma de las curvas con uno u otro contra-ión es distinta, principalmente en sus partes iniciales y finales. En ambas partes, la curva obtenida con nitratos aparece a mayores valores de pH (pH menos ácido) que la de percloratos.

El efecto en la parte inicial de la curva se puede explicar en términos de la fuerza del ácido utilizado. Como se puede ver en la tabla 2, en estos medios el ácido perclórico es un ácido más fuerte que el nítrico (menor valor de pK_a) por lo que el pH inicial es menor en los sistemas con percloratos, este efecto sólo puede verse en las mezclas de disolventes pues el pK_w del agua no permite diferenciar entre la fuerza de estos dos ácidos.

El efecto en la parte final de la titulación se explica mediante el llamado "error salino" [40]. El electrodo que se utiliza debe ser selectivo al ión H^+ , sin embargo cuando las concentraciones de otros cationes son muy superiores, el electrodo puede detectarlos también sin distinguirlos de los protones. Al final de las titulaciones la concentración Na^+ proveniente del titulante es muy alta, los nitratos forman complejos más estables con Na^+ que los que forman los percloratos (los nitratos son más coordinantes) por lo que en medios con percloratos hay más Na^+ libre que el electrodo detecta dando un valor de pH menor.

- Finalmente, se puede ver en las curvas que los sistemas $\text{L} + 4\text{H}^+$ se titularon con 6 equivalentes de NaOH . Esto implica que se titularon los 4 equivalentes de ácido adicionados más 2 equivalentes ácidos adicionales que poseen los ligantes en su forma neutra (ver figura 10).

Es importante destacar que los ligantes neutros, en principio, tienen otro sitio que podría desprotonarse: el nitrógeno del anillo imidazólico. Esta desprotonación formaría el imidazolato, sin embargo este sitio no tiene un pK_a lo suficientemente pequeño para ser titulado por NaOH en los medios empleados.

Cuando adicionamos Cu(II) a la disolución, se observa la titulación de más equivalentes de ácido que los titulados en el sistema del ligante sólo. Esto se debe a que el cobre actúa como catión ácido en la disolución, favoreciendo la salida de protones provenientes ya bien del imidazol o de la hidrólisis de moléculas de disolvente coordinadas al metal.

4.1.1.3 Determinación de las constantes de equilibrio

Los datos obtenidos de las titulaciones se analizaron con Hyperquad 2003 [33] para determinar los valores de pK_a de los ligantes y las constantes de formación e hidrólisis de los sistemas Cu_2L .

Hyperquad 2003 es un conjunto de programas apropiados para el cálculo de constantes de equilibrio. Su algoritmo utiliza un enfoque de mínimos cuadrados y tiene como objetivo minimizar la suma de los cuadrados de los residuales que existen entre los valores reales y los calculados a partir del modelo propuesto. La función exacta que se minimiza y el algoritmo detallado se pueden encontrar en la guía de ayuda del programa.

La información que se introduce al programa es la siguiente:

- a. Los datos de las titulaciones, así como las condiciones de la titulación (concentraciones, temperatura, fuerza iónica).
- b. Un modelo. Este modelo consiste en proponer la composición y carga de las especies en disolución así como una constante asociada a su formación.
- c. Los requerimientos estadísticos que exigiremos al modelo para que sea significativo.

Esta es la información que el programa tomará de partida para iniciar el refinamiento. Modificará la constante del modelo hasta minimizar la diferencia entre los puntos obtenidos experimentalmente y los calculados, por medio de un algoritmo iterativo.

Los resultados que se obtienen de este proceso tienen asociados parámetros estadísticos que le permiten al usuario, y al programa, determinar si el modelo resultante es estadísticamente significativo. Estos parámetros son χ^2 y σ , y cada uno tiene un significado distinto.

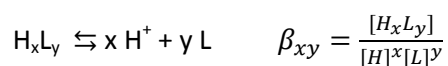
- χ^2 se utiliza como una prueba de aleatoriedad. Se basa en la hipótesis de que los residuales presentan una distribución normal. Cuando esto sucede su valor debe ser menor o igual a 12.
- σ habla de la bondad de ajuste del modelo pues permite conocer si el error obtenido en el refinamiento se encuentra dentro del error experimental. Su valor debe ser cercano a 1 para que esto suceda.

En la tabla 4 se presenta, para cada sistema, el modelo que resultó más adecuado junto con sus parámetros estadísticos. Se puede ver que los parámetros, en general, cumplen con los requisitos para considerar adecuado el modelo resultante.

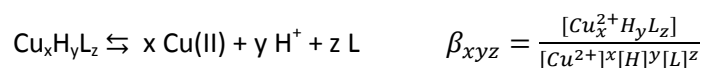
Otro parámetro que no está considerado en el programa pero que nos habla de la confiabilidad de los resultados es la relación entre el número de puntos usados y las constantes obtenidas. En este trabajo se utilizaron en promedio 150 puntos experimentales para cada análisis y, como se verá más adelante, se obtuvieron aproximadamente 4 constantes. Aproximadamente se usaron 35 puntos por cada constante, lo cual es una buena relación y da confiabilidad a los resultados.

Las constantes de acidez, de formación de complejos y de hidrólisis se presentan como $\log\beta$ donde β es la constante acumulativa. Esta constante está asociada a un equilibrio en disolución y se define de la siguiente manera:

Para las constantes de acidez de los ligantes:



Para las constantes de formación e hidrólisis de los complejos Cu_2L :



En la tabla 4 se presentan las constantes de equilibrio acumulativas expresadas en estos términos y también la especie asociada a cada constante. Resulta importante resaltar que los ligantes tienen tres sitios protonados en su forma neutra y tres más protonados luego de la adición de ácido (ver figura 10), es decir seis sitios protonables en total. De ahí que la especie completamente protonada se nombró H_6L^{3+} .

Tabla 4. Constantes de equilibrio obtenidas del refinamiento de los datos de las titulaciones con el programa Hyperquad 2003.

			H ₂ O		MeOH:H ₂ O		MeCN:H ₂ O	
			NO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₄ ^{-*}	NO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻
Fenmeim	Logβ ₂₁	H ₂ L ⁻	9.545±0.016	9.370±0.033	9.897±0.021	9.640±0.011	9.525±0.024	9.369±0.017
	Logβ ₃₁	H ₃ L	16.624±0.024	16.412±0.050	17.210±0.031	16.547±0.017	16.503±0.036	16.098±0.024
	Logβ ₄₁	H ₄ L ⁺	20.562±0.027	20.502±0.058	21.744±0.037	20.592±0.020	20.615±0.041	19.653±0.029
	Logβ ₆₁	H ₆ L ³⁺			28.848±0.037	25.973±0.023	25.957±0.045	
	χ ²		13.81	8.95	9.32	9.04	8.66	10.46
	σ		1.056	1.5537	0.8657	1.4733	1.3677	1.0246
	Logβ ₂₂₁	Cu ₂ H ₂ L ³⁺	22.693±0.064	24.355±0.051	23.079±0.011	24.026±0.057	22.682±0.031	
	Logβ ₂₁₁	Cu ₂ HL ²⁺	18.387±0.058	20.050±0.050	19.006±0.027	20.503±0.051	19.037±0.037	18.063±0.041
	Logβ ₂₀₁	Cu ₂ L ⁺	13.169±0.063	14.837±0.050	13.953±0.044	15.937±0.055	14.531±0.030	13.800±0.036
	Logβ ₂₋₁₁	Cu ₂ (OH)L				6.860±0.056	5.194±0.032	4.557±0.037
	Logβ ₂₋₂₁	Cu ₂ (OH) ₂ L ⁻						-6.203±0.038
	χ ²		11.47	11.21	15.17	3.95	11.59	8.87
	σ		1.8017	0.3845	1.0039	0.8634	0.7196	1.1088
	Leumeim	Logβ ₂₁	H ₂ L ⁻		9.092±0.008		9.998±0.011	
Logβ ₃₁		H ₃ L		16.367±0.019		17.709±0.019		17.498±0.020
Logβ ₄₁		H ₄ L ⁺		20.401±0.022		22.183±0.022		21.233±0.024
Logβ ₆₁		H ₆ L ³⁺		25.305±0.032		29.263±0.021		
χ ²			6.54		10.21		5.26	
σ			0.9971		0.5391		0.8393	
Logβ ₂₃₁		Cu ₂ H ₃ L ⁴⁺				22.542±0.016		
Logβ ₂₂₁		Cu ₂ H ₂ L ³⁺		24.650±0.024		21.689±0.035		22.751±0.480
Logβ ₂₁₁		Cu ₂ HL ²⁺		20.353±0.024		17.623±0.016		17.472±0.063
Logβ ₂₀₁		Cu ₂ L ⁺		15.240±0.027		12.286±0.020		12.581±0.053
Logβ ₂₋₁₁		Cu ₂ (OH)L		8.806±0.031		2.855±0.027		2.822±0.0609
Logβ ₂₋₂₁		Cu ₂ (OH) ₂ L ⁻		28.189±0.051				
χ ²			10.60		8.30		12.90	
σ			0.7298		0.8575		2.071	

Como se puede notar, en todos los casos para los ligantes se obtuvieron únicamente 4 constantes de acidez, aún cuando sabemos que se titularon 5 equivalentes ácidos del ligante (más uno adicional libre). Esto se debe a que la salida de los dos protones de ácido carboxílico se da simultáneamente, lo cual puede verse también en las curvas de titulación (figura 11). Al inicio se titulan 3 equivalentes de ácido simultáneamente que corresponden al equivalente de ácido extra libre que adicionamos más los 2 protones de ácido carboxílico del ligante que son muy ácidos (pK_a alrededor de 1.5).

Para los complejos, el número de constantes de hidrólisis que se obtienen es distinto en cada medio. Esto es evidente desde que se observan las curvas de titulación: en cada medio el pH de precipitación es distinto y la forma de la curva también.

A partir de este conjunto de constantes de acidez y de formación de complejos, se trazaron los respectivos diagramas de distribución de especies con ayuda del programa MEDUSA [41], los cuales se presentan en la Figura 12 para los sistemas del ligante fenmeim y en la Figura 13 para los del ligante leumeim. Estos diagramas son básicamente una traducción gráfica de las constantes y nos permiten realizar un análisis más sencillo y directo que si se quisiera analizar los valores numéricos directamente.

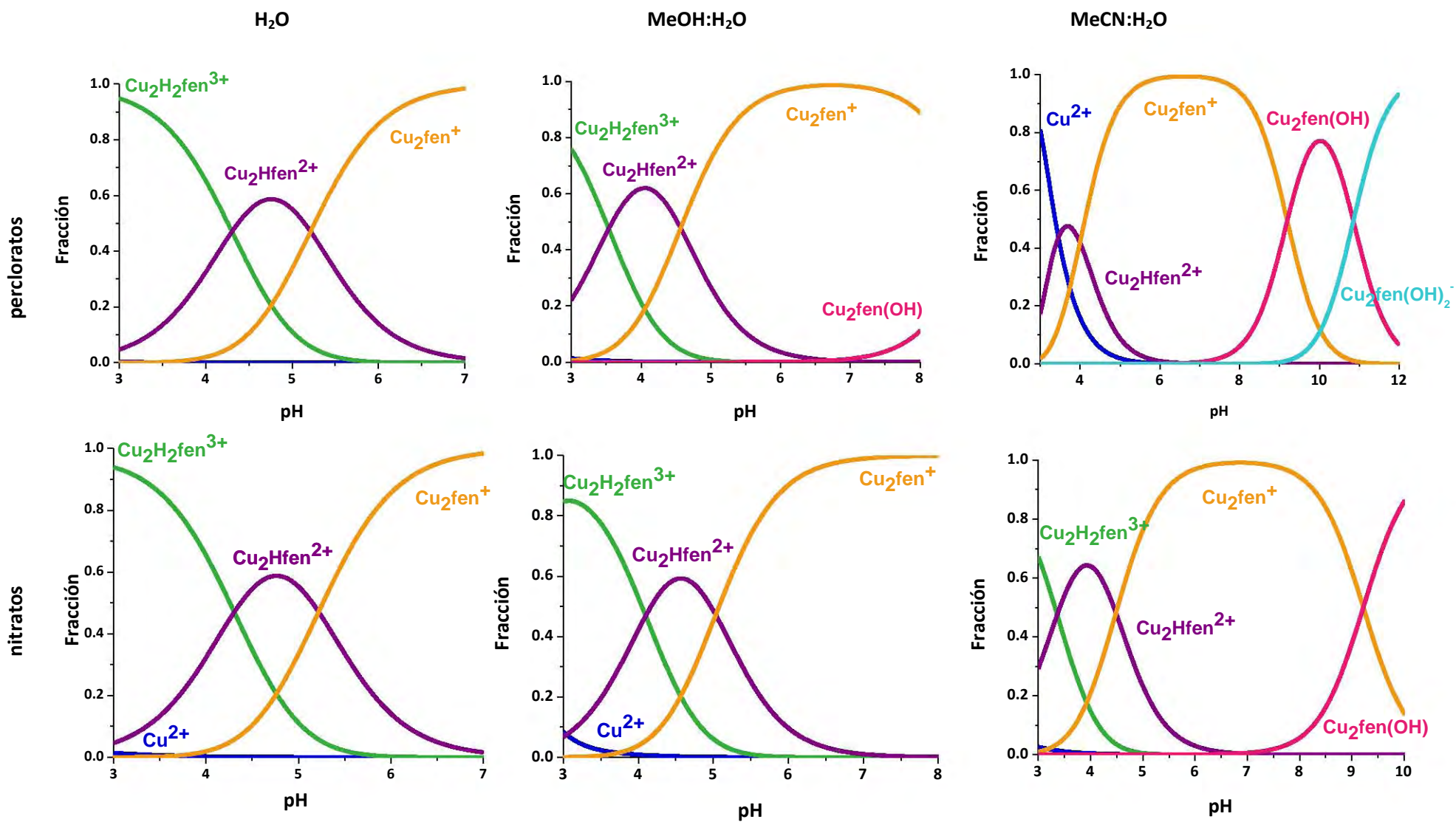


Figura 12. Diagramas de distribución de especies para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en H_2O , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ usando NO_3^- y ClO_4^- como contraiones.

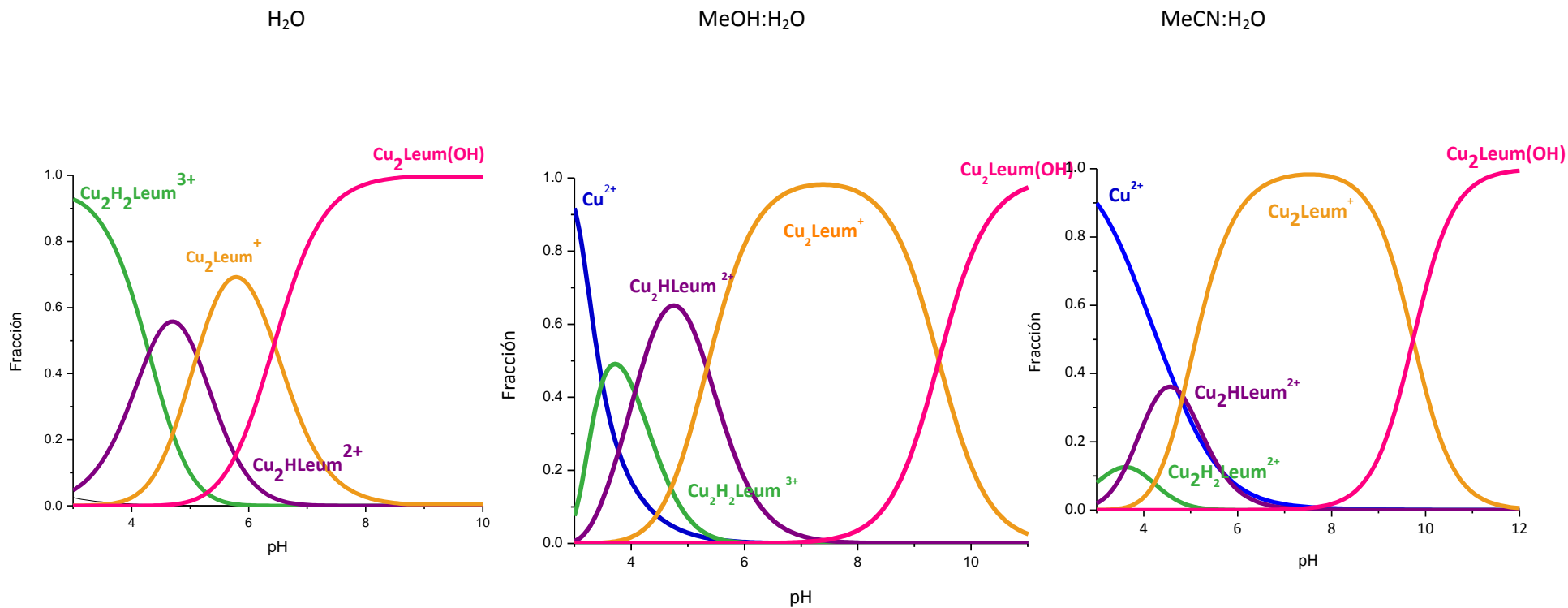


Figura 13. Diagramas de distribución de especies para el sistema Cu_2leum en H_2O , $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ usando ClO_4^- como contraión.

Al comparar los diagramas para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenemim}$ con distintos contraiones, se puede apreciar que estos no difieren significativamente, las mayores diferencias están dadas por el pH de precipitación (pH en el que se corta la gráfica de distribución). En todos los casos, el sistema con nitratos precipita antes que el de percloratos puesto que los nitratos son más coordinantes y pueden formar antes una especie neutra estable.

En general, en los diagramas se observa que en disolución coexisten 4 especies principalmente:

- a. La primera, $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}^{3+}$, predomina a $\text{pH} \sim 3$ tanto en agua como en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ esta especie sólo se observa usando nitratos como contraiones). En ella el ligante está protonado en dos sitios: uno de ellos es el nitrógeno del imidazol (este es el protón más difícil de sacar) y el otro no lo sabemos con certeza.
- b. La segunda, $\text{Cu}_2\text{HL}^{2+}$, predomina a $\text{pH} \sim 4$ en los tres medios (a un pH mayor en agua). Esta especie tiene al ligante aún con el protón del imidazol. Se sugiere que la estructura de esta especie es como la obtenida para $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ donde un cobre está unido al ligante en tres sitios y el otro sólo en dos. (Ver figura 14 a).
- c. La tercera, Cu_2L^+ , predomina a $\text{pH} \sim 7$ en los tres medios. Se sugiere que esta es precisamente la especie que presenta un puente imidazolato en su estructura por lo que la carga del complejo es mono-positiva. El pH en el que predomina coincide con las condiciones en las que se obtuvo el complejo $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ descrito anteriormente, en el que sí se observa claramente el puente entre los átomos metálicos. (Ver figura 14 b).
- d. La cuarta especie, $\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})$, predomina a $\text{pH} \sim 10$ en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ y se observa en disolución también en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$. Se trata de la especie anterior, con puente imidazolato, y con una molécula de disolvente hidrolizada para dar una especie neutra. (Ver figura 14 c).

La presencia o ausencia de esta especie nos habla mucho de la diferencia entre los medios. Mientras que en agua no se alcanza a determinar una constante de formación para esta especie porque precipita muy pronto, en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ se alcanza a determinar incluso una segunda constante de hidrólisis.

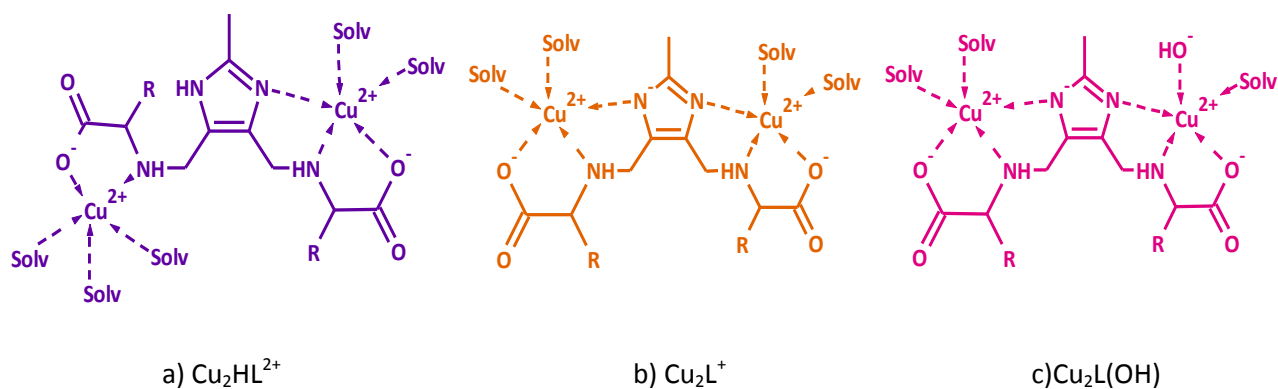


Figura 14. Estructuras propuestas para los complejos de $\text{Cu}(\text{II})$ con fenmeim y leumeim a distintos valores de pH.

El modelo de especies en disolución propuesto para los sistemas $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y $\text{Cu}_2\text{leumeim}$, incluye a la especie con puente imidazolato que comienza a formarse desde pH cercano a 4 y alcanza su máximo predominio en un pH alrededor de 7. Para corroborar este modelo, resultó necesario encontrar otras evidencias que lo apoyaran y que pudieran indicar la presencia del puente imidazolato en disolución.

4.1.2 Estudios espectrofotométricos

Para corroborar el modelo propuesto, las titulaciones potenciométricas se siguieron también espectrofotométricamente. En cada punto de la titulación, se midió el valor de pH y se obtuvo un espectro de absorción UV-vis con la intención de buscar algún cambio en el espectro de absorción asociado a la formación de nuevas especies en disolución y de correlacionarlo con los diagramas de distribución construidos previamente.

En la figura 16 se muestran los espectros de absorción obtenidos para cada sistema Cu_2L en cada medio. En ella se puede apreciar que el comportamiento general es el mismo para todos. Para facilitar el análisis y la discusión, en la figura 15 se presenta con detalle la serie de espectros de absorción obtenidos para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en agua.

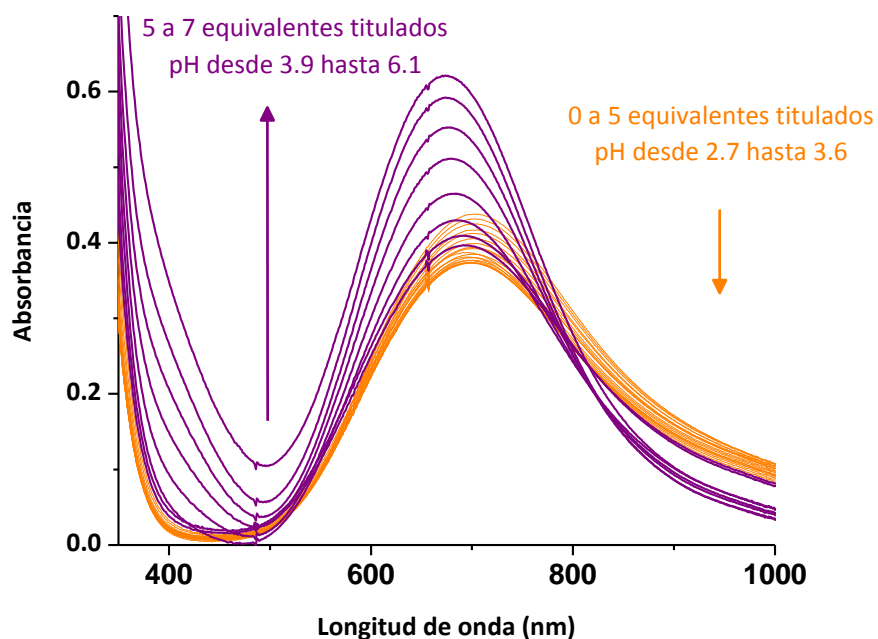


Figura 15. Espectros UV-vis obtenidos de la titulación del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ con NaOH en H_2O

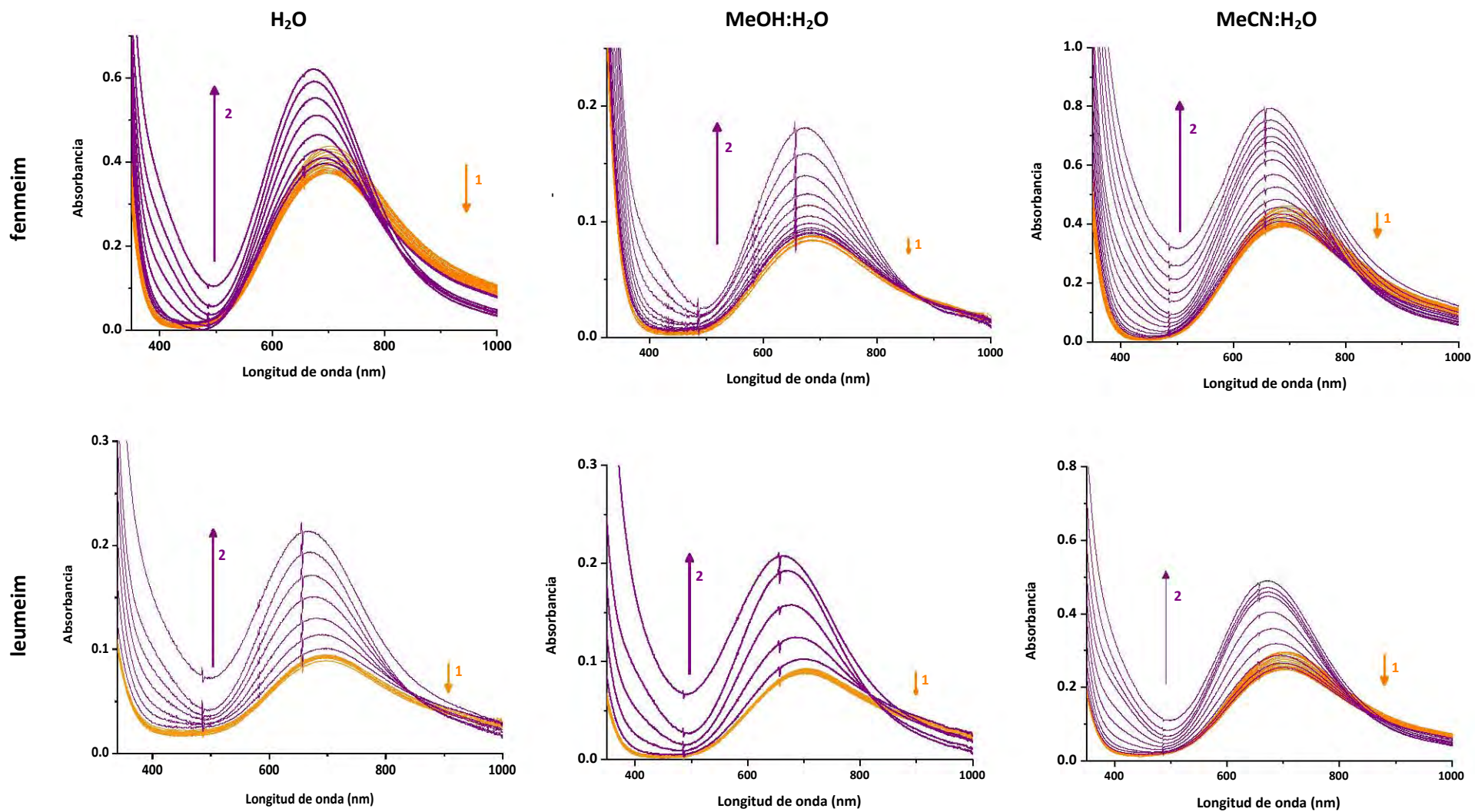


Figura 16. Espectros UV-vis obtenidos de la titulación de los sistemas Cu_2L con $NaOH$ en H_2O , $MeOH:H_2O$ y $MeCN:H_2O$.

Al inicio de la titulación se observa una señal en 685 nm que va disminuyendo su intensidad al ir agregando NaOH sin que se observe un desplazamiento del máximo. Esta disminución de intensidad se puede atribuir simplemente a un efecto de dilución del cromóforo en esas condiciones. En todos los sistemas, el pH inicial es cercano a 2.5 y este comportamiento se mantiene hasta un pH cercano a 4.0.

Cuando el pH es ligeramente superior a 4.0 (5 equivalentes titulados) el comportamiento del sistema cambia: la señal que aparecía a 685 nm aumenta de intensidad, con un desplazamiento hipsocrómico de su máximo de absorción a 700 nm y aparece una nueva señal al rededor de 400nm.

Un cambio espectral tan radical, indica que en disolución hay una nueva especie con características muy distintas a las de la anterior. Lo interesante es que este cambio de comportamiento se da exactamente al pH al que empieza a aparecer la especie puenteada propuesta en disolución, por lo que podemos atribuir el desplazamiento del máximo de la señal de 700 nm y la aparición de la señal de 400 nm a la especie puenteada propuesta.

Los espectros presentados en color naranja en las figuras 15 y 16, pueden asignarse a la especie sin puente y los marcados de color morado a la especie puenteada. El espectro visible de la especie sin puente es similar al observado en un cobre con una geometría de pirámide cuadrada. La señal no es simétrica sino que presenta un sesgo hacia longitudes de onda altas. El espectro de la especie con puente, en cambio, es más simétrico y su máximo se presenta a menor longitud de onda.

Este comportamiento es similar a otros, previamente informados, en los que se observa el espectro visible al ir variando el pH [42,43]. En ellos se observa el mismo comportamiento: a valores bajos de pH, la especie no está puenteada y el espectro es asimétrico (sesgado hacia mayores longitudes de onda), de menor intensidad y con un máximo en longitudes de onda más altas. Al aumentar el pH, se forma la especie puenteada, el máximo se desplaza hacia longitudes menores y la intensidad aumenta.

Las titulaciones seguidas espectrofotométricamente, coinciden con el diagrama de especiación propuesto a partir del análisis potenciométrico y son una evidencia de que el modelo es correcto. Sin embargo, son necesarios otros estudios para proveer de más evidencia y continuar con la caracterización de la especie puenteada.

4.1.3 Estudios por RPE

Los estudios magnéticos pueden ayudar a detectar la especie puenteada. El puente imidazolato es una estructura que permite el acoplamiento antiferromagnético entre los dos átomos de Cu(II). En el caso de existir esta especie en disolución, la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) daría cuenta de ello pues los electrones de cada cobre ya no se encontrarían desapareados (estarían acoplados) y no darían señal de RPE.

Para estudiar los sistemas Cu_2L con esta técnica, se prepararon varias disoluciones de 1 equivalente de ligante por 2 de Cu(II) con valores de pH distintos en el intervalo de 2.5 hasta 6.5 (incluso se llegó a 9.4 en un sistema) usando como disolvente MeOH:H₂O para $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ y también H₂O únicamente para $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$.

Se obtuvo el espectro de RPE de cada disolución a temperatura ambiente y se analizó el comportamiento de los espectros de RPE al variar el valor de pH del medio. En la figura 18 se presentan los espectros obtenidos.

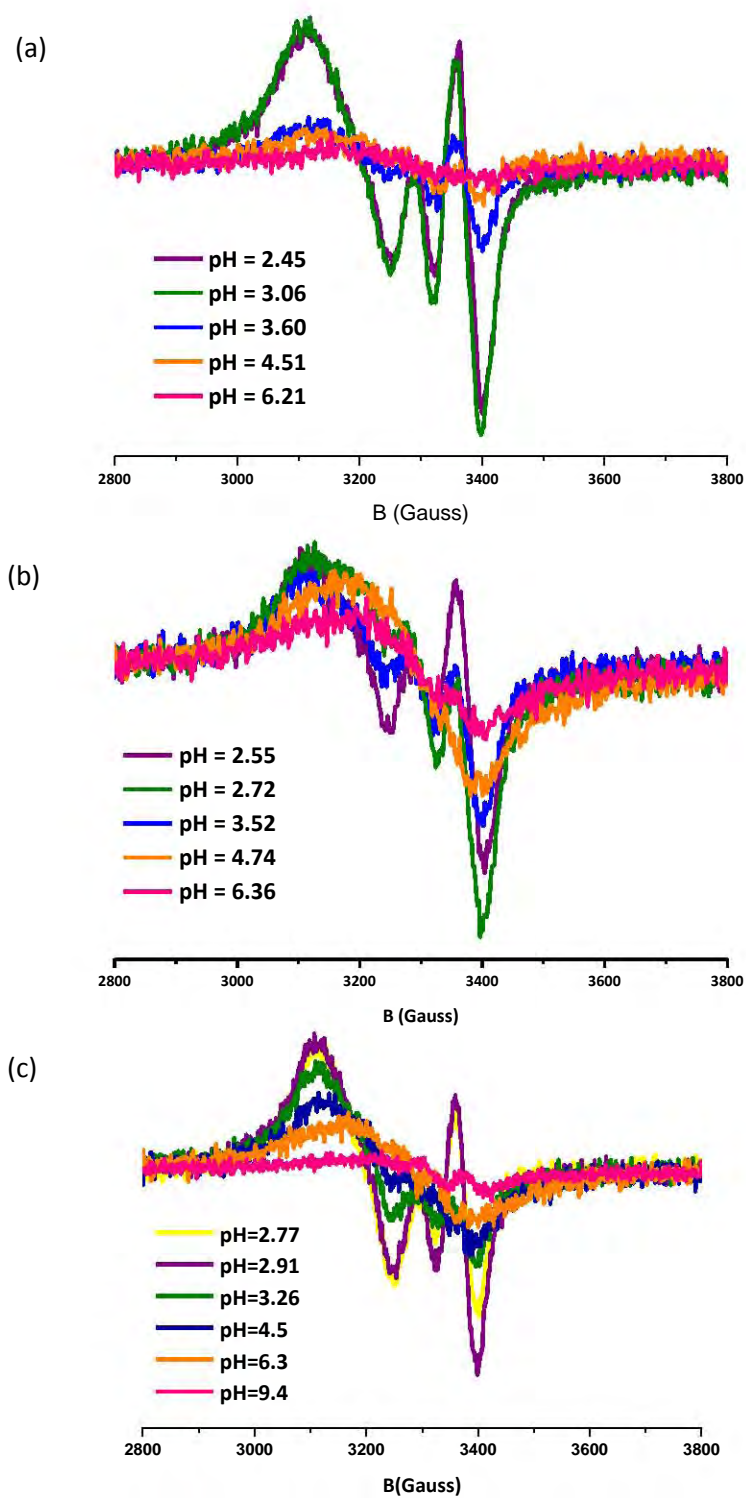


Figura 18. Serie de espectros de EPR obtenidos para el sistema $Cu_2fenmeim$ en H_2O (a), para $Cu_2fenmeim$ en $MeOH:H_2O$ (b), y para el sistema $Cu_2leumeim$ en $MeOH:H_2O$ (c), todos a temperatura ambiente.

El comportamiento individual de cada espectro es difícil de explicar y excede las expectativas de este proyecto, sin embargo del comportamiento global sí puede obtenerse información. Es interesante observar cómo cambia el comportamiento de la señal de RPE al ir aumentando el pH.

Al aumentar el pH, la intensidad de la señal de RPE va disminuyendo, hay un cambio importante en los espectros que se da en las cercanías del pH=4 y a pH mayor que 6 la señal observada es de muy baja intensidad.

Al formarse el puente imidazolato, la intensidad de la señal debida a los electrones desapareados de ambos Cu(II) va disminuyendo pues esta estructura permite que los espines electrónicos se acoplen antiferromagnéticamente, disminuyendo el carácter paramagnético y por lo tanto desapareciendo la señal de RPE.

Esto coincide con el modelo propuesto en este trabajo: antes de pH=4 la especie en disolución tiene dos átomos de cobre independientes (figura 14a) y paramagnéticos que sumados dan la señal intensa que se observa. Al llegar a pH cercano a 4, la especie puenteada se va formando (figura 14b), lo que provoca un cambio en el espectro. Al ir aumentando el pH hay cada vez más especie puenteada en disolución lo que hace que disminuya la intensidad de la señal de RPE hasta que al rebasar el pH de 6 la señal está casi silenciada pues todas las moléculas en disolución contienen al puente imidazolato (ver diagrama de distribución en las figuras 12 y 13). Este comportamiento corrobora la especiación y la asignación de señales de UV-Vis realizadas en este trabajo.

El comportamiento registrado para el sistema Cu₂fenmeim es similar al observado por otros grupos de investigación [24, 25, 42, 45]. En sus trabajos, observan el comportamiento del espectro de resonancia paramagnética al variar el pH y obtienen que la señal de RPE disminuye su intensidad y cambia su forma al formarse el puente imidazolato en disolución. En ningún caso se obtiene un silenciamiento total de la señal como se obtendría en caso de que el acoplamiento antiferromagnético fuera completo.

La intensidad del acoplamiento antiferromagnético aquí observado, puede determinarse mediante estudios magnéticos en estado sólido, los cuales se realizaron también para el sistema Cu₂fenmeim y se presentan a continuación.

4.1.4 Estudios magnéticos en estado sólido.

Para conocer la magnitud de la interacción entre los centros metálicos conectados por el puente imidazolato, se realizaron los estudios magnéticos del sólido cristalino $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ [27], cuya estructura se muestra en la figura 19.

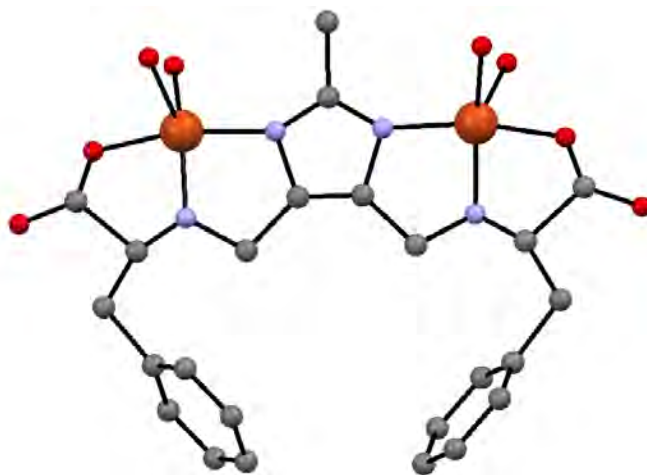


Figura 19. Estructura cristalina del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ donde se observa la presencia de un puente imidazolato entre los dos átomos de cobre.

Los estudios magnéticos consisten en determinar los valores de susceptibilidad magnética del sistema al variar la temperatura aplicando a la muestra un campo magnético. Para este trabajo, la temperatura se varió de de 2 a 30 K con un campo aplicado de 0.05 T y de 30 a 300 K con un campo de 1.0 T. La curva obtenida de susceptibilidad molar (χ_M) en función de la temperatura se presenta en la figura 20.

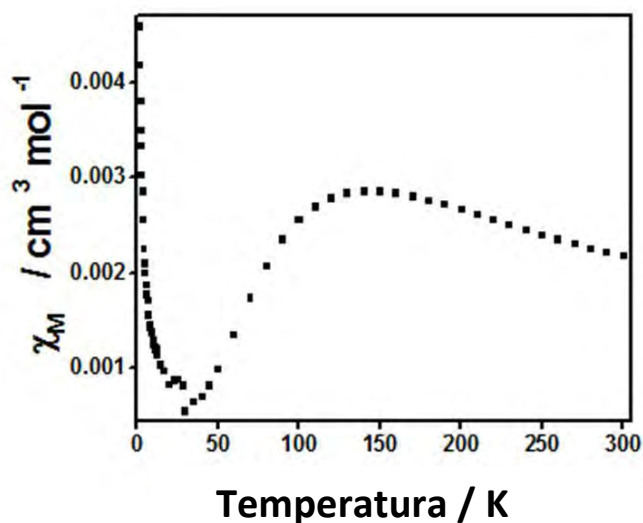


Figura 20. Curva de susceptibilidad molar (χ_M) en función de la temperatura para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ de 2 a 300 K.

El comportamiento magnético de una molécula se origina por el movimiento de los electrones, el cual hace que las sustancias interactúen con un campo magnético externo. Cuando una muestra es diamagnética, todos sus electrones están apareados e inducen un campo magnético que se opone al campo externo. En cambio cuando la muestra tiene electrones desapareados (paramagnética) éstos se orientan a favor del campo, aportando su momento magnético.

La susceptibilidad magnética es una medida del cambio en la magnitud de un campo magnético externo debido a la presencia de una muestra. Cuando ésta es diamagnética, la susceptibilidad tiene valores negativos y cuando es paramagnética presenta valores positivos. Adicionalmente, por tratarse de una propiedad debida al movimiento de los electrones (que origina un momento angular orbital y un momento angular de espín), la susceptibilidad es dependiente de la temperatura.

El comportamiento de la susceptibilidad magnética respecto a la temperatura que se observa en la figura 19 es el típico de una sustancia con intercambio antiferromagnético entre dos iones de Cu(II) [45] y se describe a continuación:

- a. A temperaturas altas, los electrones se mueven libre e independientemente, dando valores altos y positivos de susceptibilidad.
- b. Al ir disminuyendo la temperatura, los electrones se alinean más con el campo magnético, lo que provoca un aumento en los valores de susceptibilidad. (Comportamiento típico de una sustancia paramagnética).
- c. Al llegar a una cierta temperatura (140 K) se observa un máximo en la gráfica. Los electrones inicialmente independientes comienzan a interactuar más y se alinean antiferromagnéticamente, lo que genera una disminución en la susceptibilidad (disminuye el paramagnetismo).
- d. A temperaturas cercanas al cero absoluto, la susceptibilidad aumenta rápidamente. Esto sucede debido a la presencia de pequeñas cantidades de impurezas paramagnéticas [45].

De la observación de la figura 20, entonces, se puede deducir que se trata de una muestra con comportamiento antiferromagnético. Además se puede pensar que el valor de la constante de acoplamiento (J) será alto, pues la transición se presenta a altas temperaturas.

El comportamiento de la gráfica $\chi_M T$ vs T (Figura 21) también es típico [45] de un sistema dinuclear de cobre con acoplamiento antiferromagnético entre los átomos metálicos.

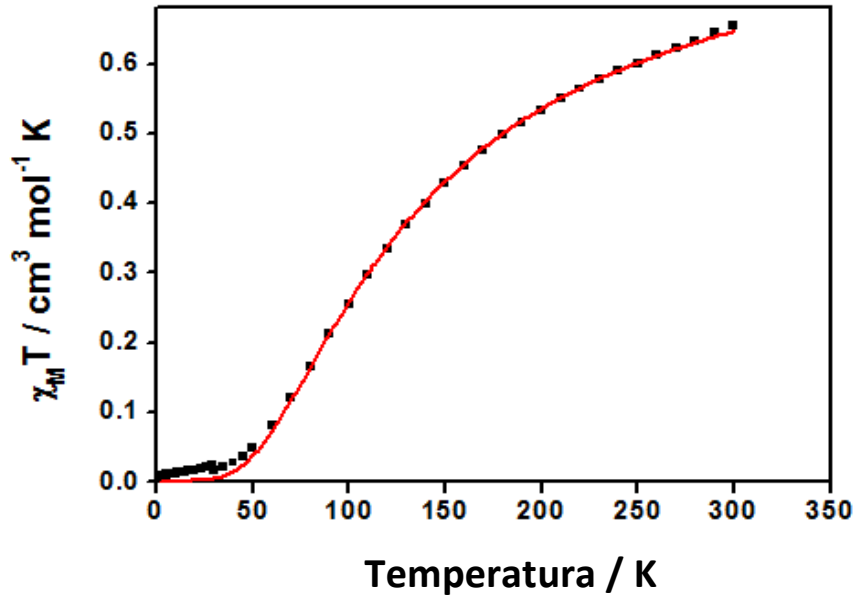


Figura 21. Curva de $\chi_M T$ vs T para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ entre 2 y 300 K. Los datos experimentales se muestran como cuadrados negros y el modelo ajustado se presenta en la línea roja.

Al hacer mediciones del comportamiento magnético de una sustancia se observa la respuesta macroscópica de un fenómeno que está sucediendo microscópicamente. Lo que se mide es la diferencia en la población de distintos estados energéticos que se ven afectados por el campo magnético.

Los dos estados que describen a sistema dinuclear de cobre, donde los dos átomos metálicos están interaccionando mediante un puente, son los estados $S=0$ y $S=1$ [45]. Estos estados están separados por una barrera energética que se denomina J . Cuando la interacción entre los dos átomos de Cu(II) es antiferromagnética, el estado basal es $S=0$ (los dos espines están apareados) y el valor de J es negativo. A altas temperaturas, el estado excitado está poblado (los dos espines se alinean al campo), pero al ir disminuyendo la temperatura, el estado basal se puebla preferencialmente por lo que $\chi_M T$ decrece de manera continua.

El Hamiltoniano que describe a estos sistemas es de la forma $H = -JS_1S_2$. A partir de él, sustituyendo sus eigenvalores y haciendo algunas suposiciones que no se detallarán, se obtiene la llamada ecuación de Bleaney y Bowers [45] que se presenta a continuación:

$$\chi = \frac{2Ng^2\beta^2}{KT \left[3 + e^{J/kT} \right]} (1 - \rho) + \frac{Ng^2\beta^2}{2kT} \rho + TIP$$

Donde:

χ = susceptibilidad magnética en $\text{cm}^3\text{mol}^{-1}$

N= número de Avogadro = $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

g= constante que depende de las características del metal

β = magnetón de Bohr = $4.67 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}\text{G}^{-1}$

J= constante de acoplamiento en cm^{-1}

k= constante de Boltzman = $0.695 \text{ cm}^{-1}\text{K}^{-1}$

T= temperatura en K

P= fracción molar de especies no acopladas (impurezas paramagnéticas)

TIP= parámetro independiente de la temperatura en $\text{cm}^3\text{mol}^{-1}$

Esta es la ecuación que se utilizó para ajustar la gráfica de $\chi_M T$ vs T, minimizando la función:

$$\varphi = \frac{\sum[(\chi_M T)^{exp} - (\chi_M T)^{calc}]^2}{\sum[(\chi_M T)^{exp}]^2}$$

A partir del ajuste, realizado con la colaboración de la Dra. Nuria Aliaga-Alcalde en la Universidad de Barcelona, se obtuvieron los valores de las 4 variables (g,J,p,TIP) que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros del ajuste magnético para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ con puente imidazolato.

	g	J	P	TIP
$\text{Cu}_2\text{fenmeim}$	2.04 ± 0.01	$-158 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	7.6×10^{-4}	$120 \times 10^{-6} \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$

El análisis de los parámetros obtenidos nos provee información acerca del sistema. El valor de g es mayor de 2.00, tal como se espera para un sistema de Cu(II) y como se observa en estudios de sistemas similares [24, 43, 44, 46]. El parámetro p se refiere a las impurezas paramagnéticas que pueda tener la muestra (que suelen ser fracciones de la muestra no acopladas) la cantidad obtenida es menor o del orden de magnitud de las reportadas para otros sistemas con puente imidazolato [24, 25, 42 – 44]. El valor de TIP se fijó para el ajuste, utilizando el valor promedio de TIP para dos Cu(II).

El valor de J establece el tipo de interacción que tienen los centros metálicos. El signo negativo nos indica que la interacción es antiferromagnética, como ya se había deducido del análisis de la curva χ_M vs T. La magnitud de este valor describe una interacción muy fuerte sobre todo al compararlo con otros sistemas que contienen al puente imidazolato [22 – 24, 42, 44, 46].

Hay varios trabajos hechos con sistemas con puente imidazolato. Estos se pueden clasificar en dos tipos:

1. En los primeros, el imidazolato no forma parte del ligante que mantiene a los iones metálicos juntos.
2. En los segundos, donde se incluye el nuestro, el imidazolato sí es parte del ligante que une a los átomos metálicos.

Analizando los valores de J para estos dos tipos de ligantes se puede observar que para los compuestos del primer tipo, el valor de la constante de acoplamiento va de -25 a -109 cm^{-1} [22, 42, 44, 46], mucho menores que la obtenida en este trabajo; mientras para los ligantes del segundo tipo los valores de J son mucho mayores y van de -96 cm^{-1} [24] a -145 cm^{-1} [23], más cercanos al valor de J obtenido en este trabajo, aunque igualmente inferiores.

Por el alto valor de J, se puede deducir que se trata de un sistema con una gran interacción antiferromagnética. Este acoplamiento está presente incluso a altas temperaturas pues el valor de $\chi_M T$ a 300 K es $0.65 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, es menor que el esperado para dos centros de Cu(II) independientes ($0.75 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ cuando $g=2.0$) el cual se calcula usando la ecuación general de Curie-Weiss para $S=1/2$ multiplicada por dos, es decir:

$$2 * \chi_M T = 2 * \frac{Ng^2\beta^2}{3kT} S(S + 1) = 0.375 * 2 = 0.75 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

Este acoplamiento antiferromagnético puede explicarse considerando la geometría del complejo en estado sólido. En él, cada Cu(II) se encuentra pentacoordinado con una geometría de pirámide cuadrada distorsionada (el parámetro $\tau = \frac{\alpha+\beta}{60}$ tiene un valor de 0.23 lo que nos habla de una gran distorsión) [47]. Por tratarse de iones con configuración $[\text{Ar}]d^9$ en un entorno de pirámide cuadrada, el orbital donde se encuentra el electrón desapareado responsable del comportamiento magnético (orbital magnético) es el $d_{x^2-y^2}$ en cada uno de los centros metálicos.

Los orbitales magnéticos $d_{x^2-y^2}$ se encuentran en el plano de la molécula, por lo que el mecanismo de interacción mediante el puente imidazolato debe ser principalmente de tipo σ . Es probable que la distorsión de la geometría de pirámide cuadrada hacia la bipirámide triangular de los centros metálicos disminuya la fuerza del acoplamiento por esta vía, pero favorezca el acoplamiento a través del sistema π del ligante; lo que resulta finalmente en una gran interacción antiferromagnética.

Ahora ya sabemos que la estructura con puente imidazolato está presente en disolución en valores de pH mayores a 4, la detectamos con espectroscopía UV-vis y RPE e incluso, para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$, detectamos la intensidad de su acoplamiento. Aún queda por explicar el comportamiento electroquímico que fue una parte de la motivación para este trabajo.

4.1.5 Estudios electroquímicos.

Para terminar con los estudios de caracterización en disolución resulta importante hacer los estudios electroquímicos. Como ya se mencionó en la introducción, previamente se estudió al sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ a $\text{pH}=7.5$ con esta técnica [13, 27]. La interpretación de los resultados llevó a la conclusión de que la especie puenteada no se encontraba presente a esas condiciones; sin embargo en este trabajo hemos encontrado evidencias que muestran que la especie sí se encuentra en disolución.

La comparación del comportamiento del sistema con y sin puente, puede proveernos de más información y ayudarnos a interpretar mejor los voltamperogramas. Por este motivo se realizó el estudio electroquímico del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en dos condiciones distintas en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$:

- Voltamperometría cíclica del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ con $\text{pH}=7.5$ (fijado con amortiguador) variando el potencial de inversión. En estas condiciones se encuentra formado el puente imidazolato (Figura 22 a).
- Voltamperometría cíclica del sistema Cu_2fenmem con $\text{pH}=3.8$ (resultante de preparar el complejo in-situ con adiciones de NaOH para ajustar el pH) variando el potencial de inversión. En esta disolución está presente la especie con dos Cu(II) con entornos de coordinación distintos (Figura 22 b).

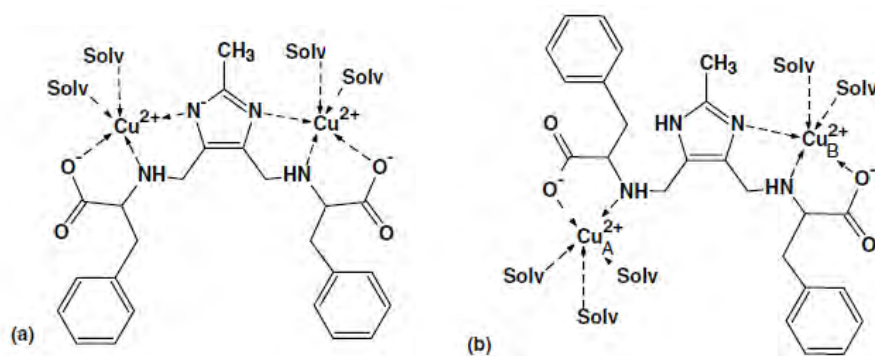


Figura 22. Estructura de las especies CuL^+ (a) y CuHL^{2+} (b)

Los voltamperogramas obtenidos en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ se presentan en la figura 23. Es importante notar que la serie de voltamperogramas obtenidos en este medio a $\text{pH}=7.5$ reproducen aquéllos obtenidos anteriormente (figura 9a).

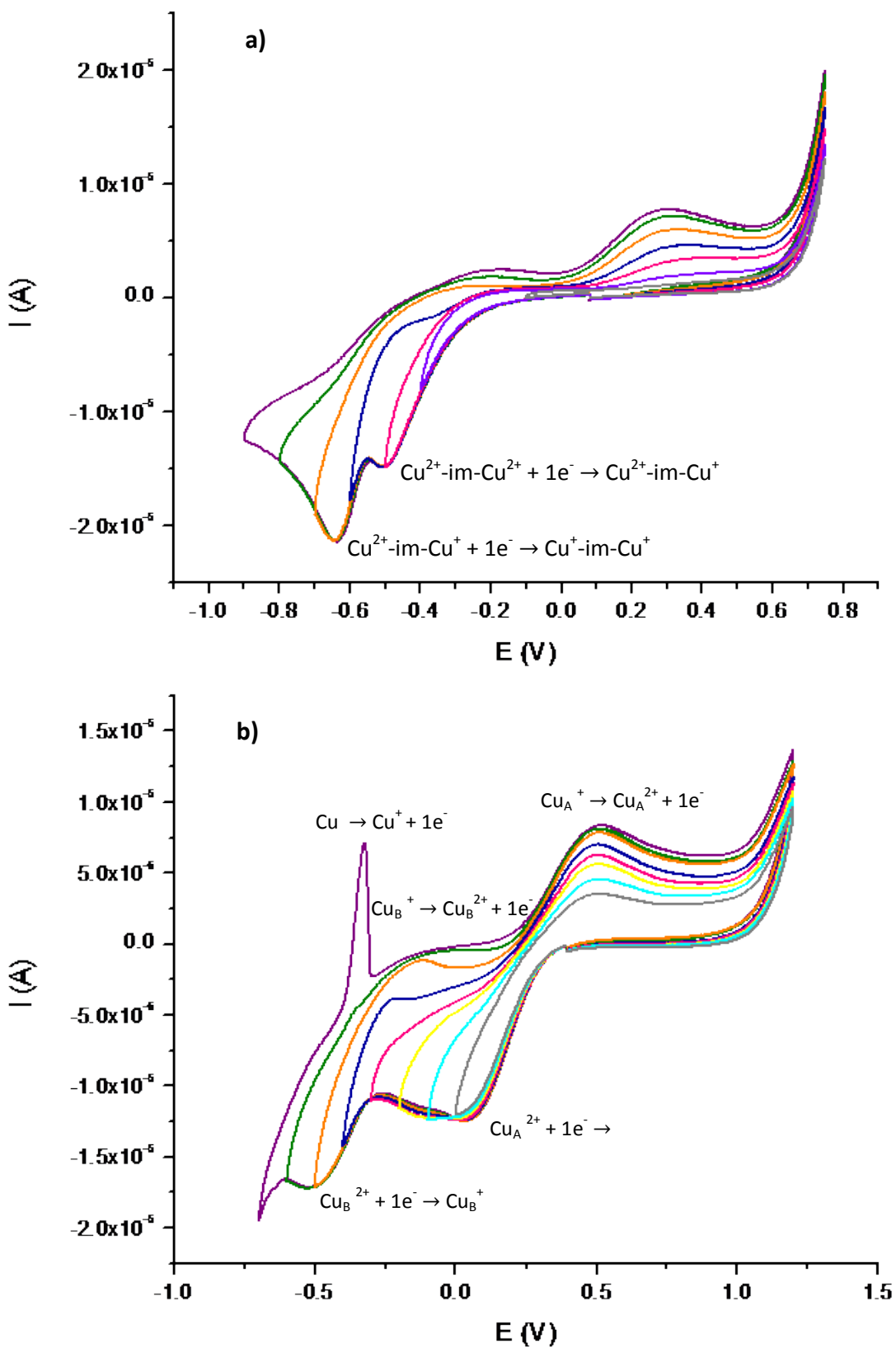


Figura 23. Voltamperogramas del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ a dos condiciones distintas: a) $\text{pH}=7.5$ b) $\text{pH}=3.8$. Los subíndices de los átomos de Cu son los que aparecen en la figura 22.

El análisis previo de la serie de voltamperogramas del sistema Cu₂fenmeim en MeCN:H₂O a pH=7.5 [27] se basaba en la idea de que las dos señales de reducción implicaban dos sitios de Cu(II) no equivalentes. Puesto que es más fácil reducir al cobre que está en el sitio bidentado del ligante que al que está en el sitio tridentado, la primera señal (E=-0.45V) se asignaba al Cu(II) di-coordinado al ligante y la segunda (E=-0.6) al Cu(II) tri-coordinado al mismo.

Sin embargo, puede notarse que esta interpretación aplica mejor para la serie de voltamperogramas a pH=3.8, que sabemos que no contiene al puente imidazolato. En ella hay dos señales de reducción en valores de potencial muy distintos: E₁=0.15V y E₂=-0.5V. En efecto se puede asignar cada una de ellas a la reducción de un cobre distinto y no equivalente. El hecho de que la primera señal de reducción sea reversible y la segunda no, nos ayudó a asignar cada una de las señales de reducción.

El Cu(II) en este tipo de sistemas, suele estar coordinado a 5 átomos donadores formando una pirámide cuadrada, mientras que el Cu(I) suele preferir geometrías tetraédricas. Al llevarse a cabo una reducción, el cobre cambia de estado de oxidación y también de geometría preferente. Un entorno de coordinación que favorezca este cambio de geometría permitirá que el proceso redox sea más reversible.

El Cu(II) en el sitio bidentado del ligante (Cu_A), tiene dos sitios de su esfera de coordinación ocupados por el ligante y el resto por moléculas de disolvente. Una vez que se reduce, basta con que una molécula de disolvente salga de la esfera de coordinación y las otras se reorienten para que cambie de geometría, el metal no debe abandonar al ligante, lo que permite que pueda re-oxidarse en un proceso reversible.

En cambio, al Cu(II) en el sitio tridentado (Cu_B) una vez que se reduce le resulta mucho más difícil el cambio de geometría y debe salir del ligante para estabilizarse en forma de Cu(I) tetraédrico con moléculas de disolvente. Por lo tanto asignamos la primera señal de reducción (reversible) al Cu_A y la segunda al Cu_B.

Una vez interpretada la serie de voltamperogramas obtenidos a pH ácido, queda la re-interpretación de los voltamperogramas obtenidos a pH=7.5.

En estudios previos de sistemas dinucleares de Cu(II) con puente imidazolato se ha observado también la presencia de dos señales de reducción [22, 23, 25, 28]. Los iones de cobre, al estar unidos mediante un puente imidazolato, interactúan muy intensamente; esto provoca que cuando uno se reduce, el potencial del otro cambie radicalmente y así los dos iones se vuelven no equivalentes.

Ésta resulta una explicación viable para la serie de voltamperogramas en MeCN:H₂O a pH=7.5 ya que sabemos, por el resto de los estudios en disolución, que el puente sí está presente. Además, al compararla con la serie obtenida a pH ácido, podemos notar que las dos señales de reducción están muy cerca la una de la otra, es decir que los sitios de cobre no son tan distintos (en realidad no son distintos estructuralmente sino que se diferencian en el proceso electroquímico). Finalmente, a pH=7.5 ninguno de los procesos es reversible, lo que nos hace pensar que ambos iones deben estar en sitios tridentados del ligante.

En resumen, a pH ácido no está formado el puente y la especie presente en disolución tiene dos sitios no equivalentes de cobre: uno en el que el ligante tiene un sitio de interacción bidentado y otro tridentado, el primero se reduce más fácil y reversiblemente que el segundo. A pH=7.5, en cambio, sí está formado el puente. Éste permite que los dos sitios de cobre interactúen de manera tan intensa que se hacen no equivalentes ante la reducción. En este caso también se observan dos señales de reducción, pero con menos diferencia en sus valores de potencial.

Esto concluye con los estudios de caracterización en disolución de los sistemas Cu₂L. La siguiente etapa de este proyecto consiste en relacionar los resultados obtenidos hasta ahora con su actividad catecolasa.

4.2 Evaluación cinética de la actividad catecolasa

Una vez que se conocieron las distintas especies de los sistemas Cu_2L presentes en disolución tanto en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ como en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$, se continuó con el trabajo para hacer el segundo objetivo del proyecto: determinar si estos sistemas son catalíticamente activos y en caso afirmativo determinar cuál es la especie responsable de esa actividad.

Se utilizó la reacción de oxidación de 3,5-diterbutilcatecol (3,5-DTBC) a 3,5-diterbutilquinona (3,5-DTBQ) para evaluar la actividad catecolasa de los sistemas Cu_2L . Esta reacción se ilustra en la figura 24.

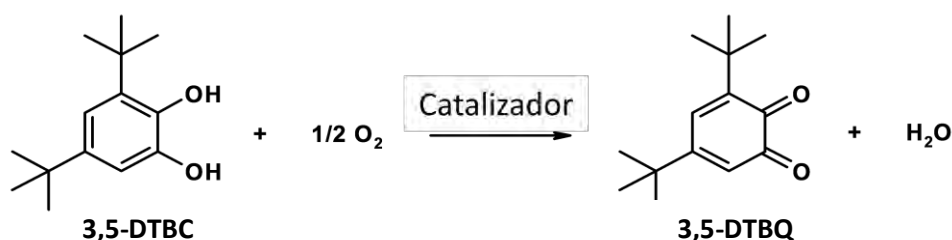


Figura 24. Esquema de la reacción de oxidación modelo

Hay tres reactivos directamente involucrados en la reacción: el 3,5-DTBC, el O_2 y el catalizador, y un factor más que debe considerarse: el pH, debido a que el paso de desprotonación del 3,5-DTBC puede ser importante y a que existe dependencia de la estructura del catalizador con esta propiedad. Para una completa evaluación catalítica, debería medirse la influencia de estos cuatro factores en la velocidad de la reacción.

En este trabajo se hizo el estudio de tres de ellos: el efecto de la variación de la concentración de sustrato, de la concentración de catalizador y del pH en la velocidad de la reacción. La evaluación de la influencia de la concentración de O_2 no se llevó a cabo debido a los problemas técnicos que involucra el trabajo con un gas.

El avance de la reacción de oxidación a 25°C se siguió mediante espectroscopía UV-vis. La 3,5-DTBQ es colorida y presenta un máximo de absorción cerca de 400 nm. En esta longitud de onda, los coeficientes de absorción molar de la quinona determinados experimentalmente son: $\epsilon_{\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}} = 1650 \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}} = 1630 \text{ cm}^{-1}$.

Para todas las determinaciones se midieron las velocidades iniciales por triplicado (mínimo) para cada punto. Se graficaron considerando el promedio y la desviación estándar resultante.

Los sistemas Cu₂L, como se ha mencionado a lo largo del texto, son sistemas modelo de metaloenzimas. Por esta razón, y por lo que se ha observado antes en sistemas análogos [17, 18, 29, 30], se cree que su comportamiento en la catálisis de la reacción de oxidación de 3,5-DTBC se podrá ajustar al modelo de Michaelis-Menten.

El modelo enzimático de Michaelis-Menten [48], considera que el proceso catalítico está constituido por dos etapas: la primera consiste en la formación reversible de un complejo (ES) entre el catalizador (E) y el sustrato (S) y la segunda en la regeneración del catalizador y la formación del producto (P).



El modelo aplica la aproximación del estado estacionario al complejo ES, se asume que su concentración no cambia con el tiempo, lo que implica que la velocidad de formación y destrucción del complejo son iguales, es decir:

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

De esta ecuación se puede despejar [ES] para obtener:

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

La concentración total de catalizador [E]_T involucrado en el proceso se encuentra de dos formas: en forma libre [E] y en forma de complejo [ES]; por lo tanto [E]_T=[E]+[ES]. Como en una evaluación catalítica se suele conocer precisamente [E]_T y no [E] resulta útil sustituir [E] por [E]=[E]_T-[ES] en la ecuación anterior:

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

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

Para finalmente obtener:

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

La siguiente aproximación que tiene el modelo, es la suposición de que la velocidad de la reacción está limitada por la segunda etapa de la reacción: la ruptura del complejo ES. Con esta suposición, la ecuación de velocidad del proceso queda así:

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

Ésta es ya la ecuación de Michaelis-Menten, para simplificarla se nombra una nueva constante: la constante de Michaelis $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$:

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

Finalmente, se observa una característica fundamental de las reacciones enzimáticas: tienen una velocidad máxima o de saturación, que se alcanza cuando todo el catalizador E_T está ocupado formando el complejo ES, es decir $[E]_T = [ES]$, en cuyo caso $v_{max} = k_2[E]_T$. Sustituyendo esta expresión se llega finalmente a forma más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Para poder aplicar este modelo, se deben considerar las suposiciones que se hicieron para llegar a él y las implicaciones que de él se derivan:

-La aproximación del estado estacionario asume que la concentración del complejo ES no cambia con el tiempo. Para que sea válida, se debe trabajar con las velocidades iniciales de la reacción, cuando aún no hay mucho producto formado.

-La ecuación de Michaelis-Menten indica que la relación entre la velocidad y la concentración de catalizador, manteniendo todo lo demás constante, es lineal (ver la penúltima ecuación). Si esto no es así, este modelo no será aplicable para describir al sistema.

-Del análisis de la ecuación, puede deducirse también que al variar la concentración de sustrato se producirá una curva de saturación con forma hiperbólica: en bajas concentraciones de sustrato la velocidad variará de manera lineal con él y en altas concentraciones la velocidad se mantendrá constante en un valor máximo.

-Las constantes utilizadas en este modelo tienen un significado físico que deberá ser considerado:

k_2 es también conocida como constante catalítica k_{cat} y nos habla del número de moléculas de sustrato que se transforman en producto por unidad de tiempo por molécula de catalizador (número de recambio), una vez que el sistema llegó a su velocidad máxima.

K_M por otra parte, se utiliza como indicador de la afinidad de la enzima por el sustrato. Puesto que $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, si $k_2 \ll k_{-1}$ entonces $K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$ se convierte en el equivalente a la constante de disociación del complejo ES. Así un valor pequeño de K_M indica una gran afinidad del catalizador por el sustrato y viceversa.

Finalmente, otro parámetro que se utiliza es la relación k_{cat}/K_M . Ya que cada una de ellas nos habla de una parte del proceso catalítico distinto, el cociente resulta un buen parámetro para comparar la eficiencia catalítica de distintos catalizadores o respecto a distintos sustratos. Entre mayor sea el cociente, más eficiente será el catalizador.

Lo importante ahora es determinar si este modelo puede aplicarse al comportamiento de los sistemas Cu_2L en $MeCN:H_2O$ y en $MeOH:H_2O$.

4.2.1 Efecto de la variación de $[Cu_2L]$ a distintos valores de pH

Para empezar con los estudios cinéticos, se evaluó el efecto de la variación de la concentración de catalizador en la velocidad inicial de la reacción de oxidación a distintos valores de pH. Para ello la concentración de 3,5-DTBC se mantuvo constante y al menos 100 veces mayor que la del complejo, que se fue variando. Esto nos permitió considerar la concentración del sustrato como una constante.

En la figura 25 se muestran las gráficas obtenidas para el sistema Cu_2 fenmeim tanto en $MeOH:H_2O$ como en $MeCN:H_2O$, y en la figura 26 se presentan las gráficas obtenidas para el sistema Cu_2 leumeim también en ambos medios.

Como se puede observar, la relación entre la concentración del catalizador y la velocidad de la reacción es lineal en los dos medios, en todos los valores de pH para los dos sistemas Cu_2L . Esto tiene dos implicaciones: en primer lugar indica que el orden de la reacción respecto al catalizador es de pseudo-primer orden en todas las condiciones. En segundo lugar, confirma que el modelo de Michaelis-Menten es adecuado para estos sistemas.

Otra observación importante es que la actividad crece notoriamente con el pH. La reacción catalizada es mucho más rápida en valores de pH básicos. Esto se nota en los valores de actividad para una concentración de catalizador fija; pero también en el incremento de las pendientes de las rectas ajustadas a los puntos experimentales, pues su valor representa la constante de velocidad de la reacción de pseudo-primer orden (k'). En las figuras 27 y 28 se presenta el comportamiento de k' al variar el pH para los sistemas Cu_2 fenmeim y Cu_2 leumeim respectivamente.

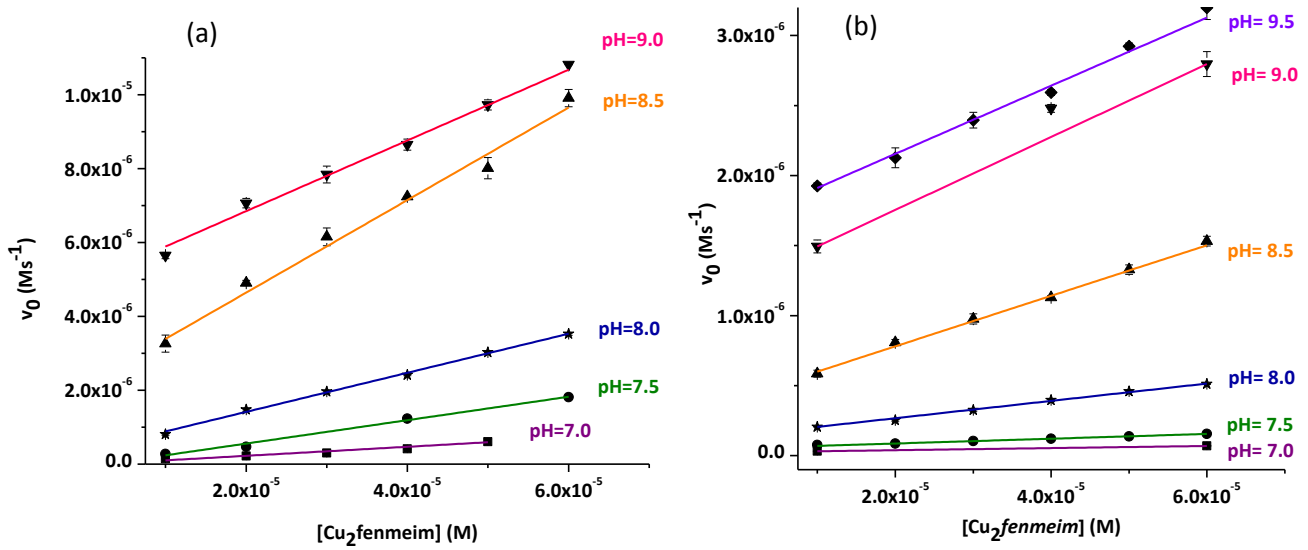


Figura 25. Gráficas de variación de la velocidad inicial con la concentración de $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en la reacción de oxidación de 3,5-DTBC tanto en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (a) como en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (b).

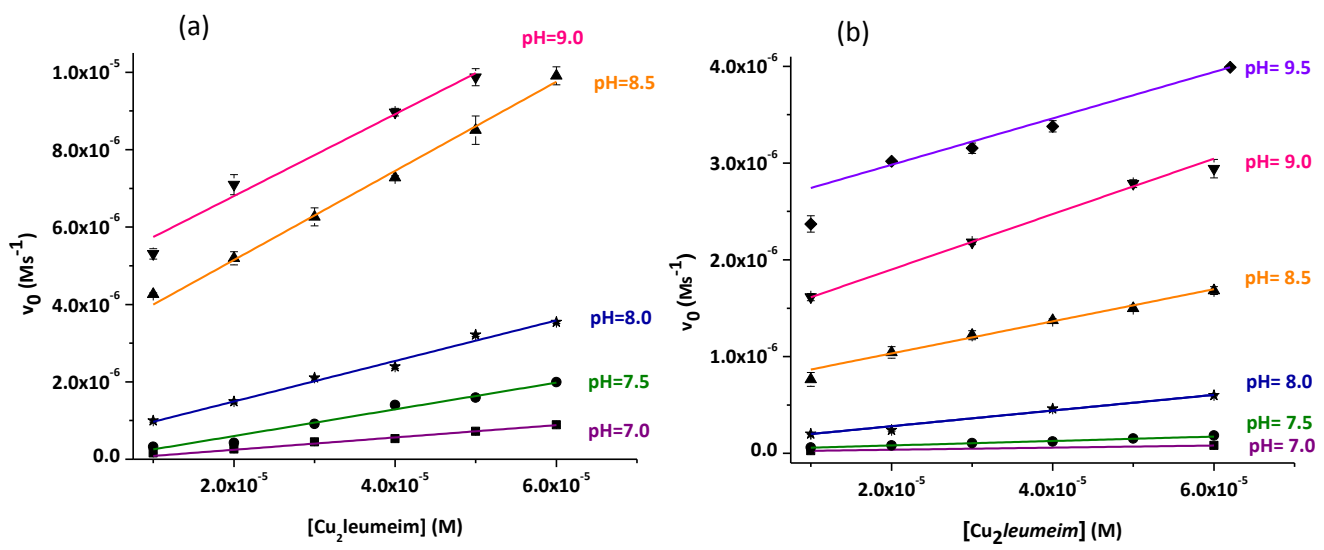


Figura 26. Gráficas de variación de la velocidad inicial con la concentración de $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ en la reacción de oxidación de 3,5-DTBC tanto en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (a) como en $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (b).

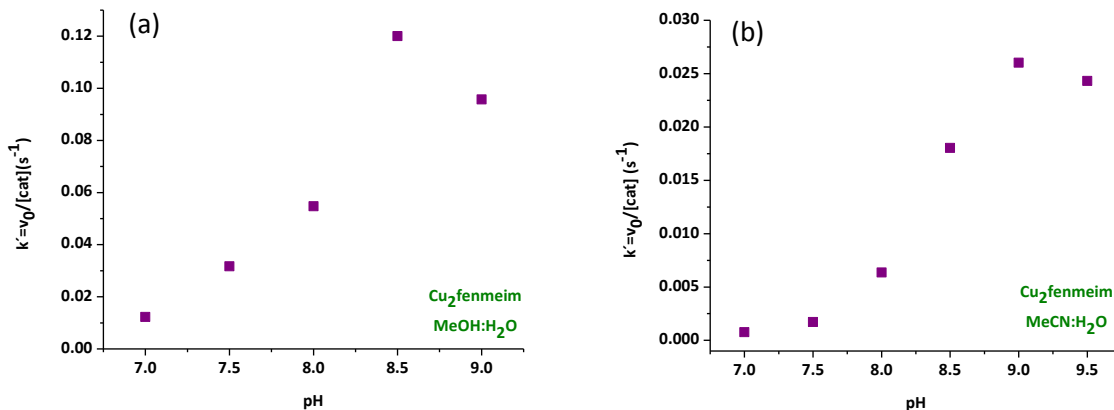


Figura 27. Gráficas de variación de la constante de pseudo-primer orden respecto al pH para el sistema $Cu_2fenmeim$ tanto en $MeOH:H_2O$ (a) como en $MeCN:H_2O$ (b).

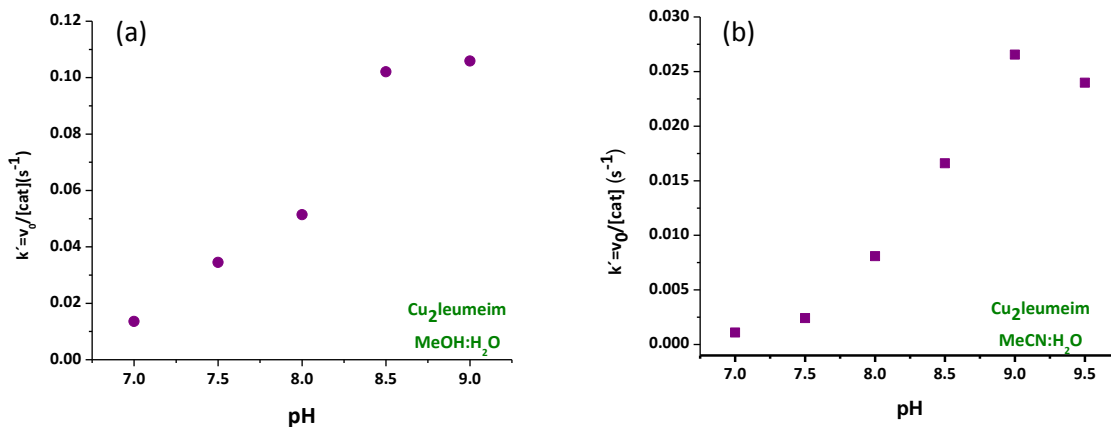


Figura 28. Gráficas de variación de la constante de pseudo-primer orden respecto al pH para el sistema $Cu_2leumeim$ tanto en $MeOH:H_2O$ (a) como en $MeCN:H_2O$ (b).

En estas representaciones se puede notar que la constante de pseudo-primer orden aumenta al aumentar el pH, la forma de las curvas es similar a la de una titulación, excepto que en este caso parece tener un máximo a $pH=9.0$. La eficiencia de los sistemas Cu_2L como catalizadores en esta reacción es máxima a $pH=9$.

Sin embargo, no se puede concluir mucho de estas observaciones, pues no se ha considerado que el medio por sí mismo podría ser capaz de catalizar la reacción y este comportamiento podría no deberse al catalizador. Por este motivo se realizó también un estudio del efecto de la variación de pH en la velocidad de la reacción con catalizador y sin catalizador.

4.2.2 Efecto de la variación de pH

Para estudiar el efecto del pH en la velocidad de la reacción catalizada y no catalizada se hicieron dos evaluaciones en cada uno de los medios: en la primera se mantuvieron constantes la concentración de sustrato y catalizador, mientras se varió el pH; en la segunda se mantuvo constante la concentración de sustrato, se varió el pH y no se adicionó catalizador. Los resultados se muestran en las figuras 29 y 30 para los sistemas $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ respectivamente.

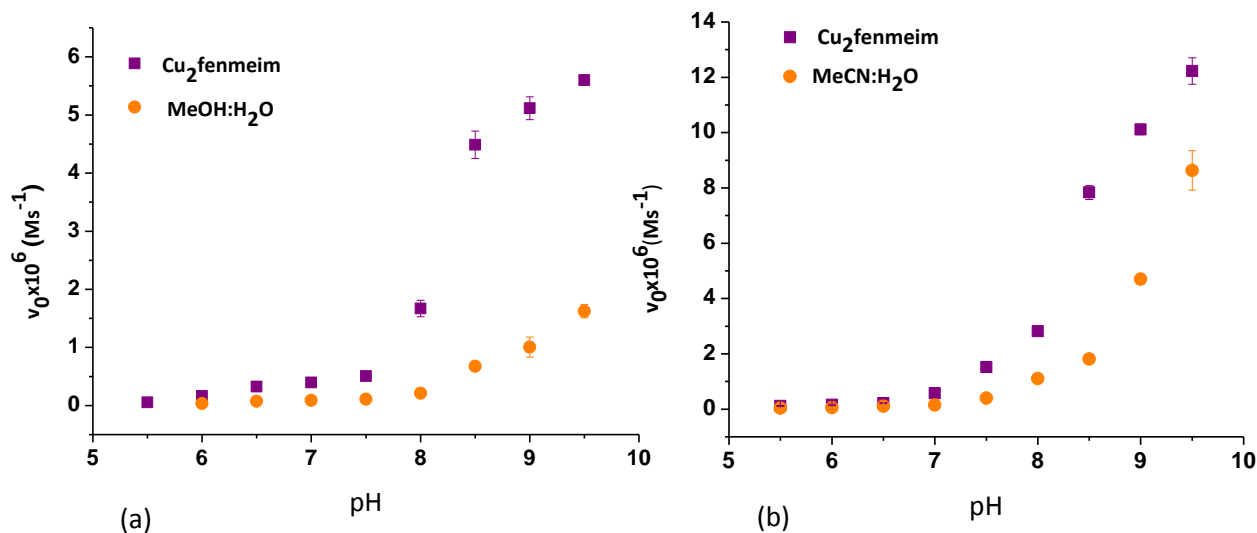


Figura 29. Gráficas de variación de la velocidad inicial respecto al pH para la reacción catalizada con $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y sin catalizar tanto en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (a) como en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ (b)

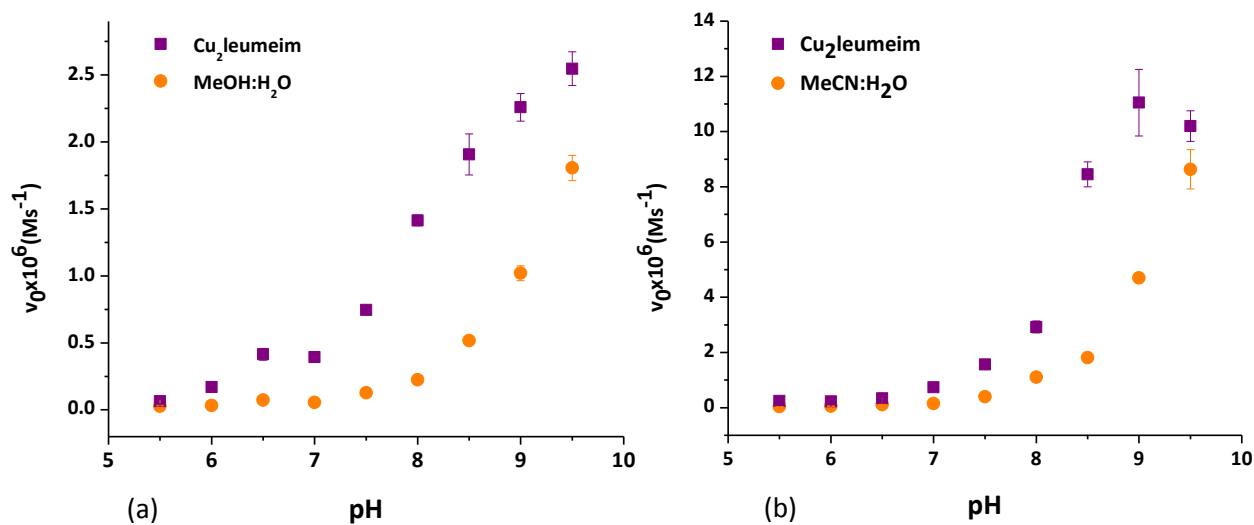


Figura 30. Gráficas de variación de la velocidad inicial respecto al pH para la reacción catalizada con $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ y sin catalizar, tanto en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (a) como en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ (b).

Es importante subrayar que las concentraciones de catalizador utilizadas en MeOH:H₂O y en MeCN:H₂O son distintas debido a las diferencias de actividad que presentan los sistemas en cada medio. En MeOH:H₂O la concentración en celda de Cu₂L es 3x10⁻⁵M mientras que en MeCN:H₂O es 10 veces mayor: 3x10⁻⁴M. Este factor debe tomarse en cuenta al analizar las gráficas obtenidas.

En las curvas puede apreciarse que el medio básico sí cataliza la reacción por sí mismo. Sin embargo, el efecto catalítico de los sistemas Cu₂L es mucho más importante en todos los casos especialmente a pH=8.5 y pH=9.0 cuando la diferencia entre la catálisis del medio y la catálisis de los complejos es mayor. La forma de las curvas ahora sí es idéntica a una curva de titulación con un punto de inflexión en un pH alrededor de 8.5.

Lo que resulta más interesante de estas gráficas, es que pueden correlacionarse con los diagramas de distribución de especies trazados previamente (figuras 12 y 13) para determinar cuál es la especie responsable de la actividad catalítica. La especie puenteada Cu₂L⁺ no puede ser la responsable, pues está presente en disolución desde valores ácidos de pH en los cuales no es activo el complejo. Sin embargo, por la forma de las curvas que se mantienen en valores muy bajos de actividad hasta pH=8 donde aumenta drásticamente, podemos pensar que la especie Cu₂L(OH) es la responsable de la actividad. Esta especie empieza a formarse en valores de pH cercanos a 8 que es precisamente cuando el catalizador comienza a ser activo.

La especie Cu₂L(OH) propuesta es la que contiene al puente imidazolato y una molécula de agua hidrolizada unida a uno de los átomos de cobre. Es interesante resaltar la similitud de esta especie con la especie enzimática activa [7]: en ambas los dos sitios de cobre están fuertemente acoplados antiferromagnéticamente y las dos cuentan con un ión hidroxilo en su estructura.

Es importante destacar que las concentraciones de Cu₂L y DTBC usadas en MeCN:H₂O son 10 veces mayores a las de MeOH:H₂O, por lo que la aparente mayor actividad en MeCN:H₂O en realidad es el reflejo de una actividad mucho menor, tanto que hubo que modificar las concentraciones de trabajo. Se puede ver, al comparar las gráficas en el mismo disolvente para cada ligante, que el sistema Cu₂fenmeim es más activo que el Cu₂leumeim. La magnitud de esta diferencia se evaluará cuando se determinen los parámetros cinéticos más adelante, para lo cual es necesario el estudio del efecto de la variación de la concentración de sustrato.

Las gráficas 29 y 30 se utilizaron para elegir el pH en el que se realizó este estudio. Las mayores diferencias entre la velocidad de la reacción catalizada y sin catalizar se presentan a pH=8.5 y pH=9.0, los cuales pueden considerarse como valores de pH óptimos para los catalizadores. En nuestro grupo de trabajo se ha trabajado con varios sistemas a pH=8.5, así que se eligió este valor de pH por ser óptimo para los sistemas Cu₂L y para facilitar la comparación entre los complejos.

4.2.3 Efecto de la variación de [3,5-DTBC]

El último experimento para completar el estudio catalítico es el del efecto de la variación de la concentración de sustrato en la velocidad de la reacción, a partir del cual se pudieron obtener las constantes cinéticas que permiten la comparación con otros sistemas. Para realizar este estudio se mantuvo constante la concentración de catalizador y se varió la concentración de sustrato. Los puntos obtenidos se presentan en naranja en las figuras 31 y 32.

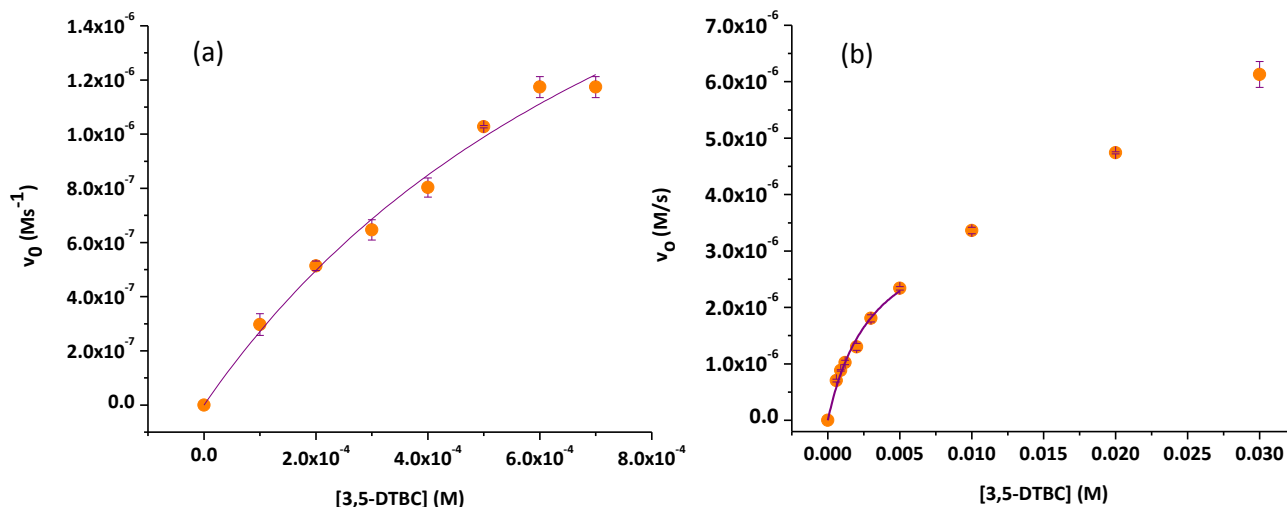


Figura 31. Ajuste de tipo Michaelis-Menten a los puntos experimentales de la variación de la velocidad inicial respecto a la concentración de sustrato para la reacción catalizada con Cu₂fenmeim tanto en MeOH:H₂O (a) como en MeCN:H₂O (b).

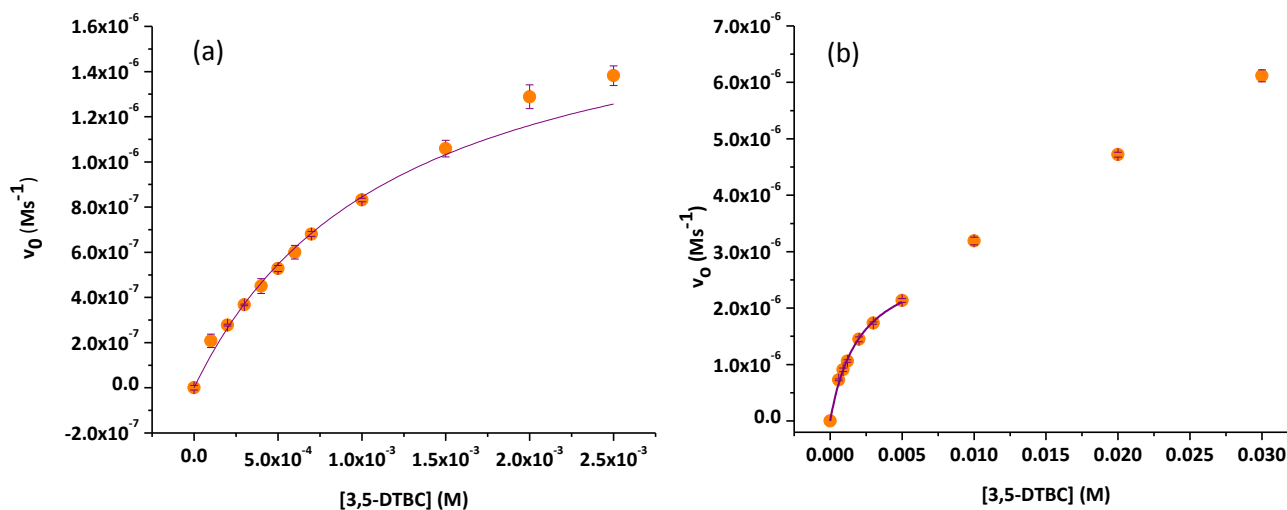


Figura 32. Ajuste de tipo Michaelis-Menten a los puntos experimentales de la variación de la velocidad inicial respecto a la concentración de sustrato para la reacción catalizada con Cu₂leumeim tanto en MeOH:H₂O (a) como en MeCN:H₂O (b).

El comportamiento de los sistemas Cu_2L es distinto en cada uno de los medios utilizados. Los sistemas son mucho más activos en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ que en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$, situación que se ha observado previamente en el grupo de trabajo [18, 29, 30], es tal la diferencia que incluso las condiciones que se utilizaron fueron distintas en cada medio: las concentraciones de catalizador y sustrato utilizadas en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ tuvieron que ser mayores que aquellas en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ y la relación sustrato/catalizador se pudo variar únicamente de 10 a 250 veces en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ mientras que en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ pudo trabajarse en relaciones de 30 hasta 1500 veces.

El trabajo en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ resulta mucho más sencillo por la menor actividad que presentan los sistemas en este medio. Esto puede notarse en, al menos, dos aspectos: primero, en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ fue posible trabajar hasta mayores proporciones 3,5-DTBC/ Cu_2L sin que el comportamiento cinético se saliera de control y segundo, las barras de error son menores en este medio que en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$.

El hecho de que en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ se haya trabajado con una mayor proporción catalizador:sustrato nos permitió detectar 2 tipos de comportamiento en este medio: desde la proporción 1:30 hasta 1:250, el comportamiento que se observa se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (línea morada en las figuras 31 y 32); sin embargo en proporciones mayores el comportamiento que se observa es lineal. Para explicar este cambio de comportamiento se requeriría un estudio cinético mucho más extenso, lo que es importante es subrayar que el cambio de comportamiento cinético al variar la proporción entre catalizador y sustrato se ha observado previamente en otros trabajos con sistemas modelo [7, 11].

Es este punto es importante mencionar que probablemente existan otros modelos, como el de saturación no catalítico, que también se ajusten a los datos obtenidos e incluso que puedan ajustar las dos tendencias observadas. Sin embargo, los parámetros de Michaelis-Menten son los utilizados dentro de nuestro grupo y fuera de él por lo que se trabajó con este modelo con fines comparativos, considerando siempre el intervalo en el que los datos se ajustan al modelo.

Resulta interesante mencionar que el intervalo en que los sistemas Cu_2L se ajustan al modelo de Michaelis en $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ es exactamente igual al utilizado para evaluar la actividad de los catalizadores en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$. Esto no se planeó así pero resultó una coincidencia afortunada.

En $\text{MeOH:H}_2\text{O}$, los sistemas se ajustan al modelo de Michaelis-Menten en todo el intervalo de concentraciones trabajado. Para ambos sistemas Cu_2L , pero especialmente para $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$,

solamente se logró observar la parte inicial de la hipérbola que esperábamos. Se intentó obtener puntos a mayores concentraciones de 3,5-DTBC pero la reacción es tan rápida que no se lograba determinar la velocidad inicial. De hecho, particularmente para el sistema Cu₂fenmeim, las mediciones catalíticas fueron muy complicadas, pues el sistema es muy rápido y determinar la velocidad inicial no fue sencillo.

Los ajustes de los datos experimentales al modelo de Michaelis-Menten se realizaron en el programa Origin. Los parámetros obtenidos se presentan a continuación:

Tabla 6. Parámetros cinéticos de los sistemas Cu₂fenmeim y Cu₂leumeim a pH=8.5 en MeOH:H₂O y MeCN:H₂O.

		R ²	K _M	V _{max}	[Cu ₂ L] (M)	k _{cat}	k _{cat} /K _M
Cu ₂ fenmeim	MeOH:H ₂ O	0.989	0.00098	2.92x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁵	0.292	299
	MeCN:H ₂ O	0.987	0.00207	2.98x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁵	0.149	72
Cu ₂ leumeim	MeOH:H ₂ O	0.994	0.00120	1.86x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁵	0.186	155
	MeCN:H ₂ O	0.997	0.0032	3.76x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁵	0.188	59

El parámetro que resulta más importante para la comparación es k_{cat}/K_M pues éste expresa la eficiencia catalítica. Para los dos sistemas Cu₂L este parámetro es mayor en MeOH:H₂O, lo que nos habla de una mayor actividad en este medio, tal como ya se había observado. Esta situación se debe a que el acetonitrilo, por ser más blando que el metanol [49, 50], estabiliza mejor al Cu(I), tanto que el proceso de regeneración del catalizador se hace demasiado lento y esto afecta su actividad catalítica.

Por otro lado, en ambos medios la actividad del sistema Cu₂fenmeim es mayor. En MeCN:H₂O esta diferencia no es demasiado significativa, pero en MeOH:H₂O es casi dos veces más activo que el sistema Cu₂leumeim. La única diferencia entre los dos sistemas es el radical R del aminoácido utilizado (figura 6) que es un anillo aromático en el caso del fenmeim y una cadena alifática ramificada en el caso del leumeim. La explicación de la diferencia de actividades no es sencilla, podría deberse a que el grupo aromático del ligante fenmeim presentara una interacción π con el 3,5-DTBC o a que el grupo alifático ramificado del leumeim provocara un mayor impedimento estérico con los grupos terbutilo del 3,5-DTBC. Sin embargo para aclarar este punto se requerirían más estudios sistemáticos con otros ligantes análogos.

Otro parámetro interesante es la K_M , esta es una constante que nos habla de la afinidad del catalizador por el sustrato y mientras menor es, mayor es la afinidad. En ambos medios el sistema Cu_2 fenmeim tiene un valor menor de K_M , este sistema es en efecto más afín al catalizador como ya se discutió en el párrafo anterior. También se observa que para ambos sistemas K_M es mayor en $MeOH:H_2O$ que en $MeCN:H_2O$, tampoco nos sorprende por lo discutido previamente.

Finalmente, podemos resumir los resultados que se obtuvieron del estudio cinético:

- Los sistemas Cu_2L son más activos en valores de pH mayores, siendo sus valores de pH óptimo 8.5 y 9.0.
- Por este motivo, correlacionando con lo obtenido en la etapa previa del trabajo, puede asignarse como especie activa a la que contiene al puente imidazolato y una molécula de disolvente hidrolizada $Cu_2L(OH)$.
- Ambos sistemas son mucho más activos en $MeOH:H_2O$ que en $MeCN:H_2O$ debido a las propiedades de dureza de los disolventes.
- El sistema Cu_2 fenmeim es más activo que el Cu_2 leumeim en ambos medios. Puede deberse a interacciones con el sustrato o a impedimento estérico.

Capítulo 5. Conclusiones

Los sistemas Cu_2L en H_2O , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ presentan equilibrios dependientes del pH entre las especies $\text{Cu}_2\text{HL}^{2+}$, Cu_2L^+ y $\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})$. En valores de pH ácido predomina la especie $\text{Cu}_2\text{HL}^{2+}$ que contiene dos sitios de cobre no equivalentes, unidos a un sitio di- y otro tri-dentado del ligante. La especie puenteada (Cu_2L^+) se encuentra en disolución a partir de $\text{pH} \approx 4$ y predomina en valores de pH cercanos a 7. Finalmente a pH básico esta especie puede perder el protón de una de las moléculas de disolvente coordinadas sin que la especie puente desaparezca (especie $\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})$).

La especie que contiene al puente imidazolato Cu_2L^+ , es responsable de la aparición de una señal cercana a 400 nm y el desplazamiento de otra a 670 nm en el espectro UV-visible. Puede detectarse también mediante RPE, pues la formación de esta especie permite el acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones metálicos, desapareciendo la señal de RPE. La interacción antiferromagnética entre los centros metálicos en la especie puenteada es muy grande y su magnitud se determinó mediante estudios magnéticos del sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ en estado sólido.

El comportamiento electroquímico de la especie con puente imidazolato nos indica que los cobres puenteados, aunque estructuralmente equivalentes, no son equivalentes frente a la reducción, obteniéndose dos señales de reducción con potenciales cercanos; a diferencia de la especie $\text{Cu}_2\text{HL}^{2+}$ sin puente, para la que se obtienen potenciales muy separados.

Los sistemas Cu_2L son activos catalíticamente en la reacción de oxidación de 3,5-DTBC. El puente imidazolato sí tiene un efecto en la actividad catalítica pues la especie responsable de la actividad, que es mayor a pH básico, es la especie con puente e hidrolizada $\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})$. El comportamiento de estos sistemas se ajusta a una ecuación del tipo Michaelis-Menten.

Capítulo 6. Parte experimental

La metodología empleada en cada una de las etapas del proyecto se detalla a continuación, luego de la descripción detallada del equipo y los reactivos utilizados.

6.1 Reactivos utilizados

A continuación se enlistan los reactivos usados en la realización de este proyecto, estos fueron empleados tal y como fueron adquiridos.

Tabla 7. Nombre, fórmula, marca y pureza de los reactivos utilizados en este proyecto.

Compuesto	Fórmula	P.M. (g/mol)	Marca	Pureza
2-metilimidazol	C ₄ H ₆ N ₂	82.11	Sigma-Aldrich	99%
Formaldehido	CH ₂ O	30.03	Mallinckrodt	37% A.R.
L-fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19	Sigma-Aldrich	99%
L-leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18	Aldrich	99%
Hidróxido de sodio	NaOH	39.99	J.T. Baker	98.4%
Ácido Perclórico	HClO ₄	100.42	Mallinckrodt	70%
Ácido nítrico	HNO ₃	63.01	J.T. Baker	65.2%
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.11	Aldrich	99+% A.C.S.
Perclorato de sodio	NaClO ₄	122.44	Sigma-Aldrich	98+% A.C.S.
Nitrato de Cobre	Cu(NO ₃) ₂ ·2.5H ₂ O	241.6	J.T.Baker	99.9%
Perclorato de Cobre	Cu(ClO ₄) ₂ ·6H ₂ O	370.43	Aldrich	98%
Biftalato de potasio	KC ₈ H ₅ O ₄	204.23	Aldrich	99.95-100.05%
Ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄	118.09	Mallinckrodt	A.R.
TRIS	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121.14	Aldrich	99.9+% ultrapure
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238.3	Aldrich	99.5% titration
3,5-DTBC	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	222.33	Sigma-Aldrich	99%
Metanol	CH ₄ O	32.04	Sigma-Aldrich	≥ 99.9%
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	41.05	Sigma-Aldrich	≥ 99.5%
Etanol	C ₂ H ₆ O	46.07	J.T. Baker	99.9 %
Acetona	C ₃ H ₆ O	58.08	Sigma-Aldrich	99.5%
Nitrógeno comprimido	N ₂	28.02	Praxair	N.A.
Hidróxido de potasio	KOH	56.11	Merck	85%
Buffer pH=4.00 (Biftalato de potasio)	KC ₈ H ₅ O ₄	N.A.	Sigma-Aldrich	N.A.
Buffer pH=7.00 (fosfato de sodio dibásico + fosfato monobásico)	Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄	N.A.	Sigma-Aldrich	N.A.
Buffer pH=10.00 (carbonato de sodio + bicarbonato de sodio)	Na ₂ CO ₃ + NaHCO ₃	N.A.	Sigma-Aldrich	N.A.
EDTA disódico	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	372.18	J.T. Baker	99.3 %

6.2 Equipo utilizado

Las características de los equipos utilizados para los distintos estudios realizados se detallan en la tabla que se presenta a continuación:

Tabla 8. Especificaciones de los equipos utilizados en los estudios realizados en este proyecto.

Estudios realizados	Equipo utilizado
Potenciometría	Titulador automático con dosificador 702 SM Titrino (metrohm) y agitador 728 Stirrer. Electrodo Ecotrode Plus (metrohm). Software Tiamo, titration and more 3.1 (metrohm).
Espectrofotometría y estudios cinéticos	Espectrofotómetro Agilent 8453. UV-Visible Chemstation Software.
Resonancia Paramagnética Electrónica	Equipo Bruker FA-300, ELEXIS 500, USAI
Electroquímica	Potenciostato/ galvanostato AUTOLAB PGSTAT 100
Estudios Magnéticos	Magnetómetro de diseño cuántico SQUID MPMS-XL En la "Unitat de Mesures Magnètiques" de la Universidad de Barcelona
Caracterización de los compuestos sólidos	Análisis Elemental. Fisons AE 1108, USAI. Resonancia Magnética Nuclear, Unity INOVA 300MHz (Varian), USAI Espectrofotómetro FT-IR, Spectrum RX1 (Perkin Elmer), USAI.

6.3 Metodología

6.3.1 Síntesis

Los ligantes fenmeim y leumeim habían sido preparados anteriormente en el grupo de trabajo, y los procesos de síntesis están descritos. [13, 26]. Para realizar este trabajo se repitió la síntesis, a continuación se describe el procedimiento llevado a cabo.

6.3.1.1 Síntesis del ligante fenmeim

Se disolvieron 2.05g (0.025moles) de 2-metilimidazol en 150mL de agua. Se le adicionaron 8.25g (0.05moles) de L-fenilalanina y se formó una suspensión a la que se le adicionaron unas gotas de KOH hasta conseguir la disolución. Gota a gota se le adicionaron 6mL (0.075moles) de una disolución al 37% de formaldehído mezclados con 20mL de agua. El pH de la mezcla resultante se ajustó a pH=12 con KOH y el sistema se dejó bajo agitación y calentamiento a 55°C durante 24

horas. Luego de este tiempo, la solución se neutralizó con ácido acético (hasta $\text{pH} \approx 7$, pues el punto isoeléctrico calculado para el ligante es de 7.3).

Se formó un sólido con consistencia de engrudo, éste se filtró y se enjuagó con agua (para quitar acetatos) y con etanol (para romper la emulsión y secar el producto). El filtrado se dejó agitando una noche con agua y etanol, se filtró y se volvió a lavar con etanol, moliendo los grumos existentes. Se filtró de nuevo y se lavó con acetona bajo un ligero calentamiento. Luego de unas horas agitando en acetona se filtró de nuevo y se obtuvo un polvo fino y blanco que se caracterizó mediante IR (señales: ancha de 3500 a 300 cm^{-1} de los ácidos carboxílicos, 3400 cm^{-1} de los aromáticos, 2500 cm^{-1} de las aminas protonadas, 1495 cm^{-1} de los enlaces N=C y N-C de imidazol, 1609 cm^{-1} del ácido carboxílico, alrededor de 3000 cm^{-1} de los metilos y metilenos), análisis elemental ($\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ experimental[teórico]: Carbono 58.65[58.76], Nitrógeno 11.54[11.42] e Hidrógeno 6.46[6.99], todos con error menor al 5%) y RMN ^1H para confirmar que se trataba del ligante fenmeim. El rendimiento obtenido de la reacción fue aproximadamente de 34%.

6.3.1.2 Síntesis del ligante leumeim

Se disolvieron 2.05 g (0.025 moles) de 2-metilimidazol en 150 mL de agua. Se le adicionaron 6.56 g (0.05 moles) de L-leucina y se formó una suspensión a la que se le adicionaron unas gotas de KOH hasta lograr la disolución completa. Gota a gota se le adicionaron 6 mL (0.075 moles) de una disolución al 37% de formaldehído mezclados con 20 mL de agua. El pH de la mezcla resultante se ajustó a $\text{pH} = 12$ con KOH y el sistema se dejó bajo agitación y calentamiento a 55°C durante 6 días.

Se obtuvo una solución naranja que se llevó a $\text{pH} \approx 7.5$ con ácido acético. No se observó la formación de precipitado, por lo que se dejó con vacío durante 1 noche. Se obtuvo un gel que se filtró y se lavó 3 veces con metanol. Luego de los lavados se obtuvo un sólido blanco que se caracterizó mediante IR (señales: ancha de 3500 a 300 cm^{-1} de los ácidos carboxílicos, 2500 cm^{-1} de las aminas protonadas, 1495 cm^{-1} de los enlaces N=C y N-C de imidazol, 1582 cm^{-1} del ácido carboxílico desprotonado, 2870 cm^{-1} de los metilenos del aminoácido, alrededor de 1370 cm^{-1} de los isopropilos y entre 1200 y 1000 cm^{-1} de las aminas secundarias), análisis elemental ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ experimental[teórico]: Carbono 51.26[51.17], Nitrógeno 12.98[13.26] e Hidrógeno 8.75[9.07], todos con error menor al 5%) y RMN ^1H para confirmar que se trataba del ligante leumeim.

6.3.1.3 Síntesis del complejo Cu₂fenmeim

El complejo Cu₂fenmeim se preparó mezclando 4.9 g de fenmeim (0.01 moles) con 4.6 g de Cu(NO₃)₂ en 50 mL de la mezcla MeCN:H₂O (en proporción 1:1), con la fracción acuosa amortiguada a pH=7.5 con HEPES. Se dejó evaporar el disolvente por varios días hasta que el complejo cristalizó. Se analizó la celda unitaria de los complejos para asegurar que se trataba del mismo complejo antes sintetizado [27].

6.3.2 Especiación y caracterización de las especies presentes en disolución

6.3.2.1 Estudios potenciométricos

Los estudios potenciométricos se realizaron en 3 medios distintos: H₂O, MeOH:H₂O y MeCN:H₂O. Sin importar el medio de trabajo, el equipo debe prepararse para llevar a cabo las titulaciones. A continuación se enumeran los pasos realizados cada vez que se inició una serie de titulaciones para alistar el equipo y las disoluciones de referencia:

- i. Activación del electrodo. Se sumergió la punta del electrodo por 3 minutos en ácido 0.1 M, se enjuagó y se sumergió 3 minutos en NaOH 0.1 M. Este proceso se realizó por triplicado.
- ii. Calibración del electrodo. El electrodo siempre se debe calibrar en agua para realizar la normalización de las disoluciones de ácido y sosa. La calibración se realizó con 3 amortiguadores de pH= 4, 7 y 10 respectivamente, a 25°C.
- iii. Preparación de disoluciones para normalizaciones.
 - a. NaOH aproximadamente 0.1M en agua. Primero se preparó NaOH saturada para precipitar sus carbonatos, colocando en un vial 6g de NaOH y adicionando 9mL de H₂O destilada. Luego de dejar reposar un par de días, se tomaron aproximadamente 2/3 partes esta solución concentrada y se llevaron a 1L con agua destilada hervida.
 - b. HClO₄ aproximadamente 0.1M (500mL) en agua. Se hizo la dilución directamente midiendo 4.275mL del ácido concentrado y llevando a 500mL con agua destilada.
 - c. Biftalato de potasio 0.02M en agua (100mL). El biftalato de potasio es un patrón primario, por lo que se conserva en la estufa evacuada para que no esté húmedo. Se pesaron 0.4085g lo más rápido posible para evitar humedad y la pesada se usó como referencia para la normalización.

- iv. Preparación del equipo. Se lavaron los contenedores y las mangueras del titulador con agua destilada y posteriormente con las disoluciones de ácido y base preparadas anteriormente. Posteriormente se rellenaron los contenedores.
- v. Normalización del hidróxido de sodio con el biftalato. Se titularon por triplicado 25mL de la disolución de biftalato con NaOH. A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración de la sosa (distinta en cada ocasión).
- vi. Verificación de que la NaOH no contenga un exceso de carbonatos (más del 5%). La determinación del contenido de carbonatos en la base se hizo mediante el método de Gran [30] y consistió en lo siguiente:

- a. Se determinó el punto de equivalencia de la titulación de ácido fuerte con base fuerte por el método de la segunda derivada.
- b. A los puntos antes del punto de equivalencia se les aplicó la siguiente función:

$$\varphi_1 = (V_{inc} + v) * 10^{-pH}$$

- c. A los puntos después del punto de equivalencia esta otra:

$$\varphi_2 = (V_{inc} + v) * 10^{pH}$$

- d. Se graficó, en la misma gráfica, la función φ contra el volumen de NaOH agregado
- e. A cada una de las tendencias se les aplicó una regresión lineal
- f. Las ecuaciones resultantes se igualaron a cero, con lo que se obtuvieron los valores de x_1 y x_2 correspondiendo x_1 a los puntos antes del punto de equivalencia y x_2 a los de después.
- g. Los valores de x_1 y x_2 se introdujeron en la siguiente ecuación para obtener directamente el porcentaje de carbonatos en la muestra:

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

- vii. Estandarización del ácido utilizado. Se hizo una dilución de HClO₄ a partir de la disolución \approx 0.1M preparada previamente tomando 20mL y llevando a 100mL con una disolución 0.1M de NaClO₄ en agua destilada para fijar la fuerza iónica. Esta disolución se tituló por triplicado con la sosa normalizada para obtener la concentración real de ácido (distinta en cada ocasión).

Estas siete acciones son necesarias para las titulaciones en cualquier medio. A partir de este punto algunos pasos son distintos para cada uno de los medios estudiados. A continuación se describen los procedimientos utilizados: primero para agua que es el medio más sencillo y luego para MeOH:H₂O y MeCN:H₂O que requieren un paso de calibración adicional.

6.3.2.1.1 Titulaciones en H₂O

- i. Preparación de las disoluciones de interés.
 - a. Preparación de la disolución de ligante completamente protonado. Se prepararon 100mL de la disolución de ligante 1×10^{-3} M. Se agregaron 5 equivalentes de ácido para asegurar la protonación total. Las adiciones de ácido se hicieron con el dosificador del titulador automático (precisión de 0.001 mL) y se controlaron desde el software *tiamo*. El aforo se alcanzó con NaClO₄ 0.1 M para fijar la fuerza iónica.
 - b. Preparación del ligante completamente protonado con cobre. Se prepararon 100mL de la disolución del sistema Cu₂L 1×10^{-3} M partiendo de una disolución estandarizada de Cu(II) y del ligante en sólido. De nuevo se agregaron 5 equivalentes de ácido con el dosificador y se fijó la fuerza iónica con NaClO₄.
- ii. Realización de las titulaciones:
 - c. En la celda se colocaron 25 mL de la disolución de interés.
 - d. Se agitó la disolución con burbujeo constante de nitrógeno durante 10 minutos.
 - e. Manteniendo el burbujeo, se hicieron adiciones de 0.01mL de NaOH registrando el valor de pH después de cada adición y hasta que éste llegó a un valor de 13.
 - f. Para cada disolución las titulaciones se realizaron por triplicado.

6.3.2.1.2 Titulaciones en MeOH:H₂O

Antes de realizar las titulaciones en MeOH:H₂O es necesario calibrar el electrodo en este medio. Esta calibración se realiza mediante los siguientes pasos:

- i. Preparación del amortiguador. Se utilizó un amortiguador de succinatos en la mezcla 1:1 MeOH:H₂O (44% en peso de MeOH) con pH=4.94. Este amortiguador debe tener 0.01 mol/kg de ácido succínico y 0.01 mol/kg de succinato [37].
Para su preparación se pesaron 0.2124 g (1.8×10^{-3} moles) de ácido succínico y se adicionaron 2.205 mL de NaOH 0.2048 M (4.5×10^{-4} moles). Luego se adicionaron 50mL de MeOH y 47.795 mL de agua (50-2.205 mL).
- ii. Calibración directa del electrodo con un solo punto. Se sumergió el electrodo en el amortiguador preparado anteriormente a 25°C y se fijó el pH en 4.94.

- iii. Preparación de una disolución ≈ 0.02 M de ácido fuerte en la mezcla MeOH:H₂O. Se prepararon 100mL de una disolución 0.02 M de HClO₄ a partir de una disolución de este ácido previamente estandarizada. El aforo se alcanzó con la mezcla MeOH:H₂O a la que se le fijó el valor de fuerza iónica a I=0.1 M con NaClO₄.
- iv. Titulación de un ácido fuerte en MeOH:H₂O con NaOH acuoso. Este paso es fundamental en la calibración, pues con estas titulaciones determinaremos la eficiencia del electrodo y con este valor corregiremos los valores obtenidos de las titulaciones de nuestros sistemas.
 - a. Se colocaron 25 mL de la disolución de ácido previamente preparada en la celda.
 - b. La disolución se agitó con burbujeo de nitrógeno durante 10 minutos.
 - c. Manteniendo el burbujeo, se adicionaron con el dosificador 0.1 mL de NaOH. Se midió el pH y el valor de E, ambos se registraron.
 - d. Se realizó el mismo procedimiento (paso c) hasta llegar a 4 mL adicionados.
 - e. La titulación se realizó por triplicado.
- v. Obtención del parámetro E_f [39].
 - a. Se graficaron los pares de valores (pH,E)
 - b. Los puntos obtenidos se modelaron con la ecuación que se presenta a continuación, fijando el valor de E_f en 1 inicialmente.

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

Donde:

pH_{corr}= pH corregido por la eficiencia de la celda

pH_{exp}= pH leído por el electrodo

pH_{cal}= pH con el que se calibró (4.95 en este medio)

E_f= eficiencia de la celda.

- c. El valor de E_f se fue cambiando hasta obtener una línea que se ajustó a los datos y con una pendiente de -59.16 (coeficiente de la ecuación de Nernst cuando n=1).
- d. El valor de E_f así obtenido es el parámetro de eficiencia de la celda que se utilizó para corregir los datos obtenidos de las titulaciones en MeOH:H₂O.

En este punto, el equipo está listo para titular disoluciones en MeOH:H₂O. Para poder utilizar la NaOH acuosa como titulante, es necesario que el volumen de ésta adicionado no exceda al 10% de la mezcla total para no alterar la proporción MeOH:H₂O y que la calibración realizada sea válida.

- vi. Preparación de las disoluciones de interés. Este punto es idéntico a las titulaciones en agua, sólo cambia la disolución con la que se alcanzó el aforo.
 - a. Preparación de 100 mL de la disolución de ligante $1 \times 10^{-3} \text{M}$ completamente protonado. El aforo se alcanzó con la mezcla MeOH:H₂O con NaClO₄ 0.1M para fijar la fuerza iónica.
 - b. Preparación del 100mL de la disolución de ligante completamente protonado con cobre [Cu₂L]= $1 \times 10^{-3} \text{M}$. El aforo se alcanzó con la mezcla MeOH:H₂O con NaClO₄ 0.1M para fijar la fuerza iónica.
- vii. Realización de las titulaciones. Los pasos seguidos son los mismos que los enlistados para las titulaciones en agua.
- viii. Corrección de los valores de pH obtenidos. Los valores de pH obtenidos directamente de la lectura del electrodo, se corrigieron mediante la ecuación previamente presentada:

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

Los valores de pH_{corr} son los que se utilizaron para el análisis de datos con el programa Hyperquad 2003.

6.3.2.1.3 Titulaciones en MeCN:H₂O

El procedimiento para realizar las titulaciones en MeCN:H₂O es muy similar al empleado para MeOH:H₂O, sólo cambia el amortiguador que se utiliza.

En MeCN:H₂O el amortiguador utilizado está hecho de biftalato de potasio 0.05mol/kg en la mezcla MeCN:H₂O 1:1 v:v (43.88% en porcentaje en peso) y fija un pH=5.37 [38]. Para realizarlo se pesaron 0.5106g de biftalato de potasio y se adicionaron 50g de la mezcla MeCN:H₂O.

Al igual que para MeOH:H₂O, el electrodo se calibró con un punto y se realizaron las titulaciones de ácido fuerte en la mezcla con NaOH acuosa para determinar E_f . Posteriormente se realizaron las titulaciones de las disoluciones de interés y los valores de pH se corrigieron con el valor de E_f obtenido y la ecuación antes descrita.

Nota:

El procedimiento de los estudios potenciométricos se detalló para las titulaciones en las que se emplearon percloratos como contraiones. Sin embargo, para el ligante fenmeim en los tres medios las titulaciones también se realizaron usando nitratos como contraiones. El procedimiento que se siguió es el mismo, únicamente cambió el ácido empleado (en este caso HNO_3) y la sal con la que se fijó la fuerza iónica (KNO_3).

6.3.2.2 Estudios espectrofotométricos

Los estudios espectrofotométricos se realizaron también en los 3 medios: H_2O , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$, y consistieron en seguir espectrofotométricamente una titulación potenciométrica, de manera que se pueda correlacionar los espectros electrónicos con el valor de pH del medio.

Se titularon 25mL de una disolución de Cu_2L $1 \times 10^{-3}\text{M}$ + 5 equivalentes de ácido en cada uno de los 3 distintos medios, haciendo adiciones de 0.1mL de NaOH 0.1M en agua con el dosificador del titulador automático. Luego de cada adición se medía el valor de pH, se sacaban aproximadamente 3mL de la mezcla de reacción y se obtenía su espectro de absorción. La disolución retirada se regresaba con precaución a la celda potenciométrica y se hacía la siguiente adición.

La fuerza iónica de las disoluciones de Cu_2L se fijó $I=0.1\text{M}$ con KNO_3 para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y con KClO_4 tanto para $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ como para $\text{Cu}_2\text{leumeim}$. El ácido utilizado en cada caso fue el correspondiente al anión utilizado.

6.3.2.3 Estudios mediante RPE

Los estudios mediante RPE se realizaron para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$, tanto en H_2O como en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ y para el sistema $\text{Cu}_2\text{leumeim}$ en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ únicamente. Éstos consistieron en evaluar el efecto del cambio de pH en la señal de RPE producida por el compuesto.

Con la intención de usar condiciones similares a las de las titulaciones potenciométricas se prepararon 5mL de cada una de las disoluciones descritas en la tabla 9 para el sistema $\text{Cu}_2\text{fenmeim}$ y en la tabla 10 para el $\text{Cu}_2\text{leumeim}$, donde se presenta la composición de cada solución así como el procedimiento utilizado para su preparación:

Tabla 9. Disoluciones del sistema Cu₂fenmeim en H₂O y MeOH:H₂O para los estudios mediante RPE.

dis.	Composición	pH en agua	pH en MeOH:H ₂ O	Preparación (10mL totales)		
				mL Cu(NO ₃) ₂ 0.1959M	mL HNO ₃ 0.0994M	mL NaOH 0.1336M
a	1fenmeim + 2Cu(II) + 1H ⁺	2.76	2.55	0.05	0.05	-
b	1fenmeim + 2Cu(II)	3.06	2.72	0.05	-	-
c	1fenmeim + 2Cu(II) + 1OH ⁻	3.82	3.52	0.05	-	0.037
d	1fenmeim + 2Cu(II) + 2OH ⁻	4.51	4.74	0.05	-	0.075
e	1fenmeim + 2Cu(II) + 3OH ⁻	6.21	6.36	0.05	-	0.1123

Tabla 10. Disoluciones del sistema Cu₂leumeim en MeOH:H₂O para los estudios mediante RPE.

dis.	Composición	pH en MeOH:H ₂ O	Preparación (5mL totales)		
			mL Cu(NO ₃) ₂ 0.1542M	mL HNO ₃ 0.1M	mL NaOH 0.1M
a	1leumeim + 2Cu(II) + 1H ⁺	2.77	0.065	0.05	-
b	1leumeim + 2Cu(II)	2.91	0.065	-	-
c	1leumeim + 2Cu(II) + 1OH ⁻	3.26	0.065	-	0.05
d	1leumeim + 2Cu(II) + 2OH ⁻	4.50	0.065	-	0.1
e	1leumeim + 2Cu(II) + 3OH ⁻	6.25	0.065	-	0.15
f	1leumeim + 2Cu(II) + 3OH ⁻	9.4	0.065	-	0.25

En ambos medios las disoluciones se prepararon de la misma manera, lo que cambió fue el disolvente utilizado para alcanzar el aforo.

6.3.2.4 Estudios magnéticos en estado sólido

Las mediciones magnéticas de la muestra cristalina de Cu₂fenmeim con puente imidazolato se realizaron en la “Unitat de Mesures Magnétiques” de la Universidad de Barcelona. El análisis de los resultados fue realizado bajo la asesoría y colaboración de la Dra. Núria Aliaga Alcalde de esta misma institución.

Las mediciones se realizaron en el SQUID en el intervalo de temperaturas de 2 a 300K. El campo magnético utilizado fue de 0.05T para las temperaturas de 2 a 30 K y de 1.0 T para temperaturas de 30 a 300 K. El ajuste de los resultados para obtener los parámetros J y g se hizo en Origin [51], minimizando la función R o factor de ajuste, que se define como:

$$R = \frac{\sum[(\chi_{MT})^{\text{exp}} - (\chi_{MT})^{\text{cal}}]^2}{\sum[(\chi_{MT})^{\text{exp}}]^2}$$

Donde:

χ_M = susceptibilidad molar en $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$

T = temperatura en K

(...)^{exp} = magnitud determinada experimentalmente

(...)^{cal} = magnitud calculada

6.3.2.5 Estudios electroquímicos

El sistema Cu₂fenmeim se estudió mediante voltamperometría cíclica. Para ello se utilizó un arreglo de tres electrodos:

- Como referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl .
- Como electrodo de trabajo se usó uno de carbón vítreo con área de 0.071 cm².
- Para utilizar como electrodo de sacrificio o auxiliar, se construyó un compartimiento con un alambre de platino en la mezcla MeCN:H₂O que se puso en contacto con la disolución de trabajo mediante una punta Vicor.

Los estudios de voltamperometría cíclica se realizaron para dos sistemas distintos:

- a. Cu₂fenmeim 1×10^{-3} M en MeCN:H₂O con pH=7.5, fijado con HEPES 0.1M.
- b. Cu₂fenmeim 1×10^{-3} M en MeCN:H₂O con pH=2.8 (pH natural de la disolución en este medio), sin utilizar amortiguador.

Para cada sistema se trabajó con una ventana de potencial distinta. Para el sistema con pH=7.5, se trabajó de -0.9 a 0.7 V, mientras que para el sistema con pH=2.8 la ventana se amplió al intervalo de -0.9 a 1.1 V. Para ambos sistemas, los voltamperogramas se iniciaron desde el potencial de corriente nula ($E_{i=0}$) y se realizaron a una velocidad de barrido de 100 mV/s. El potencial de inversión ($E_{-λ}$) se varió de 0.1 V en 0.1 V para facilitar la asignación de señales.

Para evitar la presencia de oxígeno, las disoluciones se mantuvieron en una atmosfera de N₂ enriquecido con MeCN:H₂O. Esto para evitar la evaporación del disolvente, pues implica un cambio en la composición del disolvente y en la concentración del soluto.

El procedimiento seguido se presenta a continuación:

1. Preparación de disoluciones:
 - i. Amortiguador: se preparó HEPES 0.2M en H₂O y se mezcló 1:1 con MeCN.
 - ii. Disolución 1x10⁻³M de Cu₂fenmeim en MeCN:H₂O a pH=7.5. Se pesó el ligante y se le añadió la cantidad estequiométrica de Cu(NO₃)₂ estandarizado, se aforó con la mezcla preparada en el paso anterior.
 - iii. Disolución de Cu₂fenmeim en MeCN:H₂O a pH natural. Se pesó el ligante y se le añadió la cantidad estequiométrica de Cu(NO₃)₂ estandarizado, se aforó con MeCN:H₂O. Se midió su pH.
2. Mediciones electroquímicas para cada sistema:
 - i. Se colocaron 5mL de la disolución de trabajo en la celda.
 - ii. Se agitó y se burbujó N₂ enriquecido con MeCN:H₂O.
 - iii. Se detuvo la agitación y el burbujeo y se obtuvo el primer voltamperograma.
 - iv. Luego de cada medición se burbujó la solución y se agitó.
 - v. Se obtuvo toda una secuencia de voltamperogramas variando E_λ.
 - vi. Se sacaron y lavaron los electrodos.
 - vii. Se obtuvo otra vez la secuencia de voltamperogramas hasta que ésta fue reproducible.

6.3.3 Evaluación de la actividad catecolasa

El estudio cinético se realizó tanto para el sistema Cu₂fenmeim como para el sistema Cu₂leumeim, en dos medios distintos: MeOH:H₂O y MeCN:H₂O, controlando la temperatura y manteniéndola constante a 25°C. La actividad catecolasa se evaluó detectando espectrofotométricamente al producto de la reacción: la 3,5-DTBC. Ésta presenta una banda característica con un máximo cercano a 400nm y un coeficiente de absortividad molar $\epsilon=1640\text{cm}^{-1}$ en MeOH:H₂O y $\epsilon=1630\text{cm}^{-1}$ en MeCN:H₂O.

Los experimentos fueron realizados en una celda de cuarzo con paso óptico $l=1\text{cm}$. Para cada determinación se colocaron en la celda 1mL de disolución de amortiguador en agua al pH de interés, 1mL de disolución de Cu₂L en MeOH:H₂O o MeCN:H₂O y 1mL de disolución de 3,5-DTBC en MeOH ó MeCN (las concentraciones de las disoluciones utilizadas se describen más adelante para cada experimento.)

Una vez mezclados los reactivos con la mayor rapidez posible, se obtuvo un espectro UV-vis de la mezcla de reacción cada 0.5s durante un tiempo que varió de 60s a 180s según el sistema evaluado. Se graficó el valor de la absorbancia a 400nm para cada tiempo y se obtuvo un valor de pendiente para la velocidad inicial en unidades de absorbancia/tiempo. Este valor se transformó a unidades de concentración sobre tiempo usando la ecuación de Lambert y Beer que nos dice que $A=\epsilon lC$ (A=absorbancia, ϵ =coeficiente de absortividad molar, l=longitud de paso óptico, C=concentración).

Para cada determinación experimental se obtuvo un valor de velocidad inicial. Con estos valores se construyeron las gráficas de velocidad inicial contra concentración de catalizador o contra concentración de sustrato. El valor que se grafica es el promedio de las mediciones, que se realizaron por triplicado para cada punto, y se presenta junto con la desviación estándar asociada.

A continuación se describen con detalle las condiciones de las determinaciones realizadas para evaluar el efecto de los factores de interés (concentración de sustrato, de catalizador y pH) en la velocidad de la reacción.

6.3.3.1 Efecto de la variación de la concentración de catalizador a distintos valores de pH

La evaluación del efecto de la variación de concentración de catalizador en la velocidad inicial de la reacción de oxidación de 3,5-DTBC, tanto en MeOH:H₂O como en MeCN:H₂O, se realizó en 6 valores distintos de pH: 7, 7.5, 8, 8.5, 9 y 9.5. Estos valores de pH se fijaron en la fase acuosa utilizando los siguientes amortiguadores:

Tabla 11. Amortiguadores utilizados para fijar el pH en la fase acuosa para la evaluación catalítica.

pH	Amortiguador utilizado	pK _a del amortiguador
7	HEPES	7.55
7.5		
8		
8.5	TRIS	8.86
9		
9.5		

Los pasos que se siguieron para llevar a cabo este estudio se detallan a continuación para MeOH:H₂O:

- i. Preparación de disoluciones.

Tabla 12. Concentración de las disoluciones utilizadas para determinar el efecto de la variación de la concentración de catalizador en la velocidad de la reacción en MeOH:H₂O.

Reactivo	Disolvente	Concentración en disolución (M)	Concentración en celda (M)
Amortiguador*	H ₂ O	0.3	0.1
3,5-DTBC**	MeOH	1.8×10^{-2}	6×10^{-3}
Cu ₂ L	MeOH:H ₂ O	3×10^{-5}	1×10^{-5}
		6×10^{-5}	2×10^{-5}
		9×10^{-5}	3×10^{-5}
		1.2×10^{-4}	4×10^{-5}
		1.5×10^{-4}	5×10^{-5}
		1.8×10^{-4}	6×10^{-5}

*Se hizo toda la serie de experimentos para cada uno de los valores de pH antes mencionados, por lo que el amortiguador utilizado cambió dependiendo del experimento.

**Las disoluciones de DTBC se hicieron con suma precaución, utilizando material sumergido por días en EDTA y enjuagado con agua destilada para evitar la presencia de cualquier traza de cobre, así como evitando la exposición de la disolución a la luz. Todo esto, para prevenir la oxidación del reactivo previa al experimento.

- ii. Obtención del blanco en el espectrofotómetro. Éste se obtuvo colocando en la celda 1mL del amortiguador utilizado + 1mL de MeOH + 1mL de MeOH:H₂O.
- iii. Determinaciones cinéticas. Como ya se explicó anteriormente, se mezclan en la celda 1mL del amortiguador + 1mL de la solución de Cu₂L y se añade con rapidez 1mL de DTBC. La mezcla se agita rápidamente y se comienzan las mediciones de espectros cada 0.5s durante 60 a 180 segundos.
- iv. Tratamiento de los datos obtenidos. El tratamiento que se le da a cada serie de datos de absorbancia contra tiempo obtenidos es el que ya fue detallado al inicio de la descripción de los estudios cinéticos.

El procedimiento seguido en MeCN:H₂O es el mismo que el descrito en MeOH:H₂O, lo único que varía son las concentraciones de las disoluciones utilizadas, éstas se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 13. Concentración de las disoluciones utilizadas para determinar el efecto de la variación de la concentración de catalizador en la velocidad de la reacción en MeCN:H₂O.

Reactivo	Disolvente	Concentración en disolución (M)	Concentración en celda (M)
Amortiguador*	H ₂ O	0.3	0.1
3,5-DTBC**	MeCN	6x10 ⁻³	2x10 ⁻³
Cu ₂ L	MeCN:H ₂ O	3x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵
		6x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁵
		9x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁵
		1.2x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁵
		1.5x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵
		1.8x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁵

*, ** ver notas de la tabla 12

6.3.3.1 Efecto de la variación del pH

Para determinar el efecto del pH en la velocidad de la reacción catalizada se hicieron dos series de medidas en cada medio: primero se evaluó el efecto del pH del medio sin catalizador en la velocidad de la reacción y posteriormente el efecto del pH con catalizador.

Para llevar a cabo esta serie de experimentos se siguieron los pasos descritos previamente, pero esta vez se varió el pH manteniendo la concentración de 3,5-DTBC y de catalizador (en la serie de la reacción catalizada) constantes. En la serie de mediciones donde no se utilizó catalizador se adicionó, en su lugar, 1mL de la mezcla de disolventes para no alterar las concentraciones en celda. Las tablas 14 y 15 detallan las concentraciones utilizadas para esta evaluación en cada medio.

Tabla 14. Concentración de las disoluciones utilizadas para determinar el efecto de la variación del pH en la velocidad de la reacción en MeOH:H₂O.

Reactivo		Disolvente	Concentración en disolución (M)	Concentración en celda (M)
Cu ₂ L		MeOH:H ₂ O	9x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁵
3,5-DTBC**		MeOH	6x10 ⁻³	2x10 ⁻³
Amortiguador	MES pH=5.5	H ₂ O	0.30	0.10
	MES pH=6.0			
	MES pH=6.5			
	HEPES pH=7.0			
	HEPES pH=7.5			
	HEPES pH=8.0			
	TRIS pH=8.5			
	TRIS pH=9.0			
TRIS pH=9.5				

** ver notas de la tabla 12

Tabla 15. Concentración de las disoluciones utilizadas para determinar el efecto de la variación del pH en la velocidad de la reacción en MeCN:H₂O.

Reactivo		Disolvente	Concentración en disolución (M)	Concentración en celda (M)
Cu ₂ L		MeCN:H ₂ O	9x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴
3,5-DTBC**		MeCN	6x10 ⁻²	2x10 ⁻²
Amortiguador	MES pH=5.5	H ₂ O	0.30	0.10
	MES pH=6.0			
	MES pH=6.5			
	HEPES pH=7.0			
	HEPES pH=7.5			
	HEPES pH=8.0			
	TRIS pH=8.5			
	TRIS pH=9.0			
TRIS pH=9.5				

** ver notas de la tabla 12

6.3.3.2 Efecto de la variación de la concentración de sustrato

Este estudio se realizó únicamente a pH=8.5 en ambos medios. Este pH se eligió luego de analizar los datos de la variación de catalizador a distintos valores de pH y también para poder comparar con los resultados de nuestro grupo que en general se han realizado a estas condiciones.

Los pasos seguidos son los mismos que los descritos anteriormente, lo que cambió fueron las concentraciones de los reactivos utilizados y, evidentemente, que en este caso la concentración de Cu₂L se mantuvo constante y lo que se varió de un punto a otro fue la concentración de 3,5-DTBC. Las concentraciones usadas para el estudio en MeOH:H₂O se presentan en la tabla 16 y para MeCN:H₂O en la 17. El procedimiento utilizado es el mismo que el descrito previamente.

Tabla 16. Concentración de las disoluciones utilizadas para determinar el efecto de la variación de la concentración de sustrato en la velocidad de la reacción en MeOH:H₂O.

Reactivo	Disolvente	Concentración en disolución (M)	Concentración en celda (M)
HEPES pH=8.5	H ₂ O	0.45	0.15
Cu ₂ L	MeOH:H ₂ O	3x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵
3,5-DTBC**	MeOH	3x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
		6x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴
		9x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴
		1.2x10 ⁻³	4x10 ⁻⁴
		1.5x10 ⁻³	5x10 ⁻⁴
		1.8x10 ⁻³	6x10 ⁻⁴
		2.1x10 ⁻³	7x10 ⁻⁴
		3x10 ⁻³	1x10 ⁻³
		4.5x10 ⁻³	1.5x10 ⁻³
		6x10 ⁻³	2x10 ⁻³
7.5x10 ⁻³	2.5x10 ⁻³		

** ver notas de la tabla 12

Tabla 17. Concentración de las disoluciones utilizadas para determinar el efecto de la variación de la concentración de sustrato en la velocidad de la reacción en MeCN:H₂O.

Reactivo	Disolvente	Concentración en disolución (M)	Concentración en celda (M)
HEPES pH=8.5	H ₂ O	0.45	0.15
Cu ₂ L	MeCN:H ₂ O	6x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁵
3,5-DTBC**	MeCN	1.8x10 ⁻³	6x10 ⁻⁴
		2.7x10 ⁻³	9x10 ⁻⁴
		3.6x10 ⁻³	1.2x10 ⁻³
		6x10 ⁻³	2x10 ⁻³
		9x10 ⁻³	3x10 ⁻³
		1.5x10 ⁻²	5x10 ⁻³
		3x10 ⁻²	1x10 ⁻²
		6x10 ⁻²	2x10 ⁻²
		9x10 ⁻²	3x10 ⁻²

** ver notas de la tabla 12

Capítulo 7. Referencias

- [1] Rayner-Canham, G. *Química inorgánica descriptiva, 2da. ed.*; Pearson Educación: México D.F., 2000.
- [2] Fontecave, M.; Eklund, H. Oxidations by copper metalloenzymes and some biomimetic approaches *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 170, 125-140.
- [3] Koval, I.A.; Gamez, P.; Belle, C.; Selmeczi, K.; Reedijk, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mecanistic studies *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 814-840.
- [4] Minaev, B.F.; Minaeva, V.A. Spin-dependent binding of dioxygen to heme and charge-transfer mechanism of spin-orbit coupling enhacement *Ukranica Bioorganica Acta* **2008**, 2, 56-64.
- [5] Prabhakar, R.; Siegbahn, P.E.M; Minaev B.F. A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase *Biochimica et Biophysica Acta* **2003**, 1674,173-178.
- [6] Fenton, D.E. *Biocoordination Chemistry*; Oxford Chemistry Primers: Oxford, 1995.
- [7] Koval, I.A.; Selmeczi, K.; Belle, C.; Philouze, C.; Saint-Aman, E.; Gautier-Luneau, I.; Schuitema, A.M.; van Vilet, M.; Gamez, P.; Roubeau, O.; Lüken, M.; Krebs, B.; Lutz, M.; Spek, A.L.; Pierre, J.L.; Reedijk, J. Catecholase Activitiy of a Copper(II) Complex with a Macrocyclic Ligand: Unraveling Catalytic Mechanisms *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6138-6150.
- [8] Born, K.; Comba, P.; Daubinet, A.; Fuchs, A.; Wadepohl H. Catecholase activity of dicopper(II)-bispidine complexes: stabilities and structures of intermediates, kinetics and reaction mechanism *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, 36-48.
- [9] Belle, C.; Selmeczi, K.; Torelli, S.; Pierre J.L. Chemical Tools for mechanistic studies related to catechol oxidase activity *C.R. Chimie* **2007**, 10, 271-283.

- [10] Gichinga, M.G.; Striegler, S. Effect of Water on the Catalytic Oxidation of Catechols *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5150-5156.
- [11] Granata, A.; Monzani, E.; Castella, L. Mechanistic insight into the catechol oxidase activity by a biomimetic dinuclear copper complex *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 903-913.
- [12] Mendoza-Quijano, M. R., Complejos de cobre(II) con ligantes derivados del imidazol con actividad catecolasa. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2010.
- [13] Sosa-Reyes, A. M., 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, México D.F., 2006.
- [14] Stryer, L.; Berg, J.M.; Tymoczko, J. L. *Bioquímica, 5a ed.*; Reverté: Barcelona, 2003.
- [15] Mannich, C. Synthesis of beta-ketonic bases *J. Chem. Soc. Abstracts* **1917**, 112,634.
- [16] Stocker, F.B.; Kurtz, J.L.; Gilman, B.L; Forsyth, D.A. The Mannich Reaction of Imidazoles *Journal of Organic Chemistry* **1970**, No.4, 35,883-887.
- [17] Olguín-Talabera, J.L. Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol y aminas. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2003.
- [18] Solís-Membrillo, I. A. Estudio de las propiedades electroquímicas y catalíticas de complejos dinucleares de cobre(II). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2006.
- [19] Zerón-Espinosa, P. G. Estudio de un complejo dinuclear de cobre (II) con un ligante derivado de 2-metilimidazol y etanolamina. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2010.

[20] Mijangos-Aranda, E. E. Interacción de Cu^{2+} con el ligante 2-metil-bis-4,5-(metil-N-alanil)-imidazol. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2001.

[21] Strothkamp, K.G.; Lippard, S.J. Chemistry of the imidazolate-bridged bimetallic center in the copper-zinc superoxide dismutase and its model compounds *Acc. Chem. Res.* **1982**, 10, 318-326.

[22] Coughlin, P.K.; Lippard S.J. Magnetic, ESR, Electrochemical, and Potentiometric Titration Studies of the Imidazolato-Bridged Dicopper(II) Ion in a Binucleating Macrocyclic *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1446-1451.

[23] Ohtsu, H.; Shimazaki, Y.; Odani, A.; Yamauchi, O.; Mori, W.; Itoh, S.; Fukuzumi, S. Synthesis and Characterization of Imidazolato-Bridged Dinuclear Complexes as Active Site Models of Cu-Zn-SOD *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5733-5741.

[24] Tabbi, G.; Driessen, W.L.; Reedijk, J.; Bonomo, R.P.; Veldman, N.; Spek, A.L. High Superoxide Dismutase Activity of a Novel, Intramolecular Imidazolato-Bridged Asymmetric Dicopper(II) Species. Design, Synthesis, Structure, and Magnetism of Copper(II) Complexes with a Mixed Pyrazole-Imidazole Donor Set *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 1168-1175.

[25] Li, D.; Li, S.; Yang, D.; Yu, J.; Huang, J.; Li, Y.; Tang, W. Syntheses, Structures, and Properties of Imidazolato-Bridged Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) Dinuclear Complexes of a Single Macrocyclic Ligand with Two Hydroxyethyl Pendants *Inorg. Chem.* **2003**, 19, 42,6071-6080.

[26] Luna-Ramírez, K.S. Compuestos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol y aminoácidos, Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2003.

- [27] Sosa, A.M.; Ugalde-Saldivar, V.M.; González, I.; Gasque, L. Electrochemical studies of a dinuclear copper complex with imidazole derivative ligand H₃bphenim *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 579, 103-111.
- [28] Patel, R.N.; Singh, N.; Shukla, K.K.; Chauhan, U.K. Novel copper(II)-dien-imidazole/imidazolate-bridged copper(II) complexes. Crystal structure of [Cu(dien)(Him)](ClO₄)₂ and of [(dien)Cu(m-im)Cu(dien)](ClO₄)₃, a homonuclear model for the copper(II) site of the CuZn-superoxide dismutase *Spectrochimica Acta Part A* **2005**, 61, 287-297.
- [29] Gonzalez-Sebastián, L. Estructura y reactividad del complejo dinuclear de Cu(II) con un ligante derivado de imidazol y piridina. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2005.
- [30] Mijangos-Aranda, E.E. Estudio estructural, magnético y catalítico de sistemas polinucleares de Cu con ligantes derivados de imidazol y aminoácidos. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2008.
- [31] Ayres, G.H. *Análisis químico cuantitativo*; Oxford University Press: México D.F., 2001.
- [32] Harris, D.C. *Análisis Químico Cuantitativo, 2a ed.*; Editorial Reverté: Barcelona, 2001.
- [33] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs *Talanta* **1996**, 43, 1739-1753.
- [34] Mussini, T.; Longhi, P.; Marcolungo, I.; Mussini, P.R.; Rondinini, S. Status and problems of standarization of pH scales for controls in different media. Reference value standards in ethylene glycol/water mixed solvents *Fresenius J Anal Chem* **1991**, 339, 608-612.

- [35] Mussini, T.; Covington, A.K.; Dal Pozzo, F.; Longhi, P.; Rondinini, S.; Zou, Z.-Y. Determination of standard pH values for potassium Hydrogen Phthalate reference buffer solutions in 10, 20, 50, 64 and 84.2 wt per cent methanol/water mixed solvents at temperatures from 283.15 to 313.15 K *Electrochimica Acta* **1983**, 11, 28, 1593-1598.
- [36] Avdeef, A.; Comer, J.E.A.; Thomson, S.J. pH-metric log P. 3. Glass Electrode Calibration in Methanol-Water, Applied to pKa Determination of Water-Insoluble Substances *Anal. Chem.* **1993**, 65, 42-49.
- [37] Mussini, T.; Covington, A.K.; Longhi, P.; Rondinini, S. Criteria for standardization of pH measurements in organic solvents and water + organic solvent mixtures of moderate to high permittivities *Pure and Appl. Chem.* **1985**, 6, 57.
- [38] Rondinini, S.; Mussini, P.R.; Mussini, T. Reference value standards and primary standards for pH measurements in organic solvents and water + organic solvents mixtures of moderate to high permittivities *Pure and Appl. Chem.* **1987**, 11, 59, 1549-1560.
- [39] Gómez-Zaleta, B. Determinación de las constantes de acidez de la magniferina y su interacción con algunos iones metálicos en medio acuoso. Tesis de doctorado, UAM, México DF, 2006.
- [40] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principles of Instrumental Analysis, 5^a ed.; Brookes/ Cole, Belmont CA, 1998.
- [41] Puigdomenech, I. *MEDUSA* (Making Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms) versión 2009. <http://www.kemi.kth.se/medusa/> (accesado en mayo de 2009).
- [42] Yuan, Q.; Cai, K.; Qi, Z.-P.; Bai, Z.-S.; Su, Z.; Sun, W.-Y. Imidazolate-bridged dicopper(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of macrocyclic ligand with methylimidazol pendants: Model study of copper(II)-zinc(II) superoxide dismutase *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, 103, 1156-1161.

[43] Alves, W.A.; Bagatin, I.A.; Da Costa-Ferreira, A.M. Equilibria and tyrosinase activity of a dinuclear and its analogous tetranuclear imidazolato-bridged copper(II) complexes *Inorganica Chimica Acta* **2001**, 321, 11-21.

[44] Yang, D.-X.; Li, S.-A.; Li, D.-F.; Chen, M.; Huang, J.; Tang, W.X. Synthesis, structure and properties of an imidazolate-bridged dicopper complex of a novel macrocycle with two alcohol-pendants as an active site model of Cu,Zn-SOD *Polyhedron* **2003**, 22, 925-932.

[45] Kahn, O. *Molecular Magnetism*; VCH Publishers: Weinheim, 1993.

[46] O'Young, C.-L.; Dewan, J.C.; Llienthal, H.R.; Lippard, S.J. Electron Spin Resonance, Magnetic and X-ray Cristallographic Studies of a Binuclear, Imidazolate Bridged Copper(II) Complex, $[(TMDT)_2Cu_2(im)(ClO_4)_2](ClO_4)$ *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100:23,

[47] Addison, A.W.; Rao, T.N.; Reedijk, J.; Rijn, J.V.; Verschoor, G.C. Synthesis, structure and spectroscopic Properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands. *J. Chem. Soc. : Dalton Trans.* **1984**, 1349.

[48] Logan, S.R. *Fundamentos de cinética química*; Addison Wesley: Madrid, 2000.

[49] Reichardt, C. *Solvents and solvent effect in organic chemistry*; VCH: Nueva York, 1990.

[50] Jensen, W.B. *The Lewis Acid-Base concepts. An overview*; Willey & Sons: Nueva York, 1980.

[51] *ORIGINPRO, versión 8.0*; OriginLab Corporation, 2005.