



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ACTIVIDAD CATALÍTICA DE COMPLEJOS MONONUCLEARES DE
Cu(II) CON LIGANTES TRIDENTADOS (NNN) CONTENIENDO
GRUPOS IMIDAZOL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO

PRESENTA

JORGE RUVALCABA JUÁREZ

ASESORA
DRA. LAURA MARÍA GASQUE SILVA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** GASQUE SILVA LAURA MARIA
VOCAL: **Profesor:** GRACIA MORA JESUS
SECRETARIO: **Profesor:** BARQUERA LOZADA JOSE ENRIQUE
1er. SUPLENTE: **Profesor:** CHIKEN SORIANO ANAI
2° SUPLENTE: **Profesor:** MENDIENTA MARTINEZ ALAN ULISES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB 216, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, DTO. QUÍMICA INORGÁNICA Y
NUCLEAR, EDIFICIO B, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESORA

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Laura Maria Gasque Silva

M. en C. Alan Ulises Mendieta Martinez

SUSTENTANTE

Jorge Ruvalcaba Juárez

Agradecimientos

Al subprograma 127 “Formación básica en Investigación”, por el apoyo económico para la conclusión de este trabajo.

A la Dra. Laura Gasque, por su apoyo, su tiempo y su paciencia, así como por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. ¡Muchas gracias!

A la Facultad de Química, por todo lo aprendido dentro y fuera de sus aulas y por las maravillosas amistades que me otorgó.

A la UNAM, mi segunda casa desde la preparatoria, por brindarme la grandiosa oportunidad de lograr mi sueño de ser un profesionalista.

Al M. en C. Alan Mendieta, por su apoyo en la realización y revisión de este trabajo.

A la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) por los análisis espectroscópicos realizados.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes que nutren el trabajo realizado.

A mis compañeras del Lab 216: Brenda y Zandalie, por los buenos momentos y el apoyo brindado en los malos. Siempre encontrarán un amigo en mí.

A mis profesores, por todo lo compartido sobre la Química y la vida.

Dedicatorias

A mis padres, Ma. de Lourdes y Jorge, quienes a lo largo de mi vida han sido los máximos promotores de todos mis sueños, gracias por su confianza, por su eterno amor, su dedicación y por acompañarme en este largo proceso. Agradezco todos los días que estuvieron disponibles para escucharme y aconsejarme, cuando ya no podía más. Son lo que más amo en la vida, y lo que he logrado hasta hoy, se los debo a ustedes. Esta tesis es reflejo y resultado de su compromiso como padres. Gracias por tanto.

A mi hermana Fernanda, que durante esta pandemia se ha convertido en mi confidente y de mis mejores amigas; que nadie te diga que no puedes. Te amo.

A mis amigos, Eunice, David, Pamela y Yaz, que a pesar de la distancia y las complicaciones han estado ahí para apoyarme en todo momento, por su paciencia, palabras de aliento y amistad incondicional, gracias.

A mis colegas y grandes amigas, Wendy y Ángela, por todo su apoyo, en especial en esta última etapa tan difícil, por todos los desayunos y comidas en el “kioskito” y en el “B”, por sus consejos y ánimos; las abrazo en la distancia.

A Diego, que me ha dado inspiración y que por sus cualidades completó mi vida, por ser un impulsor y excelente compañía en la vida; por esto y lo que ya sabes.

Abreviaturas

β	Constante de formación global
δ	Desplazamiento químico
ε	Coefficiente de absortividad molar
λ_{\max}	Longitud de onda máxima
[Cu ₂ L]	Complejo dinuclear de cobre (II)
[CuL]	Complejo mononuclear de cobre (II)
AE	Análisis elemental
AS	Alto espín
BS	Bajo espín
CHES	Ácido <i>N</i> -ciclohexil-2-aminoetanosulfónico
<i>diep</i>	5,11-bis(piridin-2-ilmetil)-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidrodiimidazol[4,5- <i>c</i> :4',5'- <i>h</i>][1,6]diazecina
<i>dimp</i>	5,11-bis(2-(piridin-2-il)etil)-1,4,5,6,7,10,11,12-ocahidrodiimidazol[4,5- <i>c</i> :4',5'- <i>h</i>][1,6]diazecina
DTBC	3,5-ditercbutilcatecol
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
IR	Infrarrojo
k_{cat}	Constante catalítica o número de recambio
K_M	Constante de Michaelis-Menten
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolin)etanosulfónico
<i>miep</i>	N-((2-etil-4-metil-1H-imidazol-5-il)metil)-N-metil-2-(piridin-2-il)etan-1-amina
<i>mimp</i>	1-(2-etil-4-metil-1H-imidazol-5-il)-N-metil-N-(piridin-2-ilmetil)metanamina
OAP	<i>o</i> -aminofenol
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
V_0	Velocidad inicial
V_{\max}	Velocidad máxima

Índice

Abreviaturas	I
Índice	1
Resumen	3
1. Marco teórico	4
1.1. Química de coordinación del cobre	4
1.1.1. Química del cobre (I)	4
1.1.2. Química del cobre (II)	5
1.1.3. Hidrólisis del cobre	8
1.2. Cobre en sistemas biológicos	9
1.2.1. Enzimas de cobre y su actividad catalítica	11
1.3. Sistemas modelo	15
1.4. Reacción de Mannich en imidazoles	18
2. Antecedentes	20
2.1. Ligantes derivados de imidazol	20
2.2. Complejos de cobre (II) con ligantes derivados de imidazol	24
2.2.1. Propiedades estructurales y electrónicas	25
2.2.2. Equilibrios en disolución	27
2.3. Estudios cinéticos	28
2.3.1. Actividad catecol oxidasa	28
2.3.2. Actividad fenoxazinona sintasa	31
2.4. Especiación como herramienta para la mejora en la eficiencia catalítica	34
3. Objetivos	37
3.1. Objetivo general	37
3.2. Objetivos particulares	37
4. Hipótesis	38
5. Resultados y discusión	39
5.1. Síntesis y caracterización del ligante miep	39
5.1.1. Síntesis del ligante miep y mimp	39
5.1.2. Análisis elemental	40
5.1.3. Espectroscopía infrarrojo	41
5.1.4. RMN- ¹ H	43
5.2. Caracterización de los complejos [CuL]	48
5.2.1. Síntesis de los complejos [Cu(miep)(NO ₃) ₂] y [Cu(mimp)(NO ₃) ₂]	48
5.2.2. Análisis elemental	48
5.2.3. Espectroscopía IR	49

5.2.4. Difracción de rayos X	52
5.3. Especiación en disolución de los sistemas L/[CuL]	55
5.3.1. Determinación de las constantes de acidez (pK_a)	55
5.3.2. Determinación de las constantes de formación e hidrólisis del complejo [CuL] ²⁺	60
5.4. Estudios cinéticos de los complejos [Cu(miep)] ²⁺ y [Cu(mimp)] ²⁺	65
5.4.1. Variación de la velocidad inicial en función del pH	66
5.4.2. Variación de la velocidad inicial en función de la concentración del catalizador	68
5.4.3. Variación de la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato	71
6. Conclusiones	78
7. Parte experimental	80
7.1. Síntesis del ligante miep	80
7.2. Síntesis del ligante mimp	80
7.3. Síntesis del complejo [Cu(miep)(NO ₃) ₂]	80
7.4. Síntesis del complejo [Cu(mimp)(NO ₃) ₂]	81
7.5. Equilibrios en disolución	81
7.5.1. Preparación y estandarización de solución estándar de NaOH	81
7.5.2. Preparación y estandarización de solución estándar de HNO ₃	81
7.5.3. Preparación de solución patrón de Cu ²⁺	82
7.5.4. Determinación de pK_a s	82
7.5.5. Determinación de $\log\beta$	82
7.6. Actividad catalítica	83
7.6.1. Variación de la velocidad inicial en función del pH	83
7.6.2. Variación de la velocidad inicial en función del catalizador	84
7.6.3. Variación de la velocidad inicial en función del sustrato	85
8. Bibliografía y referencias	86

Resumen

El cobre es el tercer metal del bloque d más abundante en los sistemas vivos, dicho catión metálico se encuentra coordinado a residuos imidazólicos de histidina, por lo que la mayoría de los sistemas modelo que se han propuesto contienen ligantes de naturaleza heteroaromática.

En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron dos ligantes tridentados que contienen un grupo imidazol, un grupo piridínico y una amina terciaria; dichos ligantes se utilizaron para la síntesis de complejos bioinspirados de cobre (II), los cuales se caracterizaron en estado sólido mediante técnicas convencionales. Además, se determinaron los valores de pK_a de uno de los ligantes y las constantes de formación e hidrólisis del complejo correspondiente.

Finalmente, se evaluó la actividad Fenoxazinona sintasa de ambos complejos frente a la reacción de acoplamiento oxidativo del *o*-aminofenol a distintos valores de pH empleando el modelo de Michaelis-Menten, elucidando que la estructura y los equilibrios en disolución presentan un papel importante en su actividad catalítica.

1. Marco teórico

1.1. *Química de coordinación del cobre*

El cobre es uno de los elementos más abundantes de la tierra, su abundancia relativa en la corteza terrestre es del 0.0055% y puede presentarse como óxidos, sulfuros y carbonatos.¹ Su extracción se realiza mediante procesos de reducción y purificación vía métodos electroquímicos.

Se posiciona en el grupo 11, período 4 y su configuración electrónica es [Ar] 3d¹⁰4s¹, es un típico elemento de transición y puede presentar distintos estados de oxidación; estos iones pueden formar fácilmente complejos, dando lugar a una gran variedad de compuestos de coordinación.² Este elemento, junto con la plata y el oro, forma la familia “del cobre”.

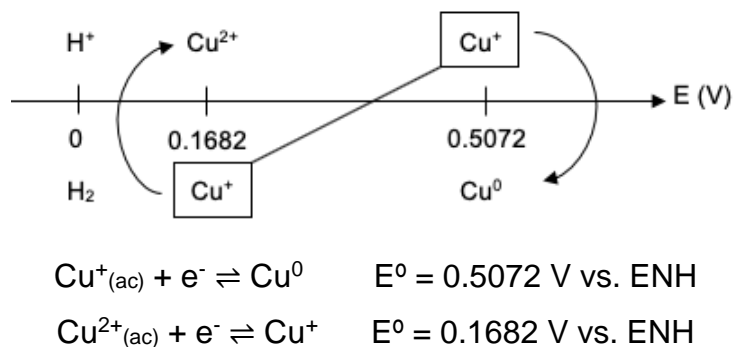
Los estados de oxidación de cobre van desde (0) hasta (IV), siendo los más comunes (I) y (II). Los compuestos en los que el estado de oxidación es (0) y (IV) son muy poco frecuentes, al igual que el estado de oxidación (III), aunque de este último existen reportes de su participación en algunos procesos biológicos.^{3,4}

El Cu(II) es el más estable en condiciones normales (medio acuoso, presencia de O₂, etc.), dando paso a compuestos simples y de coordinación, mientras que la química de Cu(I) es menos extensa, oxidándose fácilmente a Cu(II).²

1.1.1. Química del cobre (I)

Los compuestos de Cu(I) actúan como ácidos blandos de acuerdo con la teoría de Pearson ABDB⁵; en general, el cobre (I) puede formar diversos compuestos de coordinación con los haluros predominando los iones Cl⁻, Br⁻ y I⁻. Además, para Cu(I) existen también una amplia variedad de compuestos con ligantes que contienen P y/o S como átomos donadores.

La estabilidad relativa de Cu(I) en disolución acuosa se explica mediante los siguientes valores de potencial estándar de reducción y planteando la correspondiente escala de potencial:



De acuerdo con dicha escala, se presenta la reacción de dismutación de Cu(I) en agua así como su correspondiente valor de K_{dis} :



Por tanto, en disolución acuosa únicamente pueden existir mínimas cantidades de Cu^+ libre, debido a su tendencia a dismutar a Cu^{2+} y Cu^0 . Sin embargo, esta estabilidad puede modificarse al estar presentes distintos ligantes que den lugar a complejos de Cu(I) más estables. Un ejemplo, el caso del acetonitrilo, cuyas moléculas solvatan muy fácilmente al Cu(I) estabilizándolo así con respecto al Cu(II), que se vuelve más oxidante que en agua.^{3, 4, 5}

Los complejos de Cu(I) son diamagnéticos y, debido a que no existen transiciones d-d, son en su mayoría incoloros; sin embargo, debido a los ligantes, pueden presentar colores a causa de bandas de transferencia de carga.

En estos compuestos, generalmente predomina el número de coordinación 4, siendo la geometría tetraédrica la más común⁶⁻⁸. Los números de coordinación 2 y 3, correspondientes a la geometría lineal y trigonal plana respectivamente, también son posibles^{9, 10}, aunque su frecuencia es mucho menor.

1.1.2. Química del cobre (II)

El estado de oxidación II es el más estable y común de este elemento. Generalmente, los compuestos de Cu(II) son paramagnéticos y son de color azul o verde¹¹, también pueden presentar color rojo o marrón debido fundamentalmente a bandas de transferencia de carga en su espectro visible.

Al igual que la mayoría de los cationes metálicos divalentes de la primera serie de transición, el Cu(II) forma fácilmente complejos con una gran variedad de ligantes, predominando los números de coordinación 4, 5 y 6. Sin embargo, estos complejos presentan múltiples distorsiones con respecto a las geometrías regulares.^{5,12} Esto se debe a que su estereoquímica está fuertemente influenciada por la distorsión de Jahn-Teller, que se define como una distorsión geométrica de un sistema molecular no lineal que reduce la simetría y energía del sistema.¹³ Existen dos tipos de distorsión en una geometría octaédrica: la elongación y la compresión.

Para explicar la distorsión de elongación, consideremos un complejo octaédrico ML_6 al cual, los dos ligantes sobre el eje z se han alejado con respecto al metal central. Al hacerlo, han reducido la interacción con los orbitales d del metal que tienen una componente en z , o sea, d_{z^2} , d_{xz} y d_{yz} . Como resultado, estos orbitales se estabilizan. Por otro lado, los orbitales que carecen de componente en z , que son $d_{x^2-y^2}$ y d_{xy} ,¹³ aumentarán en energía de acuerdo con la figura 1.1.2.1.

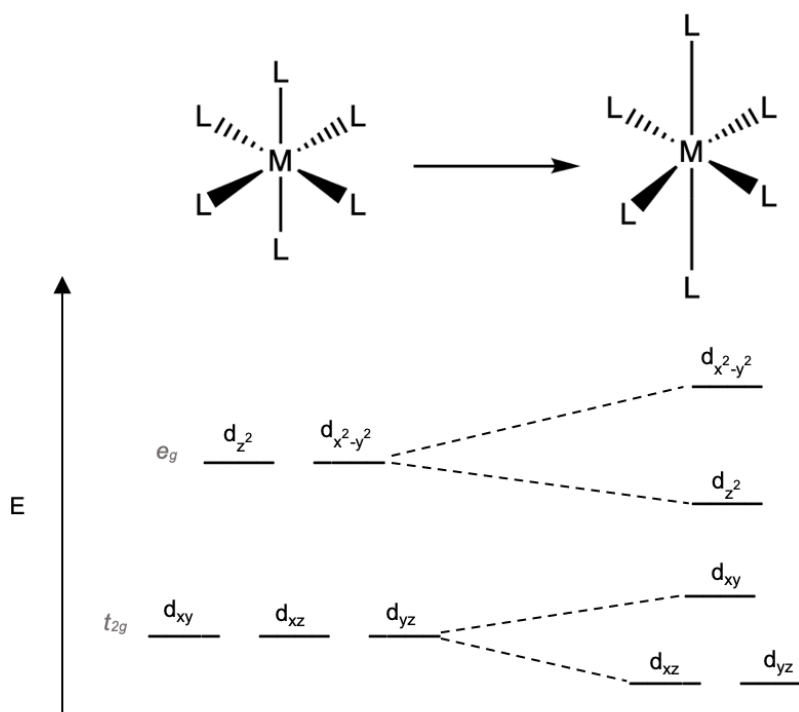


Fig. 1.1.2.1. Ilustración de la distorsión de elongación de un complejo octaédrico.

Para el caso de la distorsión de compresión, consideremos nuevamente un complejo octaédrico ML_6 , al cual, los cuatro ligantes sobre los ejes x e y se han

alejado con respecto al metal central. Al hacerlo, han reducido la interacción con los orbitales d del metal que tienen componentes directamente en x e y , o sea, $d_{x^2-y^2}$ y d_{xy} . Como resultado, estos orbitales se estabilizan. Por otro lado, los orbitales que carecen de componente directamente en x e y , que son d_{z^2} , d_{yz} y d_{xz} ¹³ aumentarán en energía de acuerdo con la figura 1.1.2.2.

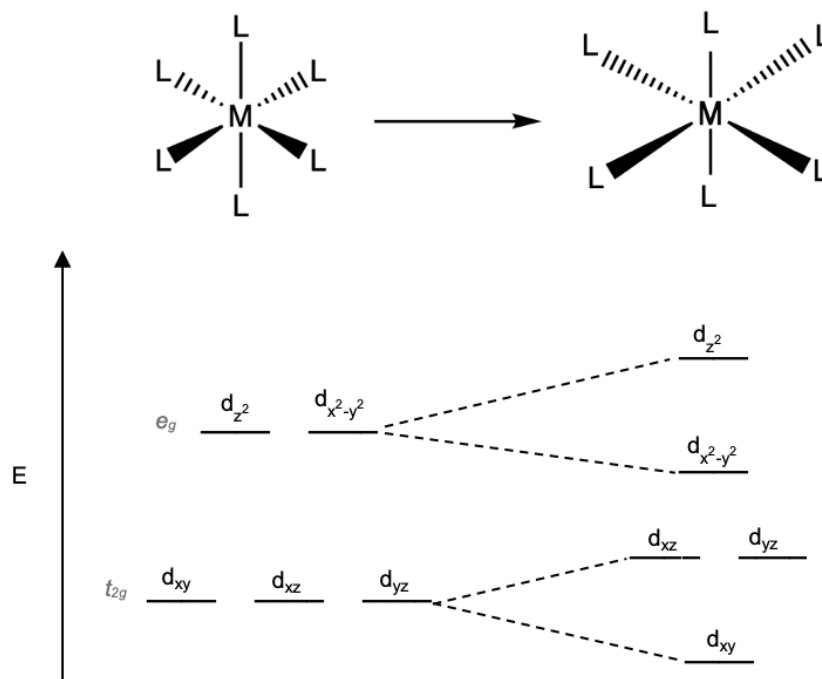


Fig. 1.1.2.2. Ilustración de la distorsión de compresión de un compuesto octaédrico.

El efecto Jahn-Teller se manifiesta de acuerdo a la configuración electrónica y las propiedades magnéticas (alto o bajo espín) que los complejos metálicos presenten, de acuerdo a la tabla 1.1.2.1.

Tabla 1.1.2.1. Presencia del efecto Jahn-Teller en compuestos octaédricos de acuerdo a su configuración electrónica y sus propiedades magnéticas (alto o bajo espín).

Dicho efecto no predice el tipo de distorsión que se presentara, solo indica que el centro de simetría se conserva.

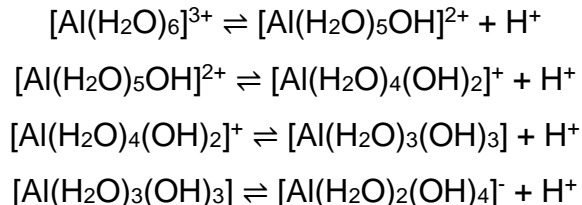
d^n	1	2	3	4		5		6		7		8	9	10
Prop. Magnéticas (AS/BS)				AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS			
Efecto Jahn-Teller	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	No

Las geometrías más comúnmente observadas en los complejos de Cu(II) hexacoordinados son: la octaédrica con elongación tetragonal^{14,15} o rómbica^{16,17}. En el caso de los complejos con número de coordinación 5, predomina la geometría de pirámide de base cuadrada con elongación tetragonal unida a una distorsión trigonal en el plano base de la pirámide así como la geometría bipirámide trigonal, frecuentemente distorsionada hacia una pirámide de base cuadrada.¹⁸⁻²⁰

Por último, la geometría asociada a un número de coordinación 4 suele ser tetraédrica comprimida^{21,22} o bien plano cuadrada^{23,24}, pudiendo en este último caso presentar una pequeña distorsión tetraédrica.

1.1.3. Hidrólisis del cobre

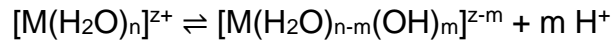
Brönsted estudió cuantitativamente los equilibrios ácido-base en solución acuosa y formuló la hipótesis de que los iones metálicos con estado de oxidación relativamente elevado, participan en una serie de reacciones de hidrólisis consecutivas, por ejemplo:



Hoy en día no existe la menor duda de que las soluciones fuertemente ácidas contienen iones monómeros hidratados tales como el $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ y que en el caso de iones centrales anfóteros, en solución fuertemente alcalina, los aniones son monómeros tales como el $[\text{Sn}(\text{OH})_6]^{2-}$.²⁶

La acidez de los cationes metálicos se interpreta de forma más general en términos de acidez de Lewis. La disolución de un soluto en un disolvente tiene como fuerza motriz las interacciones estabilizantes que se establecen entre las moléculas o iones del soluto y las moléculas del disolvente. El cambio producido cuando el agua se combina con otra sustancia, sin que los enlaces del agua experimenten ruptura, se denomina reacción de hidratación. Por otro lado, el cambio producido cuando en una reacción con agua se rompe un enlace

hidrógeno-oxígeno se le denomina hidrólisis. Los hidratos frecuentemente experimentan reacciones de hidrólisis de acuerdo al siguiente equilibrio: ²⁵



A continuación, se muestra un diagrama de fracción molar distributiva para los hidroxocomplejos de Cu(II) en función del pH; estos diagramas resultan de gran importancia para el estudio del predominio de especies en disolución.

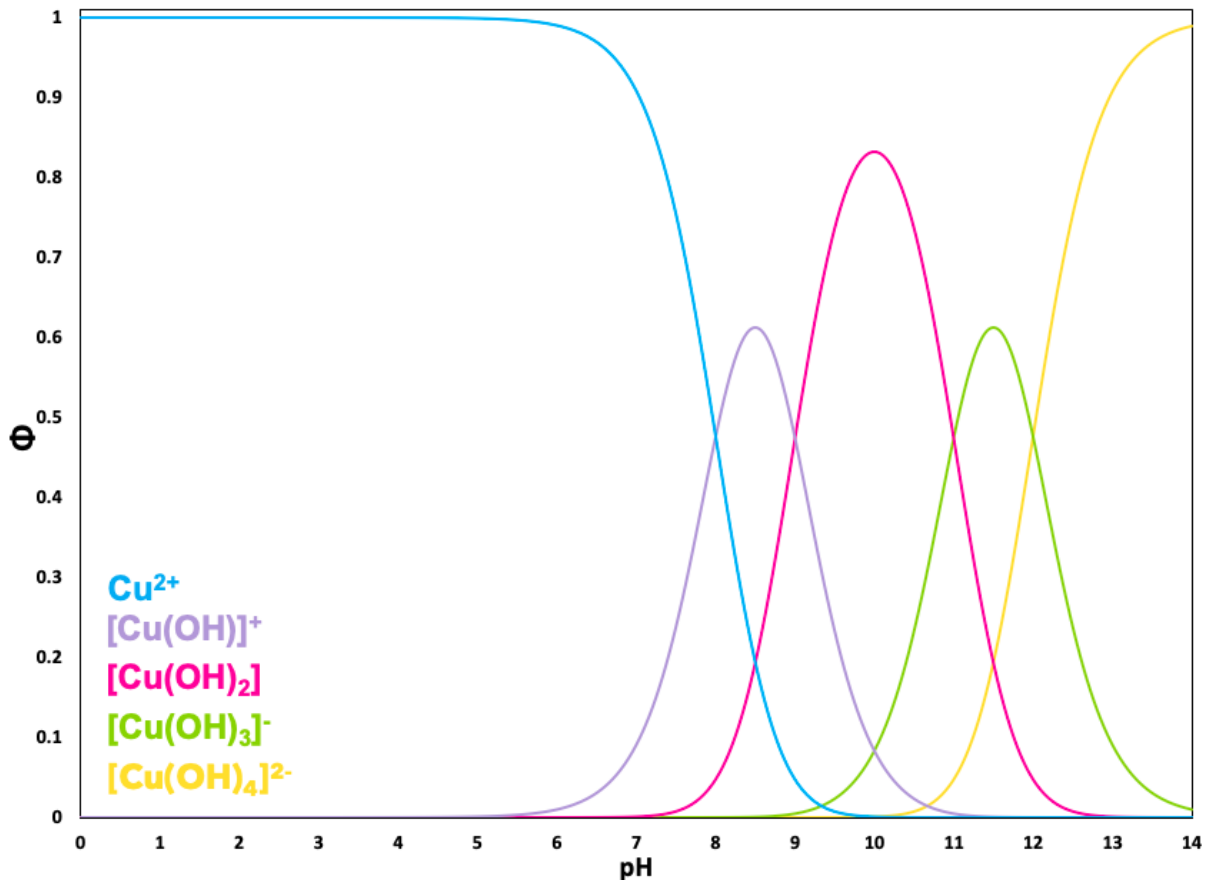


Fig. 1.1.3.1. Diagrama de fracción molar distributiva en función del pH para el sistema $Cu^{2+}/[Cu(OH)]^+/[Cu(OH)_2]/[Cu(OH)_3]^-/[Cu(OH)_4]^{2-}$.

1.2. Cobre en sistemas biológicos

El cobre es un elemento esencial presente en diversos sistemas vivos y fundamental para la existencia de los mismos. En el caso particular de los seres humanos, el cobre se encuentra en cantidades menores que el hierro o el cinc. Sin embargo, este elemento es parte importante de diversas enzimas redox, esenciales para el

desarrollo normal de varias funciones fisiológicas como la respiración celular, defensa frente a toxicidad de los radicales libres, síntesis de pigmento de melanina, biosíntesis del tejido conjuntivo y metabolismo del hierro.²⁷

Aunque el número de proteínas en donde el cobre participa como cofactor no es muy grande, las funciones que realizan estas enzimas resultan ser cruciales para la supervivencia de organismos vivos; algunas de estas se presentan en la tabla 1.2.1.

Tabla 1.2.1. Funciones biológicas de las metaloproteínas de cobre.^{27,28}

Función	Proteína de cobre	Reacción	Masa molecular [kDa]
Transporte de O ₂	Hemocianina	–	500 – 9,000
Transferencia electrónica	Proteínas azules de cobre	–	10 – 20
	Dopamina β-monooxigenasa		290
	Tirosinasa	–	42
	Quercetinasa		110
Oxidasas azules	Lacasa		60 – 140
	Ascorbato oxidasa	O ₂ → 2 H ₂ O	145
	Ceruloplasmina		130
Oxidasas no azules	Galactosa oxidasa		68
	Amino oxidasa	O ₂ → H ₂ O ₂	160 – 200
Oxidasa terminal	Citocromo c oxidasa	O ₂ → 2 H ₂ O	170
Dismutación de O ₂ ⁻	Cu,Zn-superóxido dismutasa	2 O ₂ ⁻ → O ₂ + H ₂ O ₂	32
Reducción de nitrito	Nitrito reductasa de cobre	–	75 – 120

1.2.1. Enzimas de cobre y su actividad catalítica

En las proteínas de cobre, el ion metálico se encuentra unido a cadenas polipeptídicas. Estas proteínas se han clasificado en tres grandes grupos de los cuales destacan las características espectroscópicas de los centros de Cu(II), que dan paso a la elucidación del entorno químico del catión metálico dentro del sitio activo de la proteína.^{27,28} A continuación se presenta una explicación breve de cada una de estas clasificaciones:

- *Centros de cobre Tipo I (T1Cu)*: las enzimas de cobre tipo I son proteínas relativamente pequeñas, con masas moleculares de 10 a 20 kDa y contienen un único átomo de cobre en el sitio activo; su característica principal es su color azul intenso que, a diferencia del color pálido del Cu^{II} en solución, presentan la plastocianina y la azurina, por ejemplo. Estos colores intensos que presentan las metaloproteínas de cobre se deben a las transiciones electrónicas permitidas por simetría que dan paso a estos colores llamativos.²⁸ Las sales de cobre, como por ejemplo, el sulfato de cobre (II) que resulta con un color azul en estado sólido (el cual se debe a las transiciones prohibidas entre orbitales *d* de la misma simetría) tiene un coeficiente de absorción molar (ϵ) de aproximadamente $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ mientras que, las metaloenzimas de cobre, presentan un ϵ cerca de $3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y bandas de absorción en $\sim 600 \text{ nm}$.²⁷

En su mayoría, el entorno de coordinación de las metaloenzimas de cobre tipo I está compuesto por un sistema N_2S_2 ³⁰ que incluye dos átomos de nitrógeno de grupos imidazólicos de dos histidinas, un átomo de azufre del tiolato de una cisteína y otro tioéter de una metionina. Por ejemplo, en la fig. 1.2.1.1 se muestra la estructura terciaria de la plastocianina así como su sitio activo, la cual tiene como principal función la transferencia de electrones.

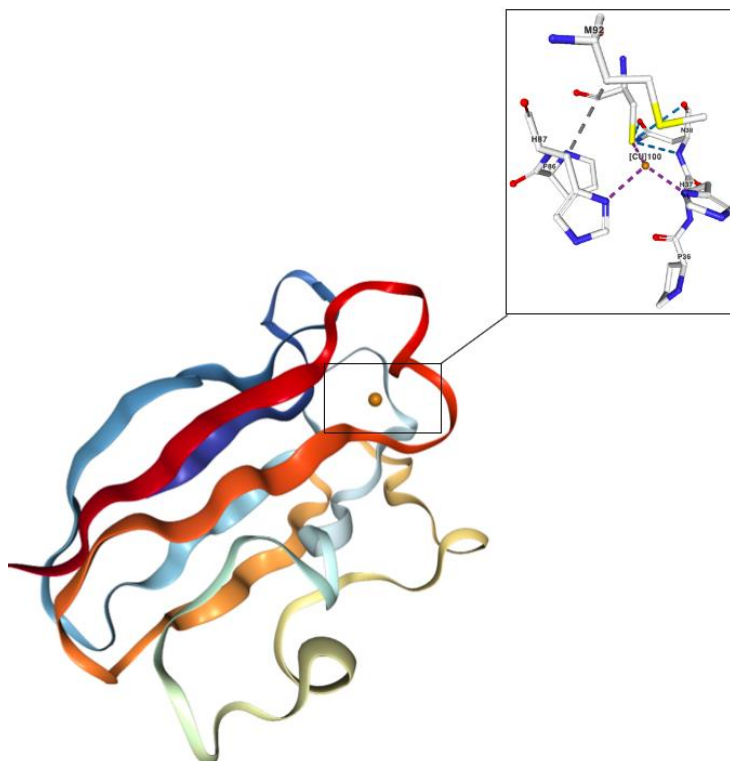


Fig. 1.2.1.1. Estructura terciaria y sitio activo de la Plastocianina.³⁶

Las estructuras cristalinas de las metaloproteínas de cobre tipo I muestran que el cobre tiene un número de coordinación cuatro y una geometría tetraédrica con una notable distorsión, que se asocia con un estado intermedio entre las geometrías preferidas del Cu(II) (cuadrada) y del Cu(I) (tetraédrica).³⁰

Finalmente, en este tipo de metaloenzimas el cobre presenta altos potenciales redox del par Cu(II)/Cu(I) en el intervalo de 0.18-0.68 V, lo cual se asocia con los enlaces Cu-S presentes, así como a la asimetría de la estructura.^{27,28,30}

- *Centros de cobre Tipo II (T2Cu)*: los centros de cobre tipo II, también llamadas enzimas no azules de cobre presentan propiedades espectroscópicas similares a los compuestos de coordinación comunes de cobre, como bandas en la región del visible y un $\epsilon \leq 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁷; estructuralmente se componen de solo un átomo de cobre en el sitio activo que participa, al igual que las enzimas de tipo I, en reacciones catalíticas y redox.³¹ Este tipo de metaloenzimas presenta un entorno de coordinación compuesto por ligantes donadores por oxígeno o nitrógeno, dependiendo de la enzima de la que se hable y del estado de oxidación del cobre. Presentan diferentes geometrías como lo son la pirámide de base cuadrada,

tetragonal distorsionada y cuadrado plana, siendo esta última la más común. La variedad de geometrías depende del número de coordinación y la naturaleza de los ligantes.³²

Un ejemplo de las enzimas de cobre que cae dentro de esta clasificación es la galactosa oxidasa que se muestra en la fig. 1.2.1.2., la cual cataliza la oxidación de una amplia gama de alcoholes primarios para dar como producto el aldehído correspondiente, acompañado con la reducción de dioxígeno a peróxido de hidrógeno.

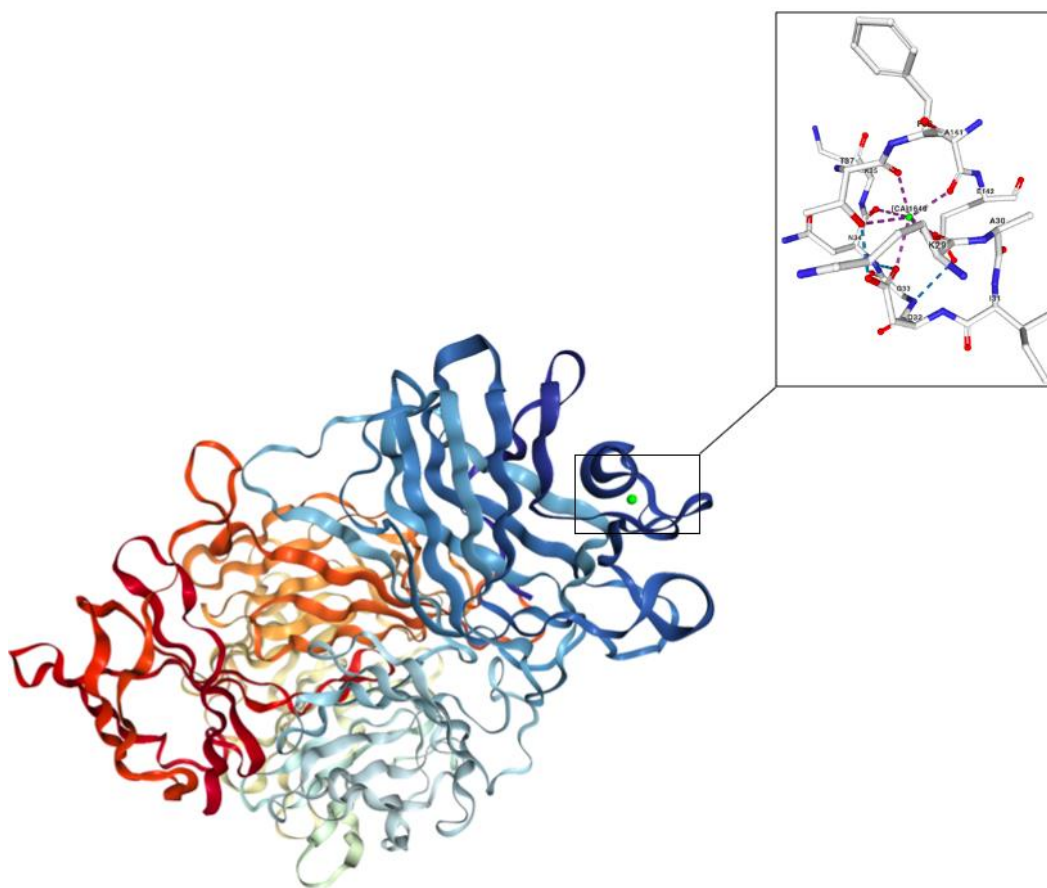


Fig. 1.2.1.2. Estructura terciaria y sitio activo de la Galactosa oxidasa.³⁶

Su sitio activo está constituido por un solo centro de Cu(II) coordinado a dos átomos de nitrógeno de grupos imidazólicos de histidina, dos átomos de oxígeno de grupos fenólicos correspondientes a tirosina y por último una molécula de agua o ión acetato, adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada. Cabe destacar que la tirosina ecuatorial se encuentra covalentemente unida a un residuo de cisteína en la posición orto del grupo hidroxilo.

- *Centros de cobre Tipo III (T3Cu)*: los centros de cobre tipo III, estructuralmente contienen dos átomos de Cu(II) en su estructura que, debido a la distancia a la que estos se encuentran el uno del otro, ocasiona que los electrones desapareados de cada uno de los núcleos presenten un fuerte acoplamiento antiferromagnético. Dicho fenómeno se manifiesta cuando los dos núcleos de Cu(II) se mantienen en contacto por una interacción directa Cu-Cu o mediante uno o más ligantes puente que favorecen el traslape entre los orbitales magnéticos del metal y los orbitales del ligante. Generalmente esta clase de metaloenzimas, los centros de Cu(II) se encuentran coordinados a tres nitrógenos de grupos imidazólicos de histidinas.³⁴ Espectroscópicamente, presentan bandas de absorción en el ultravioleta a ~300 nm con un $3000 \leq \epsilon \leq 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.²⁷

Cuando estos centros de cobre se coordinan con una molécula de oxígeno, cada uno de estos átomos provee de un electrón para reducir el O₂ presente al ligante peroxo y evitando la formación de ión superoxo no deseado; es por esto por lo que la función de estas metaloenzimas es principalmente el transporte y activación de O₂.^{27,28,30,32}

Un ejemplo de este tipo de metaloenzimas es la tirosinasa que se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales, donde está implicada la formación del pigmento de melanina y en la reacción más conocida que conduce a la formación de una coloración parduzca en diferentes vegetales y frutos cortados expuestos a oxígeno atmosférico. En la fig. 1.2.1.3 se muestra la estructura de la tirosinasa.

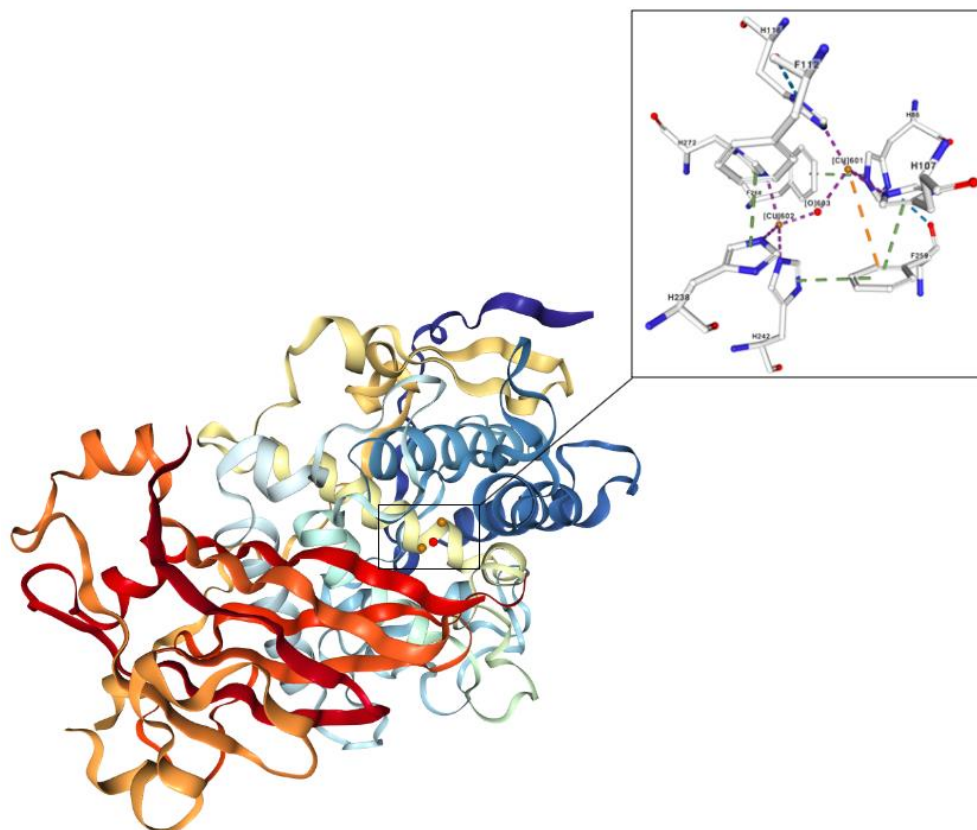


Fig. 1.2.1.3. Estructura terciaria y sitio activo de la Tirosinasa.³⁶

Existen otro tipo de metaloenzimas de cobre como, por ejemplo:

- *Nitrito reductasas*: son las encargadas de los procesos de desnitrificación, los cuales consisten en la reducción de NO_2^- a NO .
- *Oxidasas azules de cobre*: se encargan de catalizar la conversión de oxígeno molecular a agua, junto con la oxidación de diversos sustratos.

Sin embargo, estas no pueden ser descritas dentro de esta clasificación general debido a que contienen más de un centro de cobre.²⁷

1.3. Sistemas modelo

El estudio de las metaloproteínas de cobre 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 derivan de su obtención, manipulación y modificación, se ha optado por emplear nuevas herramientas que pueden ser útiles para obtener

información de lo que sucede en el sitio activo de algunas de éstas. Dichas herramientas se basan en crear una imagen de los sitios activos de las metaloproteínas a través de evidencias espectroscópicas y mediante el estudio de compuestos modelo de bajo peso molecular que emulan alguna o varias características de la proteína original.³⁷⁻³⁹

Los sistemas modelo de metaloenzimas de cobre, cuentan con uno o más átomos de cobre coordinados a nitrógenos heteroaromáticos, los cuales son una característica fundamental del cobre en sistemas vivos, además, la actividad catalítica de la mayoría de los modelos implica la presencia de al menos un átomo de cobre en el sitio activo.

De este modo, para que un compuesto de cobre se pueda proponer como un buen sistema modelo, el ligante empleado debe cumplir con las siguientes características:

- Incluir preferentemente átomos donadores σ por nitrógeno de naturaleza heteroaromática.
- Ser capaz de estabilizar al núcleo de cobre en sus dos estados de oxidación; tetraedro distorsionado para Cu(I) y tetragonal para Cu(II).
- Mantener a los dos iones de cobre a una distancia de 3 a 5 Å y mantener este arreglo en disolución.
- Ocupar la mayor parte de la esfera de coordinación del metal dejando por lo menos un sitio libre y estéricamente accesible que permita la entrada de ligantes exógenos como podría ser el sustrato.
- Debe coordinar a los iones metálicos con una constante de formación de estabilidad alta.

Se deben diseñar modelos para poder estudiar la estructura y funcionamiento de la metaloproteína, estos son: modelos estructurales y modelos funcionales.

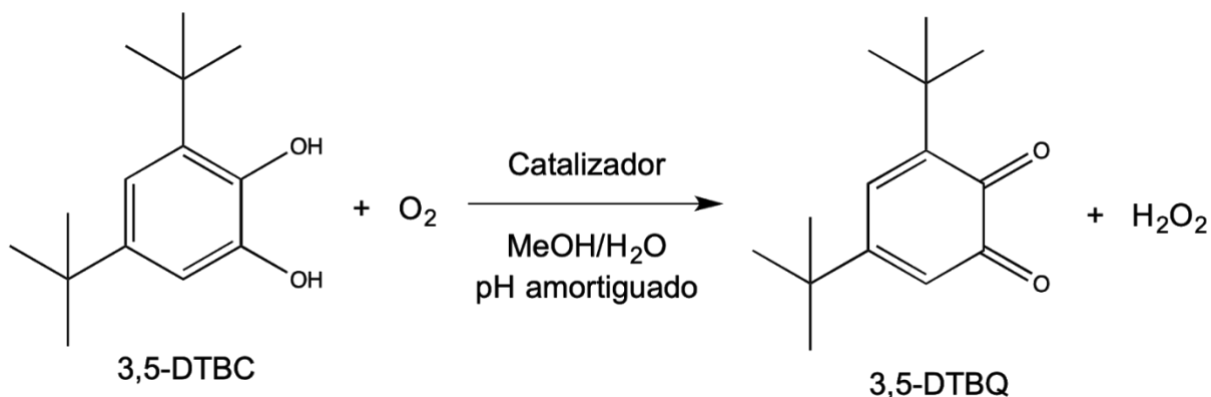
- *Modelos estructurales:* este tipo de modelos para los sitios activos de las metaloenzimas sirve de gran ayuda para poder determinar la estructura molecular del sitio activo. El diseño de estos modelos parte de datos parciales espectroscópicos obtenidos del modelo de la enzima; si estos son semejantes, se podrá proponer una posible estructura del sitio activo por comparación. Gran

cantidad de estructuras han sido establecidas mediante este tipo de metodología y se han corroborado por determinaciones estructurales cristalográficas.

Sin embargo, este tipo de modelos también pueden ser modelos funcionales, imitando la estructura del sitio activo de la enzima se puede conducir a modelos que exhiben la función de la enzima.⁴⁰

- *Modelos funcionales:* esta clase de modelos tiene aplicación a las metaloproteínas que involucran un proceso de óxido-reducción, se puede partir desde la estructura conocida, parcialmente conocida o desconocida del sitio activo de la enzima. Para esta clase de modelos, la principal característica es que la estequiometría de la reacción catalizada y los productos de la reacción deben ser conocidos.⁴⁰

Por otro lado, para probar la actividad catalítica de los complejos modelo que se desean estudiar, debe existir una reacción modelo, por ejemplo, para evaluar la actividad catecolasa se suele emplear el 3,5-ditercbutilcatecol como sustrato. Los grupos terc-butilo, al ser demasiado voluminosos, le otorgan estabilidad al catecol frente a reacciones de oxidación posteriores a la ruptura de la aromaticidad. Además, el potencial oxido-reducción de este, al ser bajo, facilita su oxidación.



Esquema. 1.3.1. Reacción modelo de la oxidación del 3,5-ditercbutilcatecol a 3,5-ditercbutilquinona.

Otra reacción modelo que resulta útil para evaluar la eficiencia de los catalizadores es el acoplamiento oxidativo del OAP a su correspondiente fenoxazinona, de acuerdo al esquema 1.3.2. Este producto posee propiedades antimicrobianas y tiene gran interés debido a que se emplea como modelo para la

Esta reacción puede llevarse a cabo en medio ácido o medio básico, de acuerdo a la posición que se desee sustituir; para llevar a cabo la N-sustitución (posición 1), debe realizarse en medio ácido, por otro lado, si se desea favorecer la C-sustitución (posición 2, 4 y 5) debe realizarse en medio básico.

A continuación se muestra el mecanismo de reacción en medio básico para la síntesis de los ligantes de interés en este trabajo:

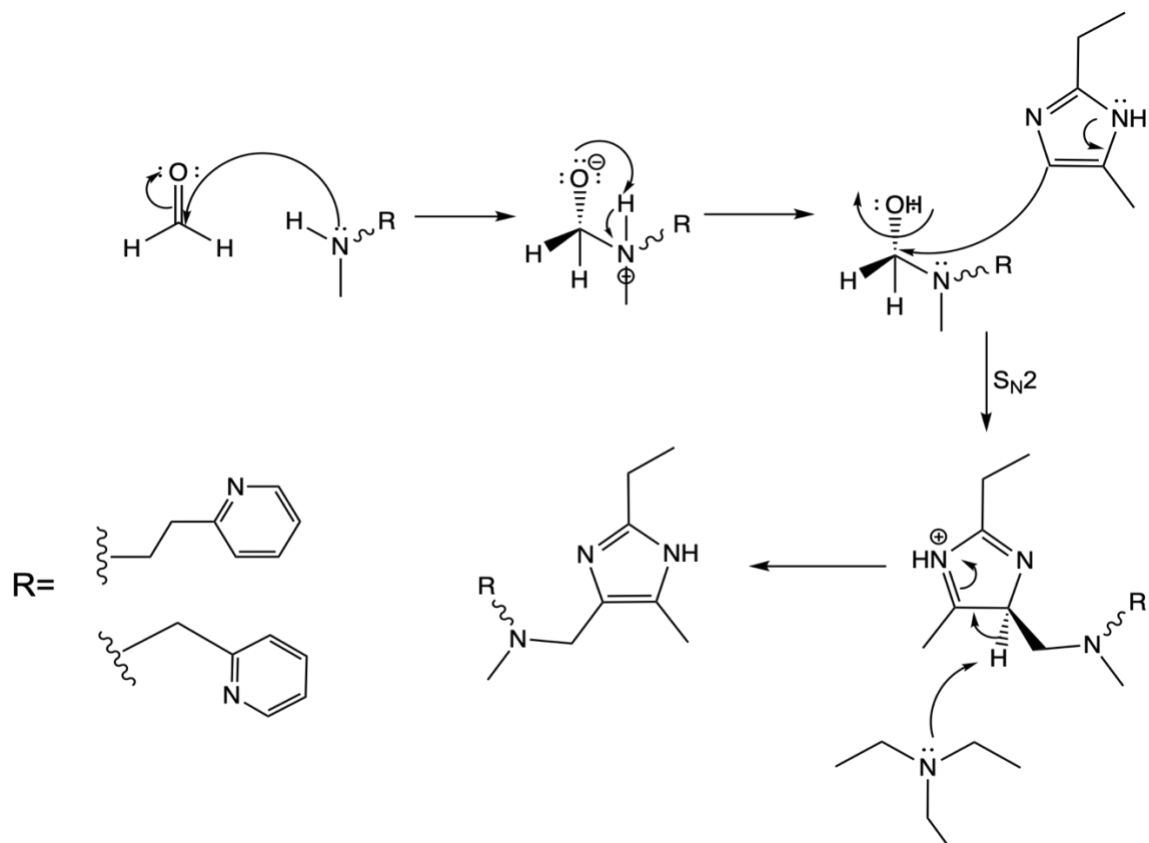


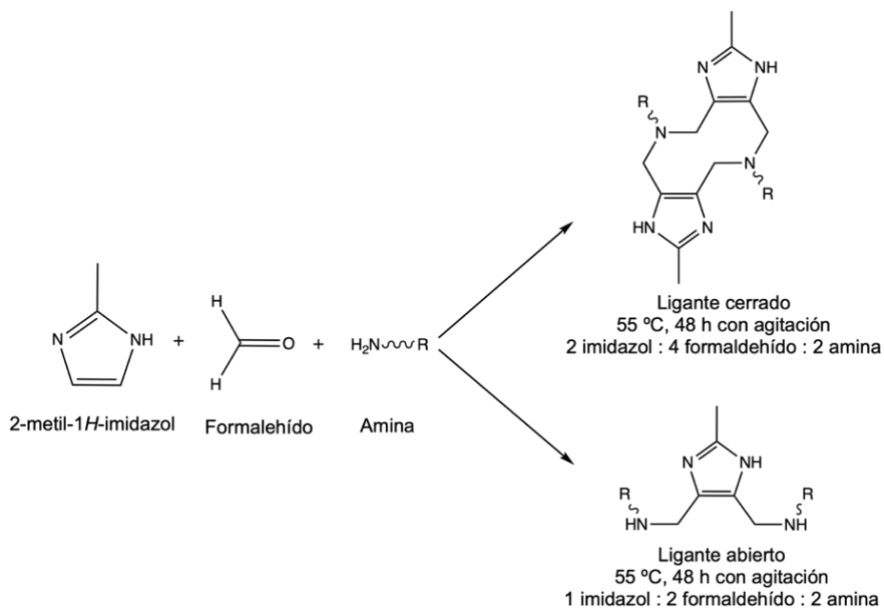
Fig. 1.4.1. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los ligantes empleados en este trabajo.

2. Antecedentes

En las metaloenzimas de cobre los cationes metálicos se encuentran coordinados a residuos imidazólicos de histidina, dicha propiedad estructural ha inspirado a múltiples grupos de investigación a sintetizar sistemas modelo con ligantes que contienen átomos de nitrógeno heteroaromáticos. En nuestro grupo de investigación se han desarrollado y estudiado un serie de complejos dinucleares y mononucleares de cobre(II) con distintos ligantes derivados de imidazol a los cuales se les ha evaluado su actividad catalítica frente a reacciones modelo más empleadas por la comunidad científica (actividad catecolasa y fenoxazinona sintasa) y así poder determinar los factores que rigen dicha actividad. Se ha encontrado que nuestros complejos dinucleares de Cu(II) pese a no ser buenos modelos estructurales del sitio activo de las enzimas catecol oxidasa y fenoxazinona sintasa, presentan una importante actividad catalítica en comparación con distintos modelos reportados en la literatura⁴⁸, además cabe destacar que los modelos de Cu(II) con ligantes derivados de imidazol son escasos.

2.1. Ligantes derivados de imidazol

Como se mencionó anteriormente, reacción de Mannich nos permite con facilidad sintetizar nuestros ligantes a través de la condensación entre un grupo aminometílico y un anillo imidazólico en un solo paso, tanto en medio ácido como medio básico (apartado 1.4). Los ligantes dinucleares se han clasificado como “abiertos” o “cerrados”, como se observa en el siguiente esquema:



Esquema. 2.1.1. Reacción de Mannich para la síntesis de ligantes dinucleantes “abiertos” y “cerrados”.

La obtención de ligantes tipo “abierto” o “cerrado” depende de la naturaleza de la amina usada: para los ligantes de tipo abierto se emplean aminas derivadas de L- α -aminoácidos, mientras que las de tipo cerrado se utilizan aminas primarias sustituidas. Además, se utiliza el 2-metilimidazol como materia prima ya que en este compuesto las posiciones 4 y 5 se encuentran libres para sustituirse.

En la fig. 2.1.3 y 2.1.3 se muestran algunos ligantes dinucleantes abiertos y cerrados sintetizados en el grupo de investigación, respectivamente.

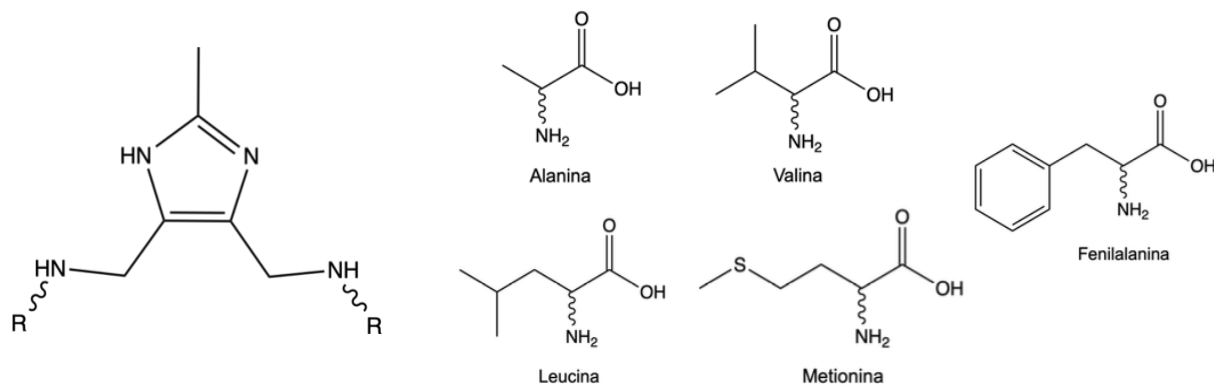


Fig. 2.1.2. Ligantes dinucleantes abiertos sintetizados en el grupo de investigación a partir de distintos L- α -aminoácidos.

Las características estructurales más relevantes de los ligantes abiertos es que poseen dos sitios de coordinación tridentados; estos sitios se conforman por un nitrógeno heteroaromático proveniente del anillo imidazólico, un nitrógeno alifático del L- α -aminoácido y el tercer átomo donador proviene del residuo del aminoácido utilizado.

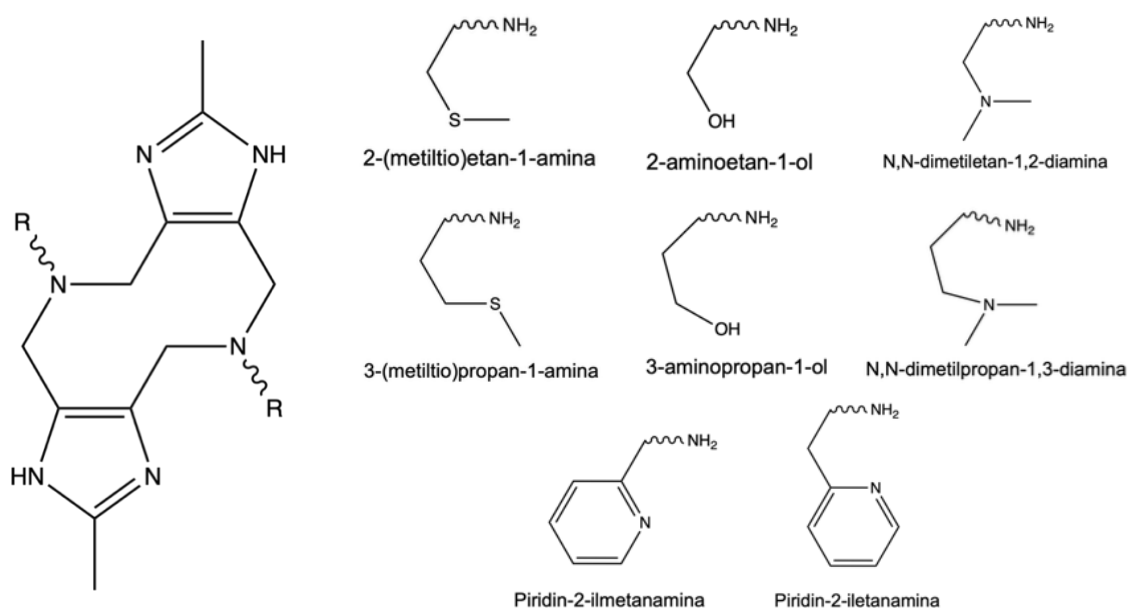
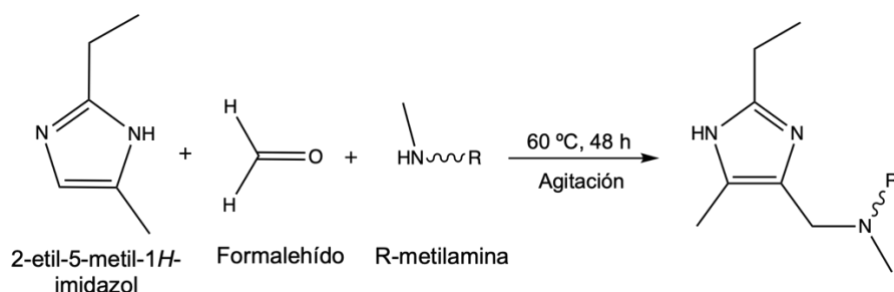


Fig. 2.1.3. Ligantes dinucleantes cerrados sintetizados en el grupo de investigación a partir de distintas aminas primarias.

Por otro lado, los ligantes cerrados a su vez también poseen dos sitios de coordinación tridentados, cada uno de estos sitios está conformado por un nitrógeno heteroaromático del anillo imidazólico, un nitrógeno alifático de la amina terciaria derivada de la formación del anillo de 10 miembros y el tercer átomo donador proviene del residuo del sustituyente de la amina empleada. Aunado a esto, dentro de estos ligantes cerrados se encuentra una subclasificación, los cuales se denominan “cortos” o “largos”, dependiendo la longitud de la cadena alifática entre el nitrógeno alifático de la amina terciaria y el tercer átomo donador, que puede ser de dos a tres átomos de carbono para los ligantes cerrados “cortos” y “largos”, respectivamente.

En nuestro grupo de investigación se ha tomado la iniciativa de sintetizar ligantes mononucleantes análogos a los ligantes dinucleantes “cerrados” con la finalidad de estudiar y determinar las distintas propiedades de sus correspondientes complejos de Cu(II) y así, poder realizar un estudio comparativo con sus correspondientes análogos dinucleares.

Los ligantes mononucleantes (esquema 2.1.4), se sintetizan de igual manera a través de la reacción de Mannich pero se emplean materias primas distintas, como es el 2-etil-5-metil-imidazol que, a diferencia del imidazol utilizado en la síntesis de los ligantes dinucleantes, este se encuentra disustituído en las posiciones 2 y 5 para únicamente favorecer la monosustitución del anillo. Además, se emplean aminas secundarias con la intención de evitar la adición de un segundo anillo imidazólico en el nitrógeno de la amina; la materia prima es una metilamina sustituida con diferentes grupos R presentados en la fig. 2.1.5.



Esquema. 2.1.4. Esquema de la reacción de Mannich para la síntesis de ligantes mononucleares.

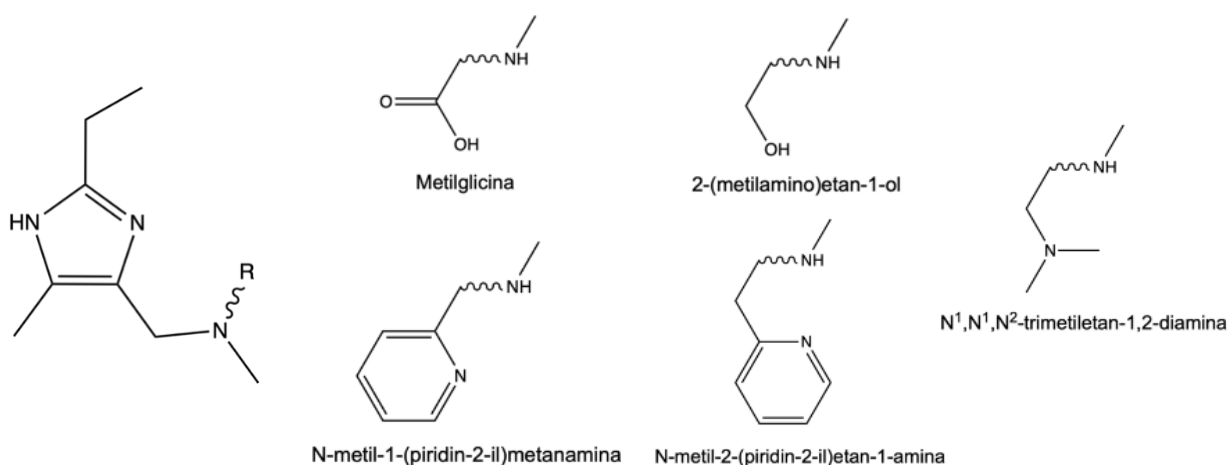


Fig. 2.1.5. Ligantes mononucleares sintetizados en el grupo de investigación a partir de distintas aminas secundarias.

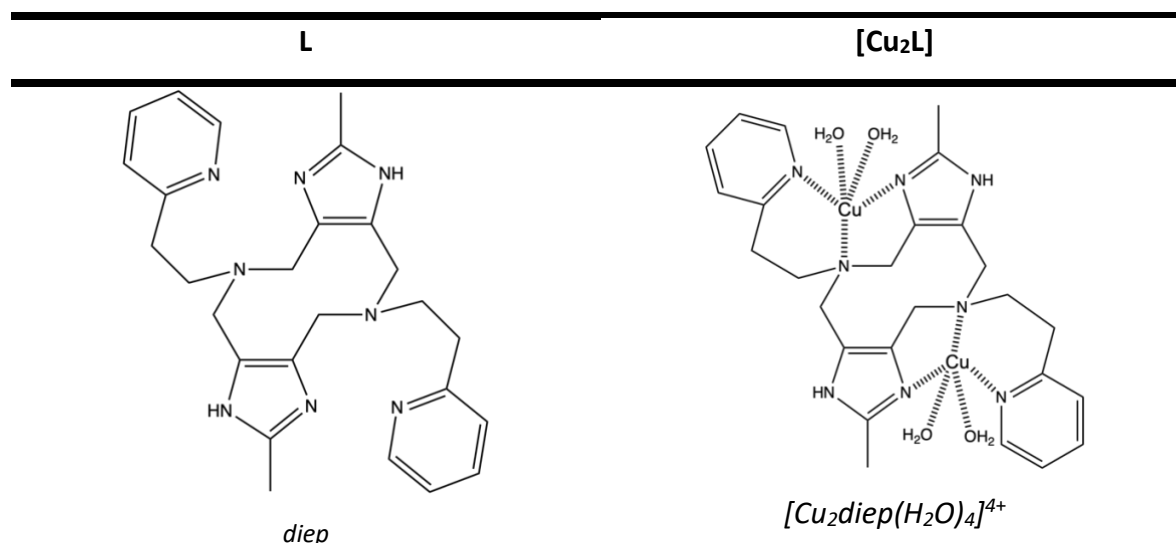
Estos ligantes mononucleantes presentan un sitio de coordinación tridentado conformado por un nitrógeno heteroaromático del anillo imidazólico, un nitrógeno alifático de la amina terciaria derivada de la condensación y un átomo donador del sustituyente R unido a la amina terciaria.

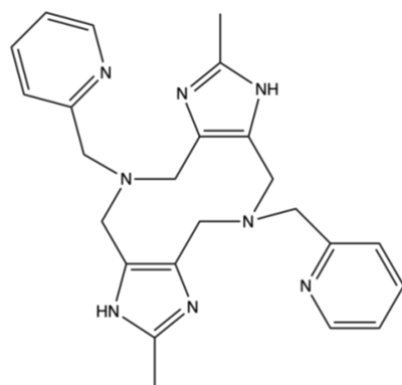
2.2. Complejos de cobre (II) con ligantes derivados de imidazol

Para todos los ligantes presentados en el apartado anterior, se han sintetizado sus correspondientes complejos de Cu(II) y se han estudiado sus características estructurales, electrónicas y espectroscópicas, así como sus equilibrios en disolución y su actividad catalítica frente a reacciones modelo.

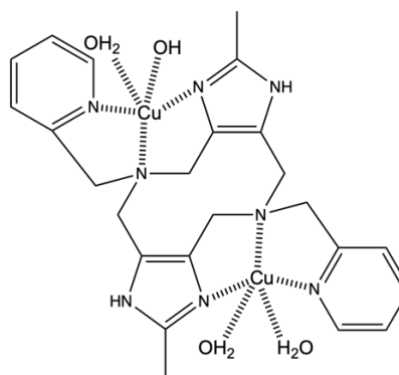
En las siguientes secciones se discutirán las propiedades estructurales, electrónicas, en disolución y catalíticas de los complejos de Cu(II) que se forman a partir de los ligantes *diep* y *dimp* mostrados en la tabla 2.2.1, puesto que en el presente trabajo se mostrarán estudios de sus complejos análogos mononucleares de Cu(II).

Tabla 2.2.1. Estructura de ligantes y complejos de cobre (II)





dimp



$[Cu_2dimp(H_2O)_4]^{4+}$

2.2.1. Propiedades estructurales y electrónicas

Los ligantes “cerrados” *diep* y *dimp*, de acuerdo con la tabla 2.2.1, presentan dos sitios de coordinación tridentados. La diferencia principal entre estos dos ligantes es un metileno en la cadena alifática unido a la piridina, lo que ocasiona un incremento en el número de miembros del anillo quelato al unirse al centro metálico.

Además, el ligante *diep* se clasifica como un ligante “cerrado largo” mientras que, el ligante *dimp*, se clasifica como un ligante “cerrado corto”.

Estas características mencionadas resultan relevantes para explicar su actividad catalítica, de la cual, se hará mención más adelante.

Se ha podido determinar la estructura cristalina de los complejos $[Cu_2(diep)]X_4$ y $[Cu_2(dimp)]X_4$ mediante difracción de rayos X de monocristal empleando sales de cobre (II) tales como $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ y $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5H_2O$.

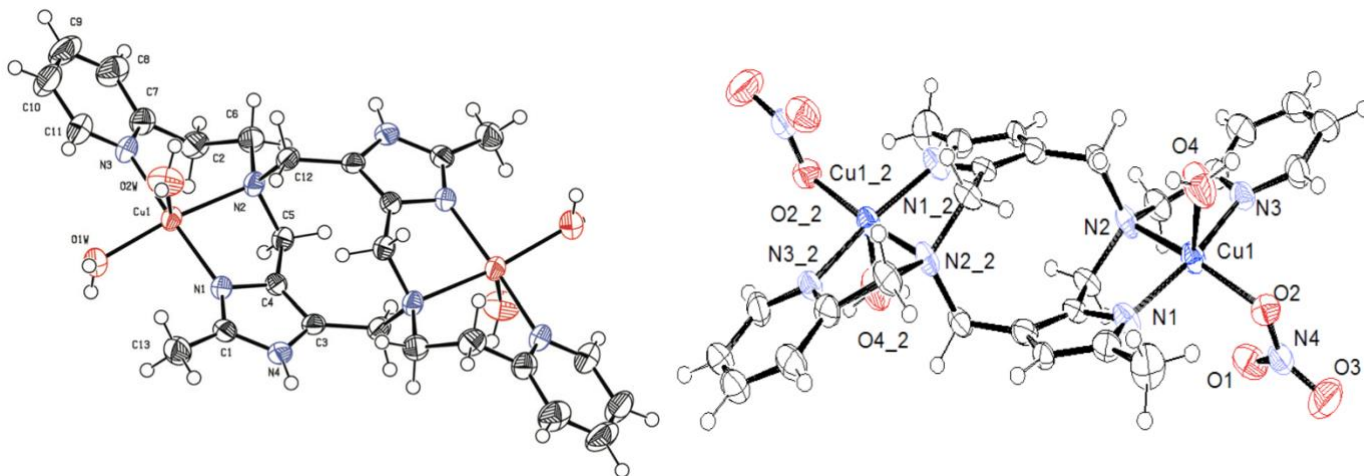


Fig. 2.2.1.1. Estructura cristalina de rayos X de monocristal de $[\text{Cu}_2(\text{diep})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4$ ⁴³ (izquierda) y $[\text{Cu}_2(\text{dimp})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ ⁴² (derecha).

En la fig. 2.2.1.1 podemos observar que los compuestos de coordinación de cobre (II) con los distintos ligantes presentados, adquieren una geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada; la base de la pirámide está formada por los tres nitrógenos del ligante que corresponden al imidazol, el anillo diazecina y el nitrógeno de la piridina. Además, el cuarto sitio de coordinación, para el complejo $[\text{Cu}_2(\text{diep})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4$, se encuentra ocupado por un oxígeno proveniente de una molécula de agua al igual que la posición axial.

Por otro lado, para el complejo $[\text{Cu}_2(\text{dimp})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ la cuarta posición se encuentra ocupada por el oxígeno correspondiente al NO_3^- proveniente de la sal de cobre (II) y la posición axial, por el oxígeno de una molécula de agua.

Las distancias de enlace que existen entre el átomo de cobre (II) y los nitrógenos de los ligantes oscilan alrededor de 2 Å, asimismo, los átomos de oxígeno (sea nitrato o agua) que se encuentran en el ápice de la pirámide, mantienen una distancia mayor a 2 Å, lo que se debe a la manifestación del efecto Jahn-Teller.

Por último, la distancia $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{Cu}^{\text{II}}$ en ambos complejos se encuentra en alrededor de 7.4 Å, la cual es mayor a la presentada en la propia enzima catecol oxidasa y otros sistemas reportados en la literatura.

2.2.2. Equilibrios en disolución

Dentro de nuestro grupo de investigación también se ha logrado determinar las constantes de acidez, para el caso de los ligantes, así como las constantes de formación y de hidrólisis de los complejos de Cu(II) que se muestran en la tabla 2.2.2.1.^{49,50} Con estos datos se han podido construir diagramas de fracción molar distributiva en función del pH para conocer el predominio de las distintas especies a lo largo de la escala de pH (fig. 2.2.1).⁴¹

Tabla 2.2.2.1. Constantes de formación y constantes de acidez para los complejos $[\text{Cu}_2(\text{diep})]^{4+}$ y $[\text{Cu}_2(\text{dimp})]^{4+}$ en medio MeOH:H₂O (1:1) y acuoso, respectivamente.^{48,49}

$\beta_{x,y,z} = \frac{[\text{Cu}_x^{2+} \text{H}_y \text{L}_z]}{[\text{Cu}^{2+}]^x [\text{H}]^y [\text{L}]^z}$		$K_a^{(i)} = \frac{[\text{Cu}_x^{2+} (\text{H}_2\text{O})_{6-i} (\text{OH})_i] [\text{H}^+]^i}{[\text{Cu}_x \text{L} (\text{H}_2\text{O})_{6-i+1} (\text{OH})_{i-1}]}$	
<i>diep</i>		<i>dimp</i>	
$\log\beta_{2,0,1} = 19.07$	–	$\log\beta_{2,0,1} = 18.63$	–
$\log\beta_{2,-1,1} = 11.50$	$\text{p}K_a^{(1)} = 7.57$	$\log\beta_{2,-1,1} = 11.09$	$\text{p}K_a^{(1)} = 7.54$
$\log\beta_{2,-2,1} = 2.63$	$\text{p}K_a^{(2)} = 8.87$	$\log\beta_{2,-2,1} = 2.44$	$\text{p}K_a^{(2)} = 8.65$
$\log\beta_{2,-3,1} = -7.13$	$\text{p}K_a^{(3)} = 9.76$	$\log\beta_{2,-3,1} = -6.73$	$\text{p}K_a^{(3)} = 9.16$
$\log\beta_{2,-4,1} = -18.10$	$\text{p}K_a^{(4)} = 10.97$	$\log\beta_{2,-4,1} = -17.60$	$\text{p}K_a^{(4)} = 10.87$

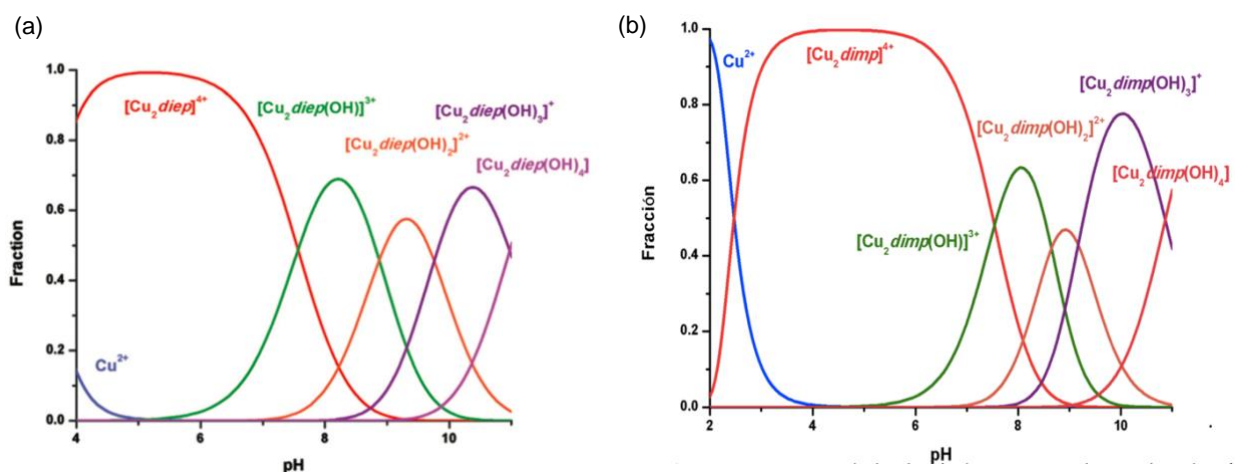


Fig. 2.2.1. Diagramas de fracción molar distributiva en función del pH para los complejos dinucleares a) $[\text{Cu}_2(\text{diep})]^{4+}$ y b) $[\text{Cu}_2(\text{dimp})]^{4+}$ en medio MeOH:H₂O 1:1 y acuoso, respectivamente, y una fuerza iónica $I=0.1 \text{ mol L}^{-1}$.^{48,49}

Con estos estudios en disolución para los complejos, tanto mononucleares como dinucleares, se sabe que se forman mezclando estequiométricamente, un equivalente de ligante y un equivalente o dos equivalentes de una sal de cobre (II), respectivamente.

Adicional a esto, en los diagramas se muestra que las especies hidrolizadas comienzan a predominar a valores de pH alcalinos; dichas especies resultarán relevantes para comprender la actividad catalítica de nuestros sistemas modelo.

2.3. Estudios cinéticos

La síntesis de distintos compuestos de coordinación de cobre (II) con características diferentes que presentan actividad catalítica catecolasa y fenoxazinona sintasa han sido objeto de estudio durante años, pues resulta relevante crear compuestos modelo que faciliten la descripción del sitio activo de estas enzimas.

2.3.1. Actividad catecol oxidasa

Los estudios catalíticos obtenidos dentro del grupo de investigación mostraron resultados alentadores (tabla 2.3.1.1), ya que nuestros complejos de Cu(II) presentan una notable actividad catecolasa en comparación con los diversos sistemas descritos en la literatura.

La enzima catecol oxidasa, cataliza la oxidación de sustratos orto-difenólicos a sus correspondientes quinonas. En su sitio activo (fig. 2.3.1.1) presenta dos núcleos de cobre (II) los cuales se encuentran puenteados por un átomo de oxígeno, además, cada uno de estos átomos de cobre (II) se encuentra coordinado a 3 histidinas. La distancia Cu^{II}-Cu^{II} en la forma oxidada es de 3.3 Å, mientras que, para su forma reducida, la distancia Cu^I-Cu^I aumenta a 4.4 Å; asimismo, la distancia de los enlaces Cu^{II}-His son en promedio de 2.1 Å.

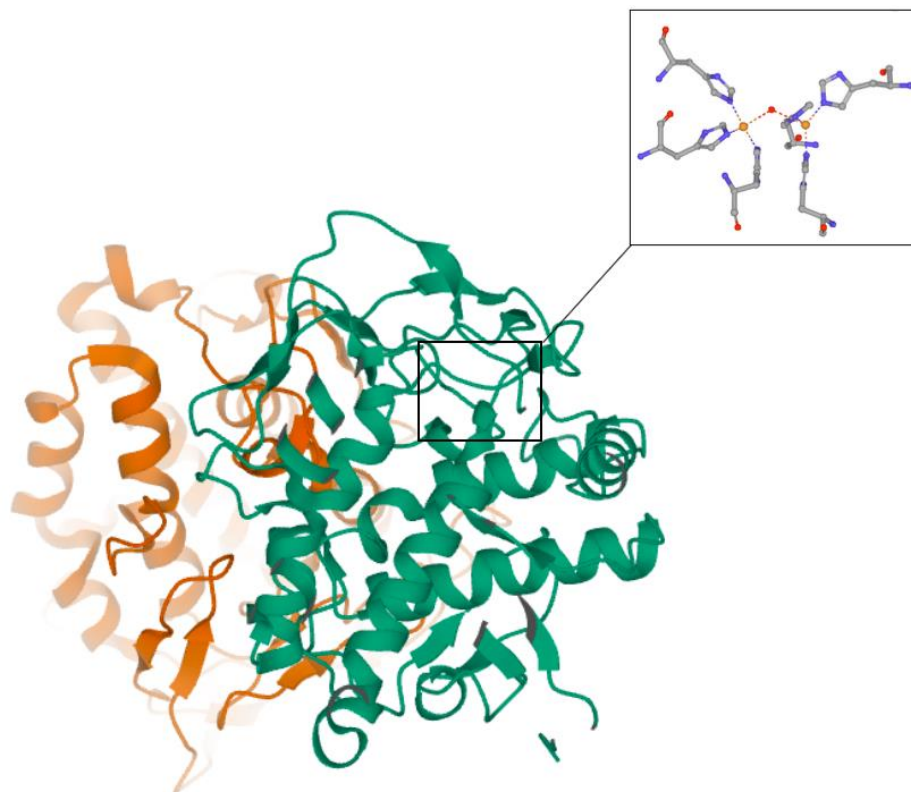
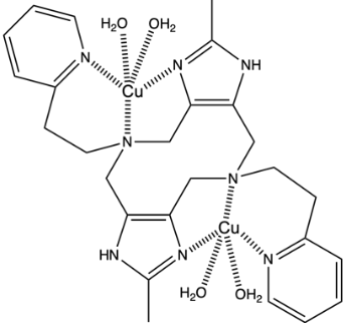
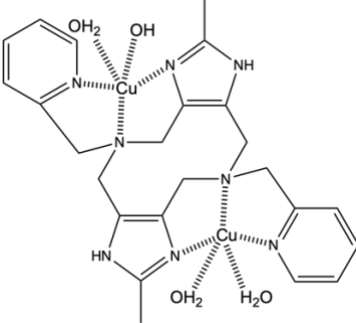


Fig. 2.3.1.1. Estructura terciaria y sitio activo de la enzima catecol oxidasa.⁴⁷

Dentro del grupo de investigación, uno de los objetivos ha sido evaluar la actividad catecolasa de los sistemas modelo de Cu(II) presentados anteriormente, a pesar de que estos presenten diferencias notables en comparación con el sitio activo de la metaloenzima, como lo son: el puenteo entre ambos núcleos de cobre y la distancia Cu^{II}-Cu^{II}.

La evaluación de la actividad catecolasa de nuestros compuestos bioinspirados de cobre (II) se realiza mediante la reacción modelo de la oxidación del 3,5-ditercbutilcatecol descrita anteriormente en el esquema 1.3.1 del apartado 1.3, en medio MeOH/H₂O 1:1 a 25 °C, los resultados se muestran en la tabla 2.3.1.1.

Tabla 2.3.1.1. Parámetros cinéticos de los complejos $[\text{Cu}_2(\text{diep})]^{4+}$ y $[\text{Cu}_2(\text{dimp})]^{4+}$ frente a la reacción de oxidación del 3,5-ditercbutilcatecol en una mezcla MeOH/H₂O 1:1 a 25 °C.⁴⁵

		$[\text{Cu}_2(\text{diep})(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$	$[\text{Cu}_2(\text{dimp})(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$
			
pH		8.5	7.5
MeOH/H₂O 1:1	K_M [M]	0.289x10 ⁻⁴	5.16x10 ⁻⁴
	k_{cat} [s⁻¹]	0.0175	0.0788
	k_{cat}/K_M [M⁻¹ s⁻¹]	605	153

Los parámetros catalíticos se obtuvieron a partir del ajuste hiperbólico de la ecuación de Michaelis-Menten.

La diferencia entre estas dos eficiencias catalíticas se debe al aumento de miembros en el anillo quelato, de 5 a 6; este incremento favorece una mayor flexibilidad del ligante, lo que facilita el cambio de geometría de los estados reducidos de Cu(I) y oxidado Cu(II).

Al comparar dichos parámetros catalíticos frente a sistemas modelo de Cu(II) descritos en la literatura, nuestros complejos presentan una eficiencia catalítica mayor.⁴⁸ La razón de dicho valor de eficiencia catalítica es atribuida a los valores bajos de la constante de Michaelis-Menten (K_M), es decir, la alta afinidad del sustrato por el catalizador. Aunado a ello, el pH juega un papel sumamente importante para explicar la especie activa en la actividad catecolasa, ya que como se puede observar, el estudio catalítico se realiza a valores de pH básicos en donde la especie $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]$ es la que predomina.

2.3.2. Actividad fenoxazinona sintasa

Desde hace ya 2 décadas, se ha estudiado la actividad de la fenoxazinona sintasa en modelos de Co(II), Co(III), Mn(II), Mn(III), Fe(II) y Cu(II). Recientemente se han encontrado un mayor número de reportes sobre sistemas de manganeso y cobalto que presentan actividad fenoxazinona sintasa mientras que, los modelos de Cu(II) resultan ser menores, a pesar de que en el año 2006 fue revelada la estructura cristalina de la enzima fenoxazinona sintasa, cuyos sitios activos contienen cationes metálicos de cobre (II).^{44,45}

La enzima fenoxazinona sintasa participa en mecanismos para proteger el tejido de los mamíferos del daño oxidativo, además, contribuye en la actividad de algunos antibióticos que permite que los compuestos intercalen ácidos nucleicos, razón por la cual se consideran agentes anticancerígenos eficaces.⁵¹ Esta enzima se presenta en dos formas: una forma dimérica y una hexamérica. La estructura presentada en la fig. 2.3.2.1 es la forma hexamérica, en la cual cada subunidad del hexamero contiene cinco átomos de cobre. Esta oxidasa multicobre contiene: un centro T1Cu, tres centros T2Cu y un centro T3Cu. Se estima que la presencia de estos cinco núcleos repercute en la actividad catalítica máxima a pesar de que uno de los núcleos T2Cu se encuentra a aproximadamente 25 Å, presenta un papel estructural relevante. La distancia Cu^{II}-Cu^{II} del centro de cobre T3Cu, es de aproximadamente 3.88 Å y la distancia de los enlaces Cu^{II}-His son similares para ambos núcleos.

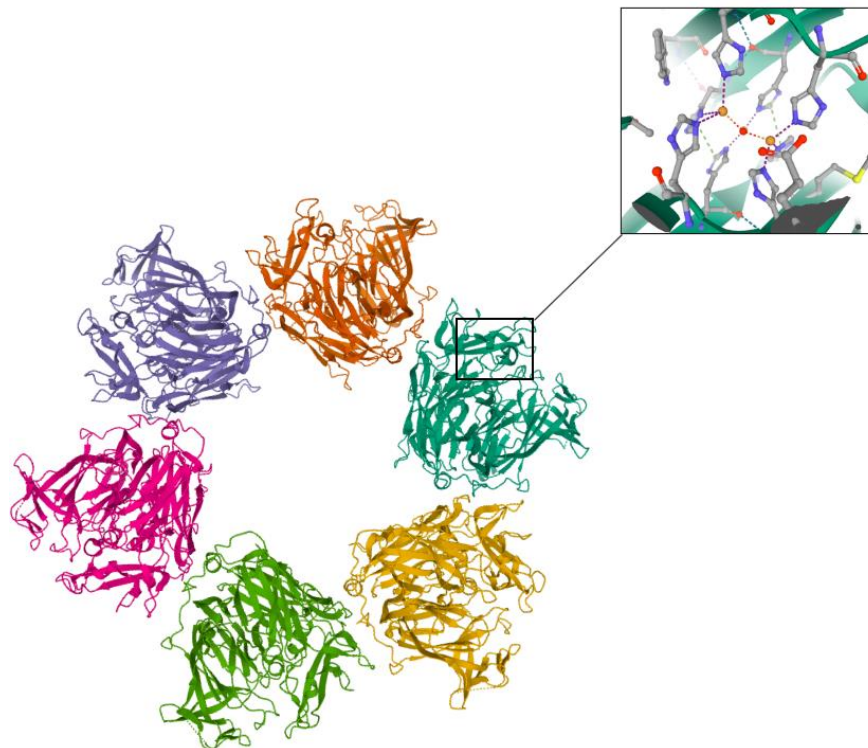
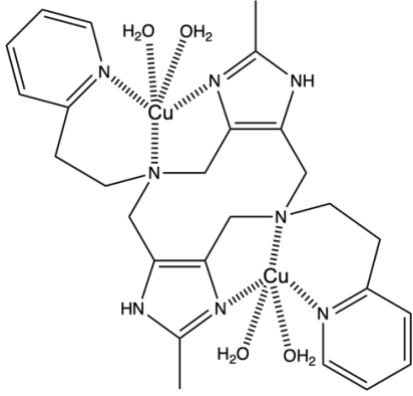


Fig. 2.3.2.1. Estructura terciaria y sitio activo de la enzima Fenoxazinona sintasa.⁴⁴

Dentro del grupo de investigación, otro de los objetivos ha sido evaluar la actividad fenoxazinona sintasa de los sistemas modelo de Cu(II) descritos, a pesar de que estos presenten diferencias notables en comparación con el sitio activo de la metaloenzima, como son: el número de núcleos en el sitio activo, el puenteo entre ambos núcleos de cobre y la distancia Cu^{II}-Cu^{II}.

La evaluación de la actividad fenoxazinona sintasa de los compuestos modelo de cobre (II) se realizó en MeOH/H₂O_{pH} 1:1 a 25 °C y a pH 8.5 mediante la reacción modelo presentada en el esquema 1.3.2 del apartado 1.3, los resultados se muestran en la tabla 2.3.2.1.

Tabla 2.3.2.1. Parámetros cinéticos de los complejos $[\text{Cu}_2(\text{diep})]^{4+}$ frente a la reacción de acoplamiento del 2-aminofenol en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}_{\text{pH}}$, a pH 8.5 y a 25 °C.

$[\text{Cu}_2(\text{diep})\text{S}_4]^{4+}$	
	
K_M [M]	5.7×10^{-4}
k_{cat} [s^{-1}]	9.65×10^{-3}
k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	17

Estos parámetros catalíticos se obtuvieron mediante el ajuste hipérbolico de la ecuación de Michaelis-Menten.

Al comparar la actividad catalítica de ambos sistemas frente a los modelos de Co (II) y (III), Mn (II) y (III) e incluso los sistemas descritos de Cu (II), se observa que los complejos de cobre (II) del grupo de investigación presentan una actividad catalítica superior a los descritos en la literatura frente a la reacción de acoplamiento del 2-aminofenol.⁴⁸

De nuevo, la importante actividad fenoxazinona sintasa de los catalizadores presentados (tabla 2.3.2.1) se debe a los valores bajos de la constante de Michaelis-Menten (K_M), es decir la alta afinidad del sustrato por el catalizador.

Con estos resultados, se sigue recabando evidencia experimental de que la presencia de un segundo catión metálico en la estructura del complejo y el amortiguamiento del pH, presentan un efecto importante en la actividad catalítica de la fenoxazinona sintasa.

2.4. Especiación como herramienta para la mejora en la eficiencia catalítica

Para un sistema ML_n en el que todas las especies coexistan desde M a ML_n , se tiene el siguiente balance de masa para el metal:

$$C_M = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots + [ML_n]$$

La fracción molar de la especie i (Φ) es la proporción de la concentración total que corresponde a esa especie:

$$\Phi_i = \frac{[ML_i]}{C_M}$$

La ventaja de las constantes acumuladas de formación es que permiten poner la concentración de cada especie en función de la concentración de metal y ligante libres:

$$\beta_i = \frac{[ML_i]}{[M][L]^i} \quad \rightarrow \quad [ML_i] = \beta_i [M][L]^i$$

Sustituyendo en el balance de masa tendremos:

$$C_M = [M] + \beta_1 [M][L] + \beta_2 [M][L]^2 + \dots + \beta_i [M][L]^i$$

Factorizando $[M]$ con término común y despejando tenemos:

$$[M] = \frac{C_M}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2 + \dots + \beta_i [L]^i}$$

Con esta expresión se puede obtener la concentración de cada especie en función de la concentración del ligante libre:

$$[ML_i] = \beta_i [M][L]^i = \frac{\beta_i [L]^i}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2 + \dots + \beta_i [L]^i} C_M$$

Así pues, se define la fracción molar para la especie ML_n :

$$\Phi_i = \frac{[ML_i]}{C_M} = \frac{\beta_i [L]^i}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2 + \dots + \beta_i [L]^i}$$

Y para el metal libre:

$$\Phi_0 = \frac{[M]}{C_M} = \frac{1}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2 + \dots + \beta_i [L]^i}$$

De esta forma, la especie que predomina tendrá un término mayor que el resto. También es interesante considerar que la suma de todas las fracciones molares es igual a la unidad.⁵²

Los diagramas de fracción molar distributiva resultan una herramienta bastante útil al momento de visualizar en un intervalo de pH o pL que especies predominan. Como se muestra en el fig. 1.1.3.1, en el diagrama de predominio del sistema de cobre (II) y sus hidroxocomplejos, se puede proponer el intervalo de pH en el cual se tiene una especie en mayor proporción que las otras.

Se hace mención de esta herramienta, ya que en los resultados obtenidos de los estudios catalíticos de los complejos $[Cu_2dimp]^{4+}$ y $[Cu_2diep]^{4+}$ frente a la reacción de oxidación del 3,5-ditercbutilcatecol, se presenta una variación en la gráfica de V_0 en función del pH (fig. 2.4.1) a valores básicos.

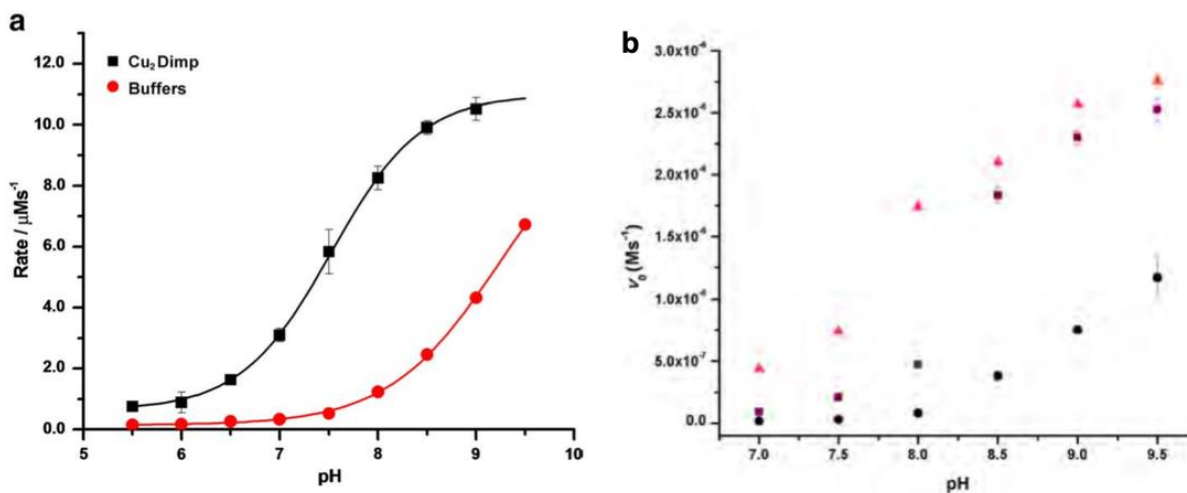


Fig. 2.4.1. Gráficos de variación de V_0 en función del pH: a) $[Cu_2(dimp)]^{4+}$ (■), auto-oxidación del DTBC (●) y b) auto-oxidación del DTBC (●) y $[Cu_2(diep)]^{4+}$ (▲).⁴²

Como se puede observar, existe un cambio en la velocidad inicial de la reacción sin catalizador al variar los valores de pH, sin embargo, la presencia del catalizador provoca un incremento notable en la velocidad inicial a lo largo de la escala de pH.

Al fijar el valor de pH de trabajo y correlacionarlo con la especie activa se observa que la forma $[Cu_2(dimp)(OH)]^{3+}$ y $[Cu_2(diep)(OH)]^{3+}$ se encuentra en mayor

proporción. Con esta aseveración se concluye que la actividad catalítica de los sistemas modelo presentados se ve influenciada por el pH y el entorno de coordinación del cobre (II); tendiendo un pH donde predomine el complejo monohidrolizado las condiciones óptimas para obtener una eficiencia catalítica máxima.

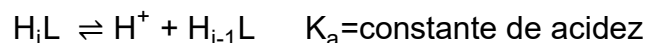
3. Objetivos

3.1. Objetivo general

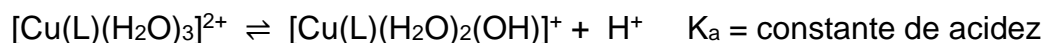
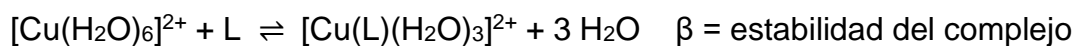
Evaluar la actividad catalítica de los compuestos de coordinación de Cu(II) con ligantes derivados de imidazol en las reacciones de acoplamiento oxidativo de fenoles sustituidos, particularmente del 2-aminofenol; cuyo producto de acoplamiento posee propiedades de interés biológico.

3.2. Objetivos particulares

- Sintetizar los ligantes *miep* y *mimp* mediante la reacción de Mannich y caracterizarlos mediante las técnicas más comunes (AE, IR y RMN-¹H)
- Sintetizar los complejos [Cu(*miep*)] y [Cu(*mimp*)] y caracterizarlos en estado sólido mediante AE, IR y difracción de rayos X.
- Determinar potenciométricamente las constantes de acidez de los ligantes *miep* y *mimp*, de acuerdo con el siguiente equilibrio:



- Determinar potenciométricamente las constantes de formación de los complejos mononucleares β , y sus constantes de hidrólisis, K_a de acuerdo a los siguientes equilibrios:



- Estudiar la actividad catalítica de los complejos [Cu(*miep*)]²⁺ y [Cu(*mimp*)]²⁺ en la reacción de acoplamiento de o-aminofenol en el medio MeOH/H₂O 1:1, variando el pH para correlacionar su actividad con la K_a del complejo.

4. Hipótesis

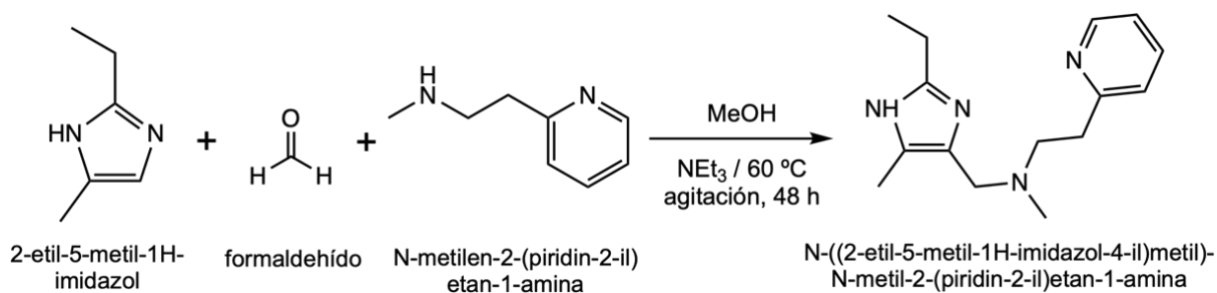
La actividad catalítica de los sistemas modelo de Cu(II): $[\text{Cu}(\text{miep})\text{S}_2]^{2+}$ y $[\text{Cu}(\text{mimp})\text{S}_2]^{2+}$, será óptima con el predominio de la especie $[\text{CuLOH}]^+$, asimismo, complejo $[\text{Cu}(\text{miep})\text{S}_2]^{2+}$ presentará un valor de eficiencia catalítica mayor que el complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})\text{S}_2]^{2+}$ debido al número de miembros en el anillo quelato lo que facilita el cambio de geometría entre los estados Cu^{II} y Cu^{I} .

5. Resultados y discusión

5.1. Síntesis y caracterización del ligante *miep*

5.1.1. Síntesis del ligante *miep* y *mimp*

La síntesis del ligante *miep* se realiza vía una reacción de Mannich en medio básico, favoreciendo únicamente la monosustitución del sitio libre en el anillo imidazólico, de acuerdo al esquema 5.1.1.

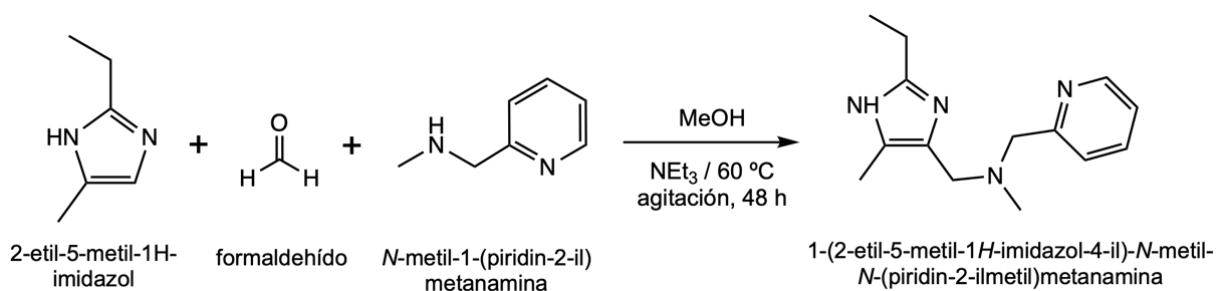


Esquema 5.1.1.1. Reacción de Mannich para la síntesis del ligante *miep*.

Para la síntesis, se mezclan cantidades estequiométricas del imidazol y amina secundaria, con un ligero exceso de base y formaldehído; la reacción se coloca en baño de aceite a 60 °C por 48 horas hasta obtener una solución de color amarillo.

El exceso de disolvente se evapora y se obtiene un aceite amarillo para ambos casos, el cual, se purifica por cromatografía por columna en una mezcla MeOH:CHCl₃ (1:9).

Análogamente, el ligante *mimp* se sintetiza empleando las materias primas presentadas en el esquema 5.1.1.2 y se purifica manteniendo las condiciones antes mencionadas.



Esquema 5.2.1.2. Reacción de Mannich para la síntesis del ligante *mimp*.

Ambos ligantes se caracterizan mediante RMN-¹H, análisis elemental y espectroscopía IR.

5.1.2. Análisis elemental

Con la técnica de análisis elemental se determina el porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno en el ligante, esto nos permite determinar el número de moléculas de agua contenidas en el ligante y asimismo, determinar la fórmula molecular del mismo. En la tabla 5.1.2.1 se muestran los resultados del análisis elemental para ambos ligantes.

Tabla 5.1.2.1. Resultados del porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno obtenido en el análisis elemental de los ligantes *miep* •2H₂O (C₁₅H₂₆N₄O₂) y *mimp* •2H₂O (C₁₄H₂₄N₄O₂).

Elemento	Ligante <i>miep</i>			Ligante <i>mimp</i>		
	%Experimental	%Teórico	%Error	%Experimental	%Teórico	%Error
C	61.21	61.15	0.10	60.21	59.93	0.47
H	7.53	7.47	0.75	7.18	7.13	0.67
N	19.12	19.02	0.53	20.06	19.98	0.43

Gracias a este estudio, se pudo determinar que el ligante *miep* presenta una fórmula molecular C₁₅H₂₂N₄•2H₂O, presentando 2 moléculas de agua por mol de ligante y una masa molar de 294.37 g mol⁻¹. Para el caso del ligante *mimp*, este tiene una fórmula molecular C₁₄H₂₃N₄•2H₂O, conteniendo 2 moléculas de agua por mol de ligante, además su masa molar es de 280.34 g mol⁻¹.

5.1.3. Espectroscopía infrarrojo

Para la caracterización por espectroscopía IR se realiza mediante la elaboración de una pastilla de KBr. A continuación en la figura 5.1.3.1 y 5.1.3.2 se presenta el espectro de IR que se obtuvo para el ligante *miep* y *mimp* respectivamente.

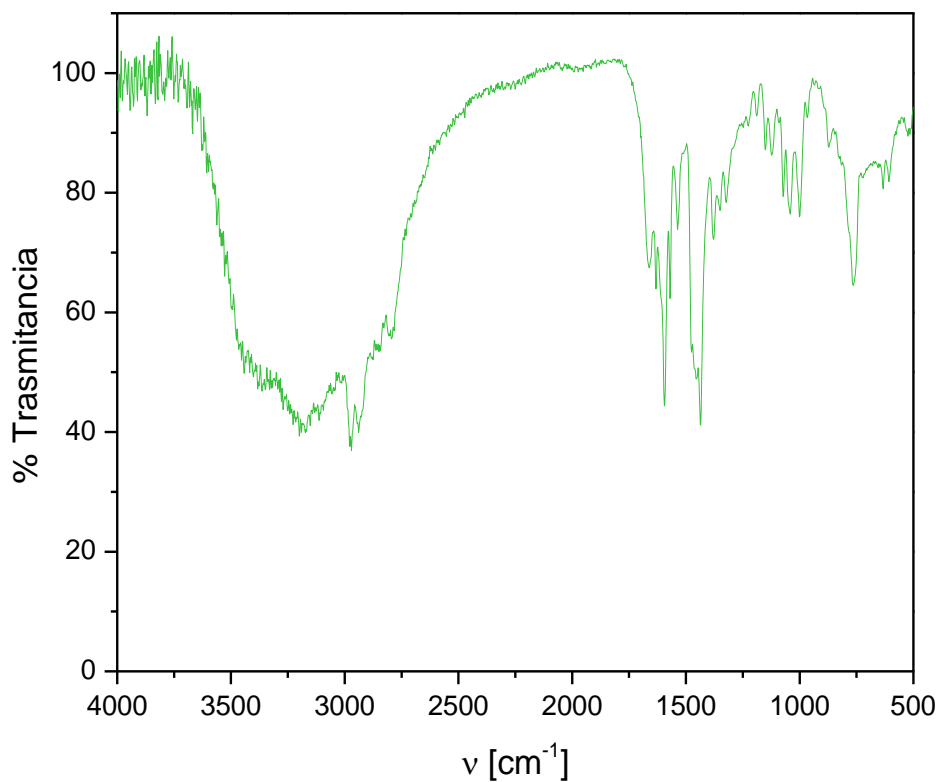


Fig. 5.1.3.1. Espectro de IR para el ligante *miep* en pastilla de KBr.

La asignación de las bandas correspondientes a cada una de las vibraciones de los enlaces presentes en el ligante *miep*, se presentan en la tabla 5.1.3.1.

Tabla 5.1.3.1. Asignación de bandas para el espectro de IR de la fig. 5.1.3.1, donde imi=imidazol, py= piridina y am=amina alifática.

Grupo funcional	ν [cm^{-1}]
$\nu(-\text{CH}_3, -\text{CH}_2-)$	2978, 2935
$\nu(\text{N}=\text{C})_{\text{imi}}$	1666
$\nu(\text{N}-\text{H})_{\text{imi}}$	1595
$\nu(-\text{C}=\text{C}-)_{\text{imi}}$	1537
$\nu(-\text{C}=\text{C}-)_{\text{py}}$	1435
$\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{am}}$	1151
$\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{py}}$	762

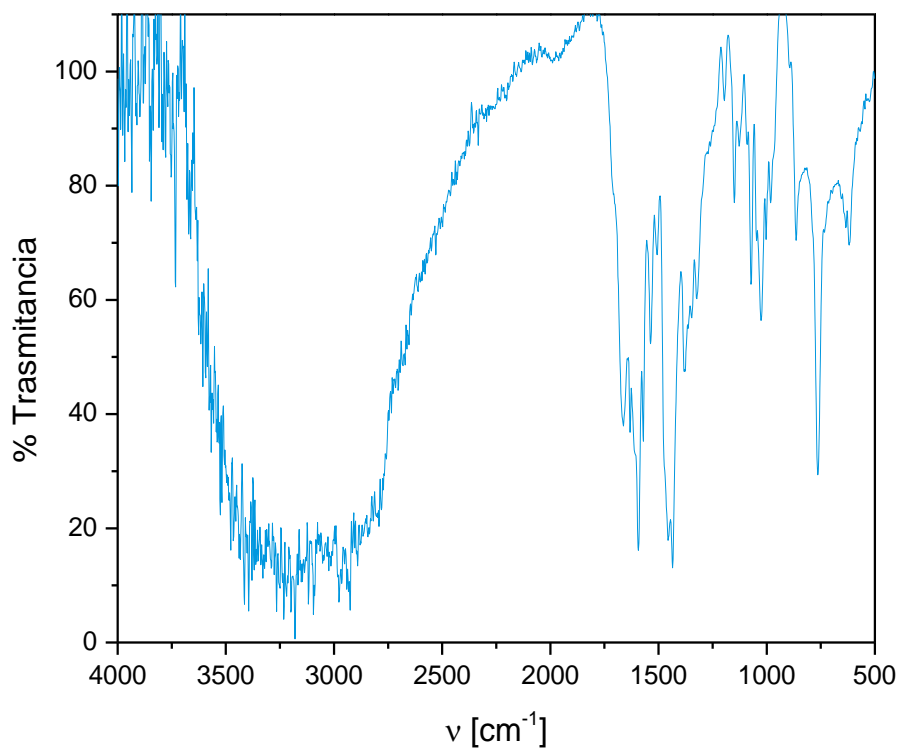


Fig. 5.1.3.2. Espectro de IR para el ligante *mimp* en pastilla de KBr.

Para el ligante mimp, las asignaciones de cada una de las bandas se muestran en la tabla 5.1.3.2.

Tabla 5.1.3.2. Asignación de bandas para el espectro de IR de la fig. 5.1.3.2, donde imi=imidazol, py= piridina y am=amina alifática.

Grupo funcional	ν [cm^{-1}]
$\nu(-\text{CH}_3, -\text{CH}_2-)$	2983, 2933
$\nu(\text{N}=\text{C})_{\text{imi}}$	1662
$\nu(\text{N}-\text{H})_{\text{imi}}$	1593
$\nu(-\text{C}=\text{C}-)_{\text{imi}}$	1537
$\nu(-\text{C}=\text{C}-)_{\text{py}}$	1435
$\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{am}}$	1149
$\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{py}}$	764

Resulta importante señalar que las bandas anchas e intensas que se observan en ambos espectros se deben a las moléculas de agua presentes en los ligantes.

5.1.4. RMN-¹H

La caracterización mediante RMN-¹H de los ligantes se realiza empleando CD₃OD como disolvente para ambos casos. En la fig. 5.1.4.1 se muestra el espectro de RMN-¹H para el ligante *miep*.

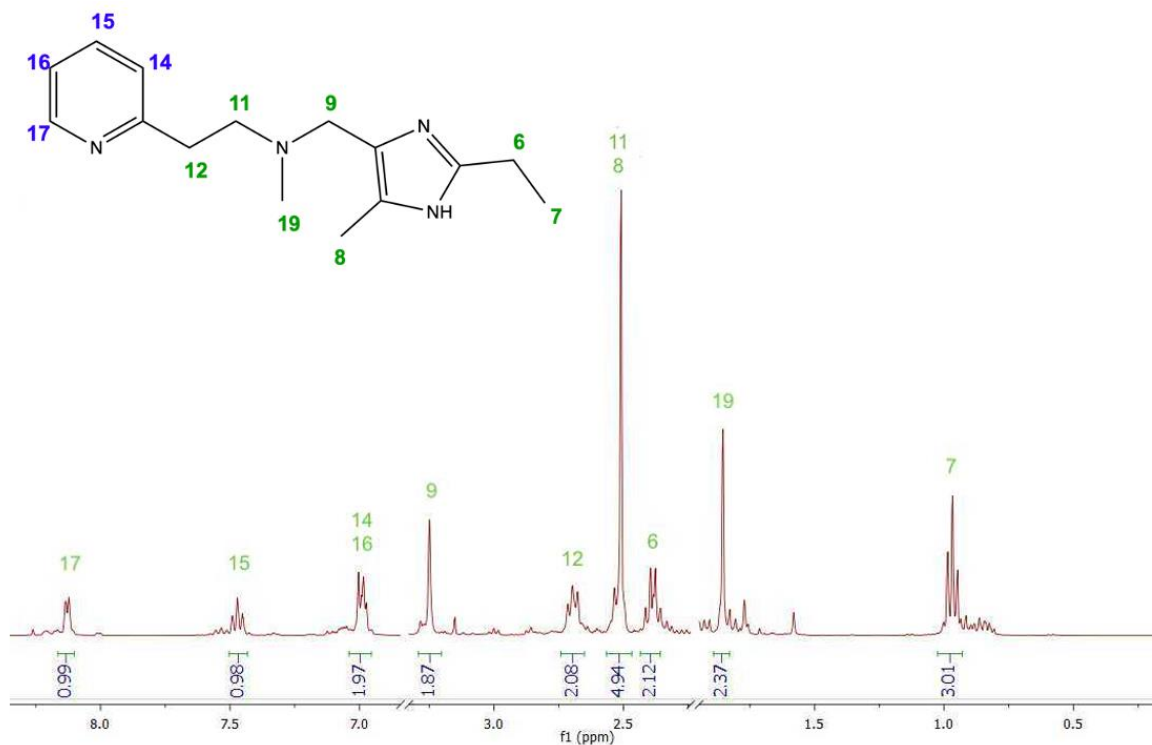


Fig. 5.1.4.1. Espectro de RMN-¹H (400 MHz) en CD₃OD a 25 °C del ligante *miep*.

En el caso del espectro del ligante *miep*, se observan 11 señales relevantes que corresponden a los 11 distintos tipos de protón presentes en la molécula. Primeramente, las señales 14, 15, 16 y 17, corresponden a los protones del anillo aromático de la piridina; las señales 11 y 12 corresponden al etilo unido en la posición orto de la piridina y la amina alifática terciaria.

La señal más relevante es la señal 9, ya que confirma que la condensación entre la amina secundaria y la posición 4 del anillo imidazólico se llevó a cabo. Por último, las señales 6 y 7 corresponden al etilo en la posición 2 del anillo imidazólico, asimismo, la señal 8 pertenece al metilo en la posición 5 del imidazol. En la tabla 5.1.4.1 se presentan los protones con sus respectivos desplazamientos químicos así como el valor de las integrales de cada pico.

Tabla 5.1.4.1. Asignación de señales del espectro de RMN-¹H para el ligante *miep*.

Protón	δ [ppm]	Integral
7	0.90	3
19	1.80	3
6	2.45	2
8	2.50	3
11	2.50	2
12	2.70	2
9	3.25	2
14	6.98	1
16	6.98	1
15	7.45	1
17	8.20	1

Para el caso del ligante *mimp*, el espectro de RMN-¹H se presenta en la figura 5.1.4.2.

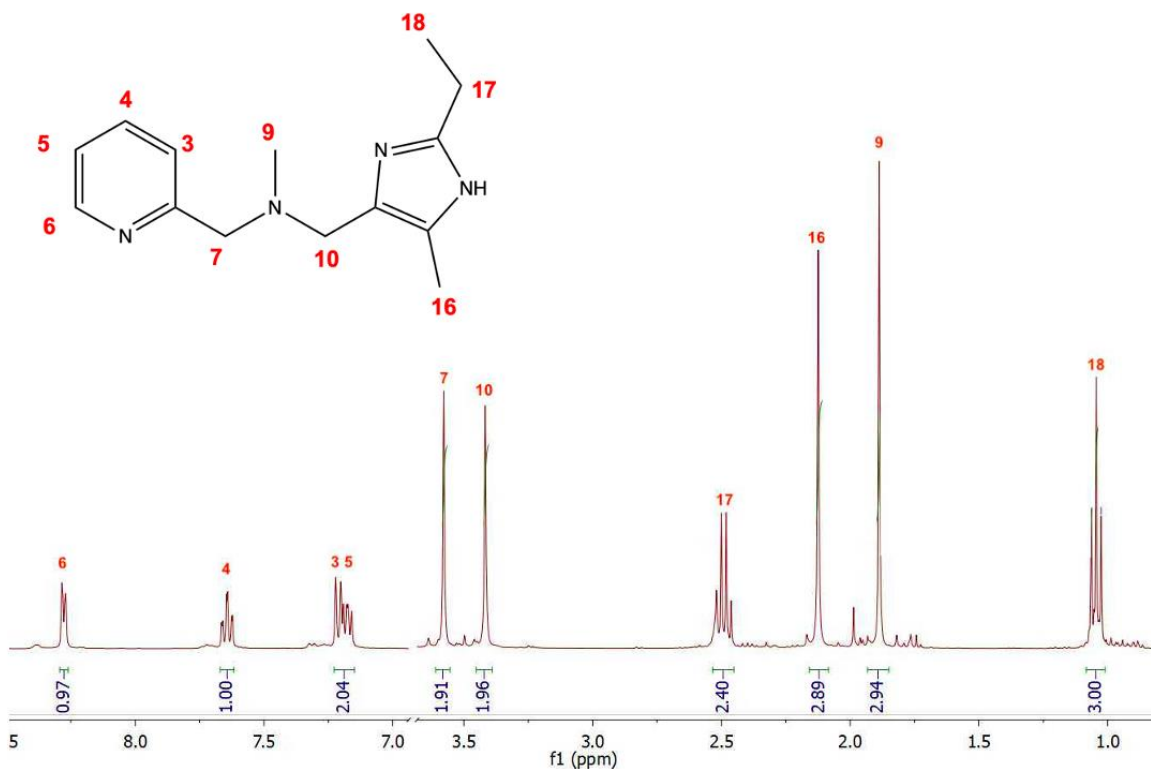


Fig. 5.1.4.2. Espectro de RMN-¹H (400 MHz) en CD₃OD a 25 °C del ligante *mimp*.

En el caso del espectro del ligante *mimp*, se observan 10 señales relevantes que corresponden a los 10 distintos tipos de protón presentes en la molécula. La asignación de las señales se encuentran en la tabla 5.1.4.2, éstas son asignadas de manera análoga que el ligante *miep*.

Tabla 5.1.4.2. Asignación de señales del espectro de RMN-¹H para el ligante *mimp*.

Protón	δ [ppm]	Integral
18	1.10	3
9	1.85	3
16	2.15	3
17	2.50	2
10	3.40	2
7	3.58	2
3	7.20	1
5	7.20	1
4	7.60	1
6	8.28	1

Resulta importante señalar que la diferencia entre estas dos moléculas es el número de carbonos en la cadena alifática que une al anillo aromático de la piridina con el nitrógeno de la amina terciaria, esto se ve reflejado en el desplazamiento de las señales 11 y 12 del ligante *miep*, con respecto a la señal 7 del ligante *mimp*; ya que al haber un mayor número de carbonos en la cadena alifática unida al anillo aromático y a la amina terciaria, el desplazamiento químico de estas señales disminuye por la densidad electrónica que los carbonos adyacentes adicionales pueden aportar.

5.2. Caracterización de los complejos [CuL]

5.2.1. Síntesis de los complejos [Cu(miep)(NO₃)₂] y [Cu(mimp)(NO₃)₂]

Con ambos ligantes es posible obtener compuestos mononucleares de cobre (II) siguiendo la siguiente reacción:

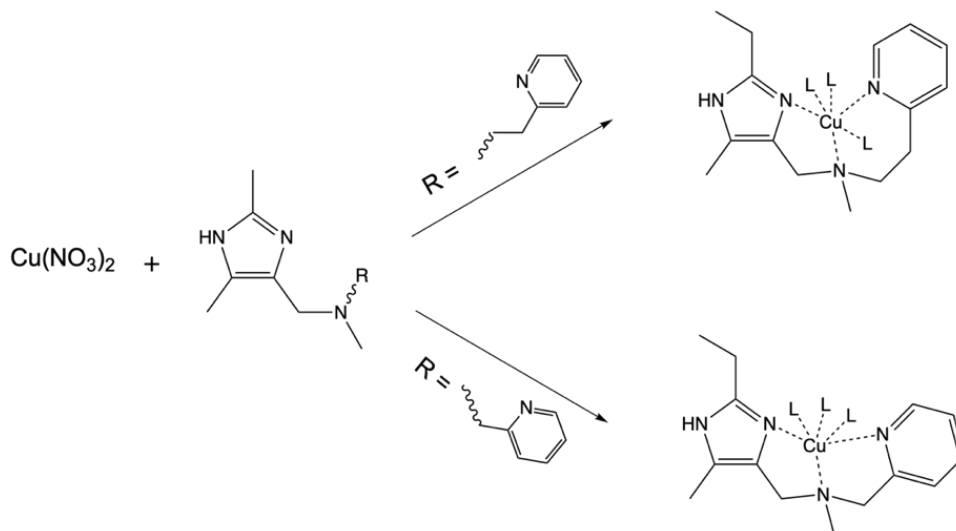


Fig. 5.2.1.1. Esquema de reacción para la síntesis de los complejos [Cu(miep)(NO₃)₂] y [Cu(mimp)(NO₃)₂]

La síntesis se lleva a cabo en MeOH, en el cual se disuelve un equivalente del ligante en cuestión y se agrega un equivalente de la sal de nitrato de cobre(II) previamente disuelto en MeOH.

La mezcla de reacción se deja aproximadamente 15 días, de ella se obtienen cristales de color azul verdoso del tamaño adecuado para su estudio por difracción de rayos X cuyos resultados se muestran más adelante.

5.2.2. Análisis elemental

Al igual que los ligantes, los complejos mononucleares también se caracterizaron mediante análisis elemental. Los cristales obtenidos se analizaron mediante la técnica análisis elemental para determinar la fórmula molecular.

Los resultados de dicho análisis se presentan en la tabla 5.2.2.1.

Tabla 5.2.2.1. Resultados del porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno obtenido en el análisis elemental para los complejos $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ y $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$.

Elemento	$[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$			$[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$		
	%Experimental	%Teórico	%Error	%Experimental	%Teórico	%Error
C	40.22	40.37	0.36	39.07	38.90	0.43
H	4.91	4.93	0.40	4.61	4.63	0.42
N	18.76	18.84	0.41	19.39	19.45	0.30

Teniendo dicho análisis se concluye que los complejos mononucleares presentan una fórmula molecular de $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ y $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ y una masa molar de $445.92 \text{ g mol}^{-1}$ y $431.84 \text{ g mol}^{-1}$, respectivamente.

5.2.3. Espectroscopía IR

Con la finalidad de corroborar la coordinación del catión de cobre(II) al ligante, se llevó a cabo un análisis mediante espectroscopía IR empleando pastilla de KBr. Los espectros obtenidos de los complejos $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ y $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ se presentan en las figuras 5.2.3.1 y 5.2.3.2, respectivamente.

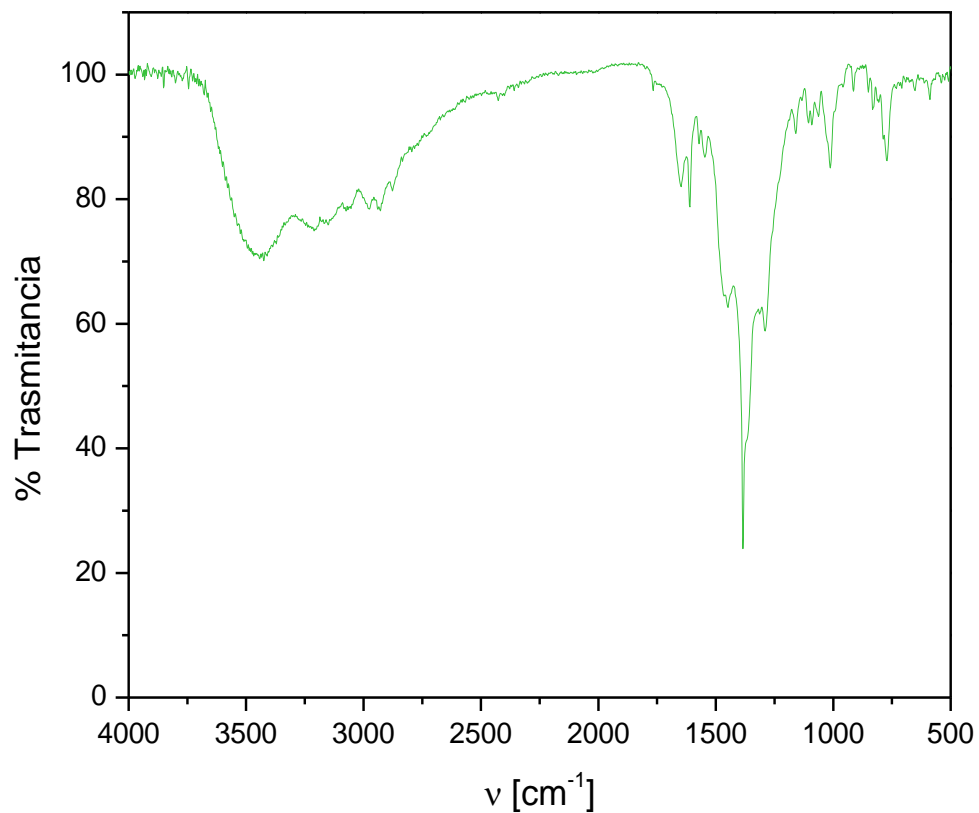


Fig. 5.2.3.1. Espectro IR del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ en pastilla de KBr.

Tabla 5.2.3.1. Asignación de bandas principales en el espectro IR del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$.

Grupo funcional	ν [cm^{-1}]
$\nu(-\text{CH}_3, -\text{CH}_2-)$	2974, 2935
$\nu(-\text{N}=\text{C})_{\text{imi}}$	1647
$\nu(\text{N}-\text{H})_{\text{imi}}$	1572
$\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{am}}$	1105
$\nu(\text{NO}_3^-)$ bidentado	1290, 1448
$\nu(\text{NO}_3^-)$ monodentado	1385

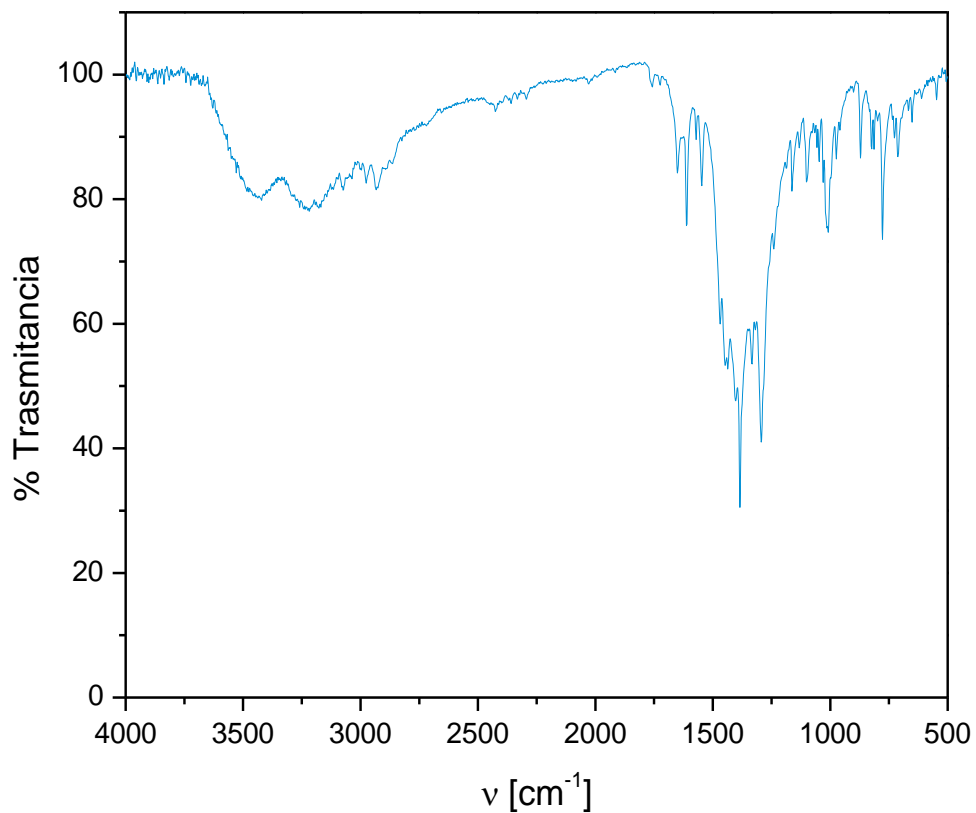


Fig. 5.2.3.2. Espectro IR del complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ en pastilla de KBr.

Tabla 5.2.3.1. Asignación de bandas principales en el espectro IR del complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$.

Grupo funcional	ν [cm^{-1}]
$\nu(-\text{CH}_3, -\text{CH}_2-)$	2976, 2926
$\nu(-\text{N}=\text{C})_{\text{imi}}$	1651
$\nu(\text{N}-\text{H})_{\text{imi}}$	1547
$\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{am}}$	1101
$\nu(\text{NO}_3^-)$ bidentado	1294, 1441
$\nu(\text{NO}_3^-)$ monodentado	1385

En ambos complejos, los aniones nitrato se encuentran coordinados al átomo de cobre(II) de forma monodentadamente y bidentadamente; además existe un desplazamiento de las bandas correspondientes al ligante a valores de número de onda menores, debido a la coordinación de éste al átomo de cobre(II).

5.2.4. Difracción de rayos X

Como ya se mencionó con anterioridad al describir la síntesis de los complejos (sección 5.2.1), se obtuvieron cristales mediante a los cuales se determina la estructura molecular y cristalina en estado sólido por medio de difracción de rayos X.

En la fig. 5.2.4.1, se presenta la estructura obtenida para el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$, asimismo, en la tabla 5.2.4.1 se encuentran las longitudes de enlace de los átomos coordinados al catión de Cu(II).

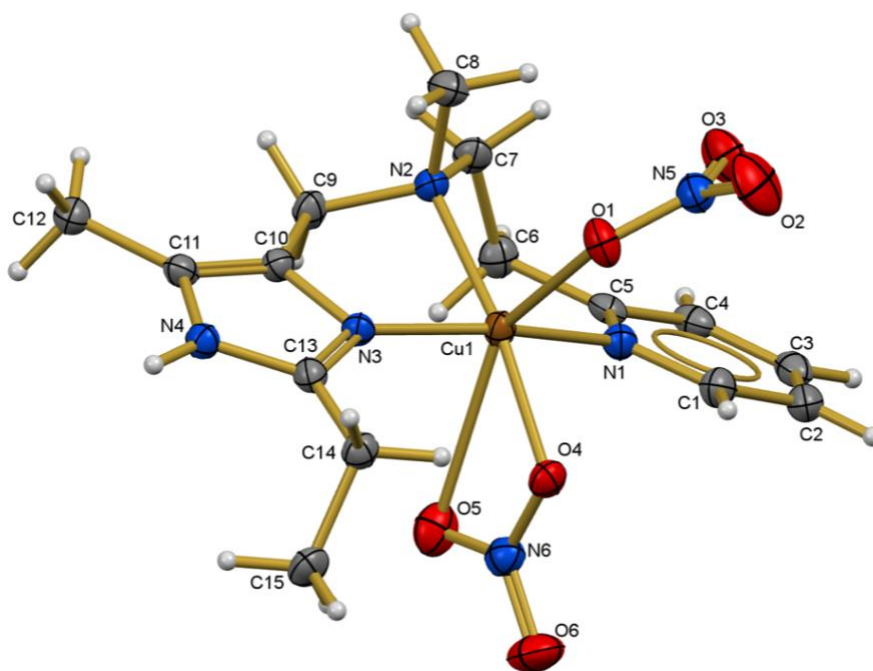


Fig. 5.2.4.1. Estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ determinada mediante difracción de rayos X.

La estructura molecular del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ consiste en un catión de cobre coordinado de forma tridentada al ligante *miep*, un nitrato coordinado de forma monodentada y el segundo anión nitrato coordinado de forma bidentada.

Tabla 5.2.4.1. Distancias de enlace del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ determinadas mediante difracción de rayos X.

Enlace	Distancia [Å]
Cu–N1	1.997
Cu–N2	2.086
Cu–N3	1.969
Cu–O1	2.280
Cu–O4	2.026
Cu–O5	2.625

La esfera de coordinación alrededor del ión Cu(II) se puede describir como un octaédro distorsionado, con los átomos N1, N2 y N3 provenientes del ligante, y el átomo O4, proveniente de un anión nitrato, en el plano del octaedro. Las posiciones axiales se encuentran ocupadas por los O1 y O5, correspondientes a los aniones nitrato.

Los átomos de nitrógeno N1 y N2 coordinados al átomo de cobre(II) forman un anillo quelato de 6 miembros mientras que, los átomos de nitrógeno N2 y N3 coordinados forman un anillo quelato de 5 miembros.

Como se puede observar, las distancias promedio de las posiciones en el plano del octaedro son, en promedio, de 2 Å, mientras que los oxígenos en las posiciones axiales son mayores a dicho valor. Esto se debe al fenómeno de distorsión de Jahn-Teller de elongación.

Por otro lado, la fig. 5.2.4.2. se muestra la estructura obtenida del análisis por difracción de rayos X para el complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$, de la misma forma, en la tabla 5.2.4.2 se encuentran las longitudes de enlace de los átomos dentro de la esfera de coordinación.

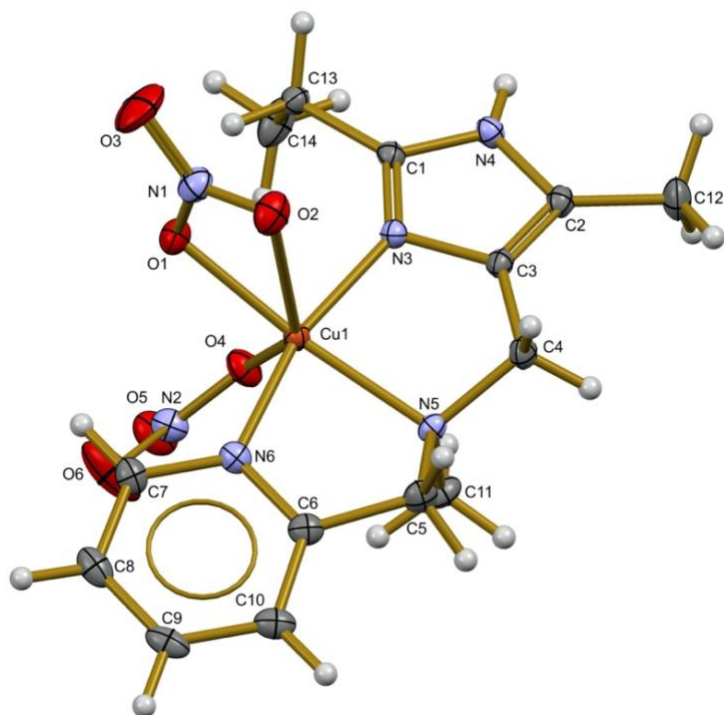


Fig. 5.2.4.2. Estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ determinada mediante difracción de rayos X.

Para el caso del complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$, su estructura cristalina consiste en un catión de Cu(II) coordinado de forma tridentada al ligante *mimp*, y dos nitratos coordinados: uno monodentado y otro bidentado.

Tabla 5.2.4.1. Distancias de enlace del complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ determinadas mediante difracción de rayos X

Enlace	Distancia [Å]
Cu–N3	1.963
Cu–N5	2.066
Cu–N6	1.983
Cu–O1	2.026
Cu–O2	2.665
Cu–O4	2.293

La geometría alrededor del átomo de cobre se describe como un octaedro distorsionado, en la cual los átomos N3, N5, N6 y O1 se encuentran en el plano del octaedro, y los átomos O2 y O4 se encuentran en las posiciones axiales del octaedro. Los átomos de nitrógeno N3, N5 y N6 coordinados al átomo de cobre(II) forman dos anillos quelato de 5 miembros cada uno.

Al igual que para el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$, los valores de distancias de enlace se encuentran alrededor de 2 Å, con excepción de los átomos en posición axial, estos presentan distancias de enlace mayores a 2 Å derivado de la distorsión de Jahn-Teller de elongación.

5.3. Especiación en disolución de los sistemas $L/[\text{CuL}]$

El estudio del predominio de especies a lo largo de la escala de pH resulta ser de gran importancia, ya que los estudios catalíticos en función del pH de los complejos se llevan a cabo en disolución. Debido a esto, conocer la naturaleza de las especies predominantes a las condiciones catalíticas brindan información útil para la interpretación de los resultados posteriores.

En los siguientes apartados se discutirán los resultados obtenidos de la determinación de constantes de acidez para los ligantes, así como las constantes de formación y de hidrólisis para los complejos.

A causa de la emergencia sanitaria que presenta el país debida al SARS-CoV-19, y a la subsecuente enfermedad que provoca: COVID-19; los experimentos de la determinación de los pK_a y constantes de formación e hidrólisis para el complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$ no se concretaron. En el apartado 5.3.1 y 5.3.2 se discutirán únicamente los resultados para el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$.

5.3.1. Determinación de las constantes de acidez (pK_a)

Las constantes de acidez de los ligantes son necesarias para la determinación de las constantes de formación y de hidrólisis de los complejos, por lo cual, se comienza por la determinación de dichos parámetros.

El ligante posee 3 sitios de protonación, provenientes de los 3 átomos donadores por nitrógeno (figura 5.3.1.1); por tal motivo, se preparan disoluciones ácidas de concentración 3mM, 4mM y 5mM del ligante con un exceso de ácido para asegurar su completa protonación.

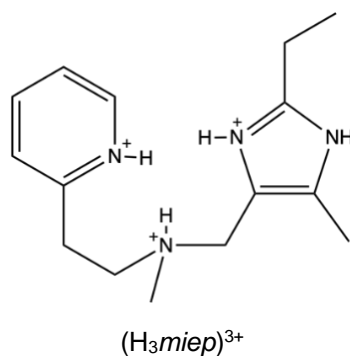


Fig. 5.3.1.1. Estructura del ligante *miep* protonado en sus tres sitios posibles.

Cada una de las disoluciones preparadas se titularon por triplicado con NaOH estandarizado con adiciones de 0.01 mL a temperatura de 25 °C y fuerza iónica 0.1 mol L⁻¹, preparada con KCl.

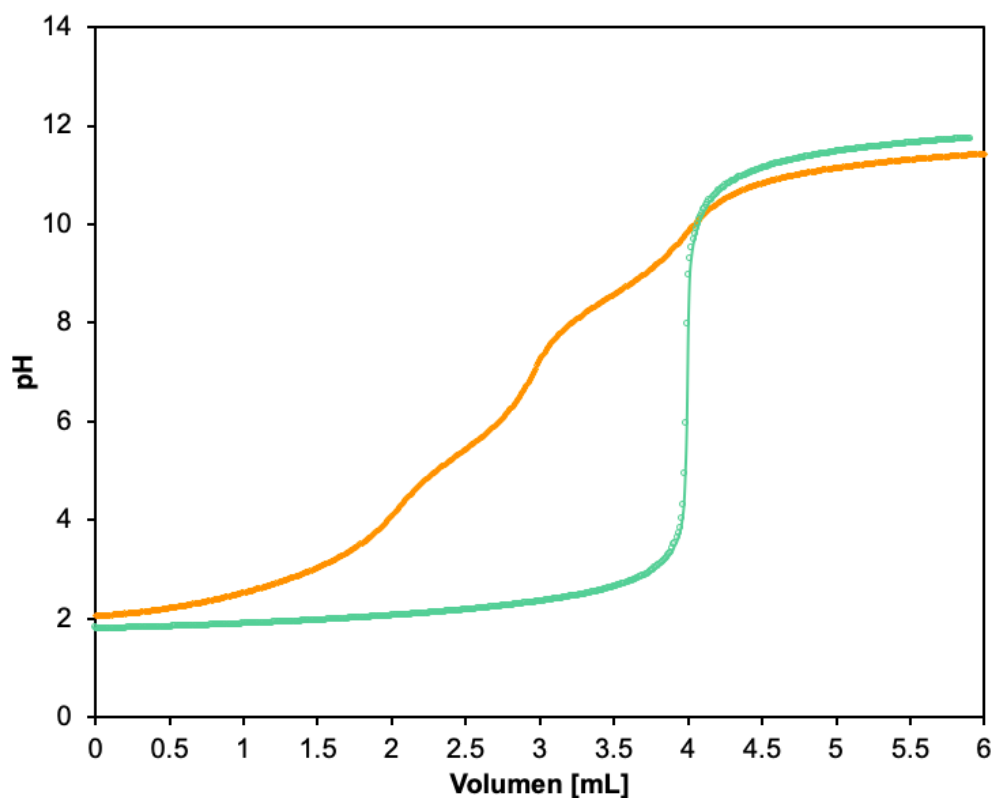


Fig. 5.3.1.1. Curvas de titulación de una disolución de: a) 1 eq. de *miep* + 4 eq. H⁺ (♦) y 4 eq. de H⁺ (●).

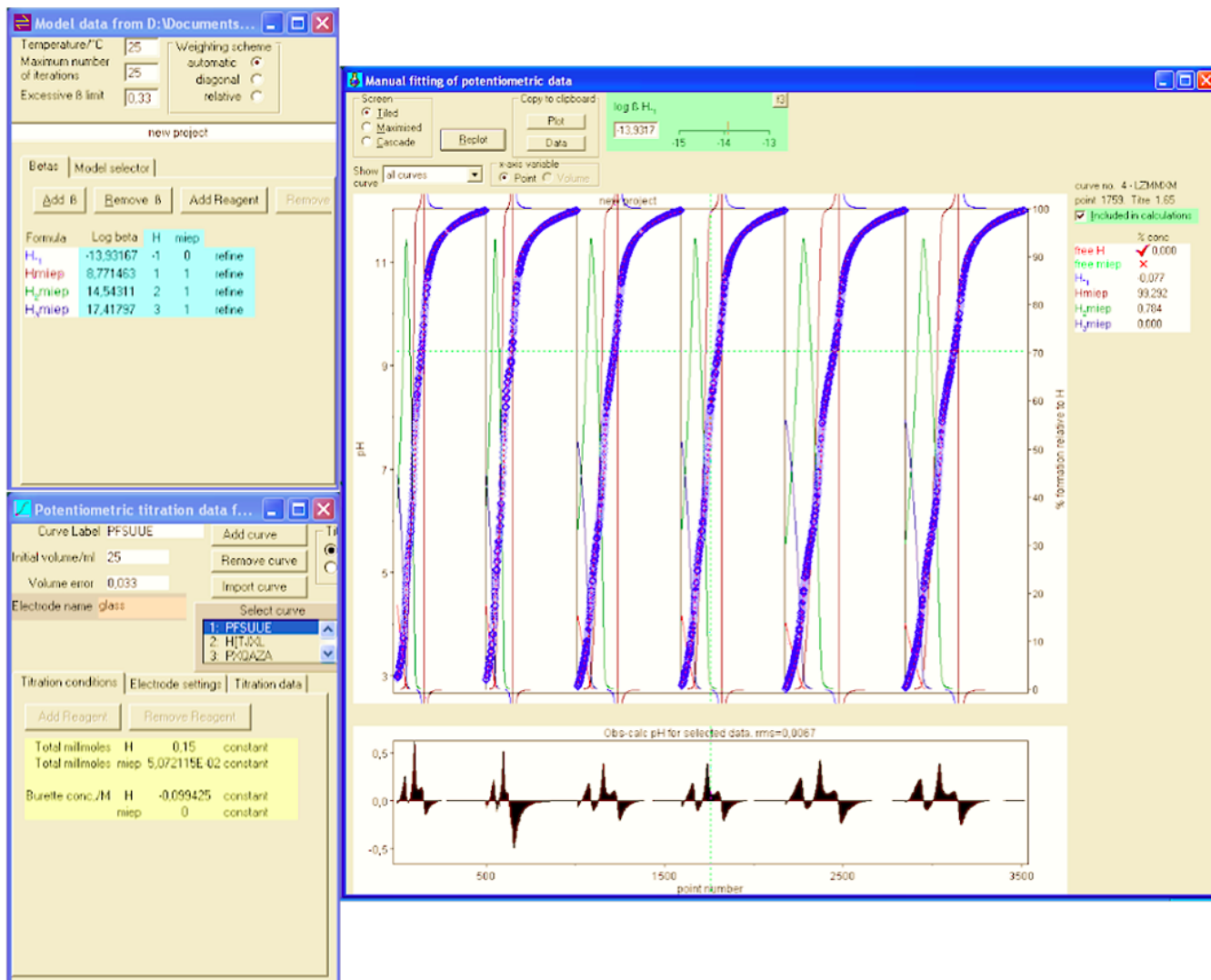
En la fig. 5.3.1.1, se aprecia que la parte final de la curva de titulación del ligante coincide ligeramente con la curva de titulación de 4 eq. de ácido nivelado, lo que asevera que los equivalentes de ácido agregados a la disolución del ligante se titularon por completo.

También se aprecia que el pH de inicio de titulación para el ácido nivelado es menor que para el ligante, esto se debe a que a pesar de tener el mismo número de equivalentes (acidez total), la concentración de iones H⁺ (acidez libre) es distinta. El ligante, al ser un ácido débil, no se disocia completamente, por lo que el pH en el medio es mayor, en comparación con el ácido clorhídrico que, al ser un ácido nivelado, se disocia completamente teniendo un pH más ácido.

El tratamiento de los datos potenciométricos obtenidos se analizaron mediante el programa Hyperquad 2003; con el cual, al proponer un modelo que considera el equilibrio de formación de las especies ácidas se obtienen valores de logβ para cada uno de los ligantes. En la tabla 5.3.1.1 se presentan los valores de logβ y pK_a para el ligante, asimismo, en la fig. 5.3.1.2 se encuentra la captura de pantalla del ajuste de las constantes de acidez para el ligante *miep* en el programa Hyperquad 2003.

Tabla 5.3.1.1. Valores de las constantes sucesivas de formación y pK_a para el ligante *miep* determinadas mediante potenciometría a 25 °C y fuerza iónica I = 0.1 mol L⁻¹.

$\beta_{x,y} = \frac{[H_x L_y]}{[H]^x [L]^y}$	$K_a^{(x)} = \frac{[H_{x-1} L][H^+]}{[H_x L]}$
<i>miep</i>	
logK _w = -13.93	
logβ _{1,1} = 8.77	pK _a ⁽¹⁾ = 8.77
logβ _{2,1} = 14.54	pK _a ⁽²⁾ = 5.80
logβ _{3,1} = 17.42	pK _a ⁽³⁾ = 2.88



A continuación, se presente el diagrama de fracción molar distributiva:

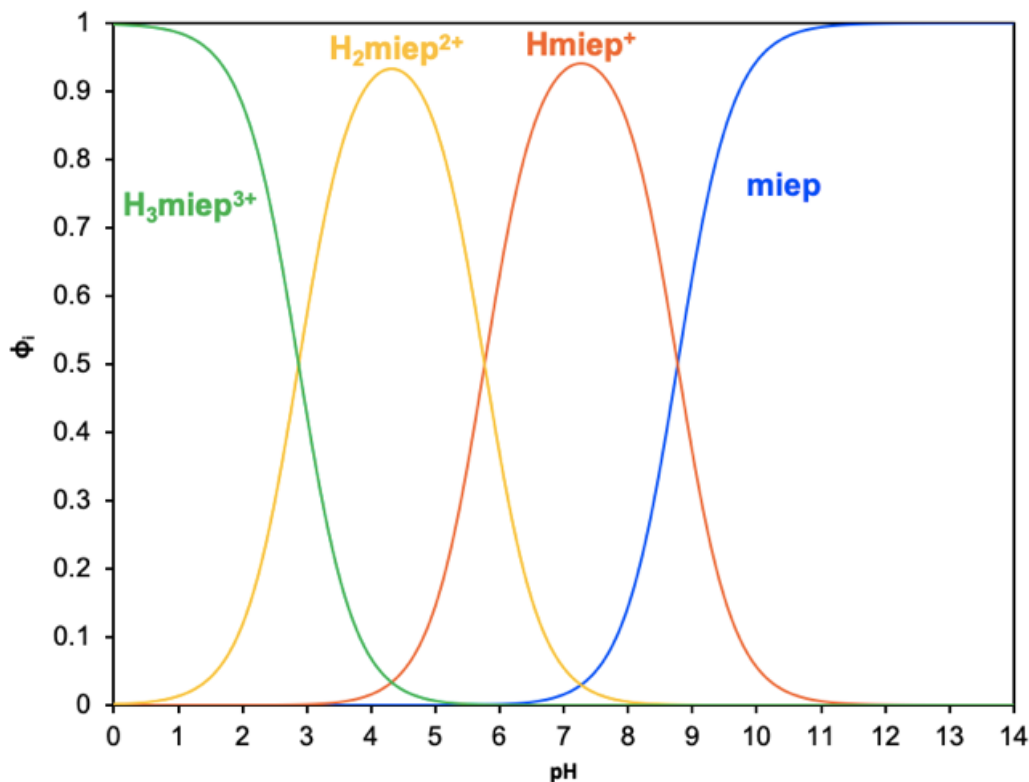


Fig. 5.3.1.2. Diagrama de fracción molar distributiva del ligante *miep* a 25 °C y fuerza iónica 0.1 mol L⁻¹.

Del tratamiento de datos de las titulaciones se lograron determinar tres constantes de acidez para el ligante *miep*.

A pesar de que los estudios potenciométricos realizados no brinden información sobre la asignación de cada valor de pK_a para cada uno de los sitios, es posible proponerlos basándonos en los valores de la literatura. Como sabemos, la molécula del ligante *miep* contiene grupos piridínicos, los cuales presentan un valor de pK_a alrededor de 5.0; el pK_a de los sistemas que contienen grupos imidazólicos presentan valores cercanos a 7.0; y por último, las aminas terciarias tienen un valor de pK_a de aproximadamente 10.0. Con estos datos, se presenta en la fig. 5.3.1.3 las asignaciones respectivas.

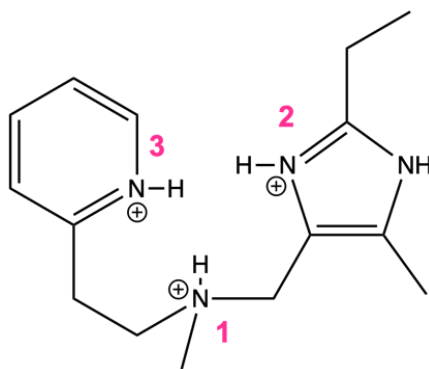


Fig. 5.3.1.3. Propuestas de asignación de valores de pK_a obtenidos para el ligante *miep*: (1) 8.77, (2) 5.80 y (3) 2.88.

5.3.2. Determinación de las constantes de formación e hidrólisis del complejo $[CuL]^{2+}$

Para la determinación de las constantes de formación e hidrólisis del complejo se sigue una metodología similar a la de la determinación de las constantes de acidez del ligante.

Se realizan titulaciones potenciométricas de disoluciones de 3 a 5 mM de los complejos dinucleares formados *in situ* con 4 eq. de ácido nivelado, 1 eq. del ligante y 1 eq. de una disolución estandarizada de Cu(II). Dichas disoluciones se titularon con NaOH previamente estandarizada a una temperatura de 25 °C y una fuerza iónica de 0.1 mol L⁻¹.

En la fig. 5.3.2.1 se presenta la curva de titulación potenciométrica del complejo $[Cu(miep)]^{2+}$, así como, la curva de ácido nivelado y del ligante *miep*.

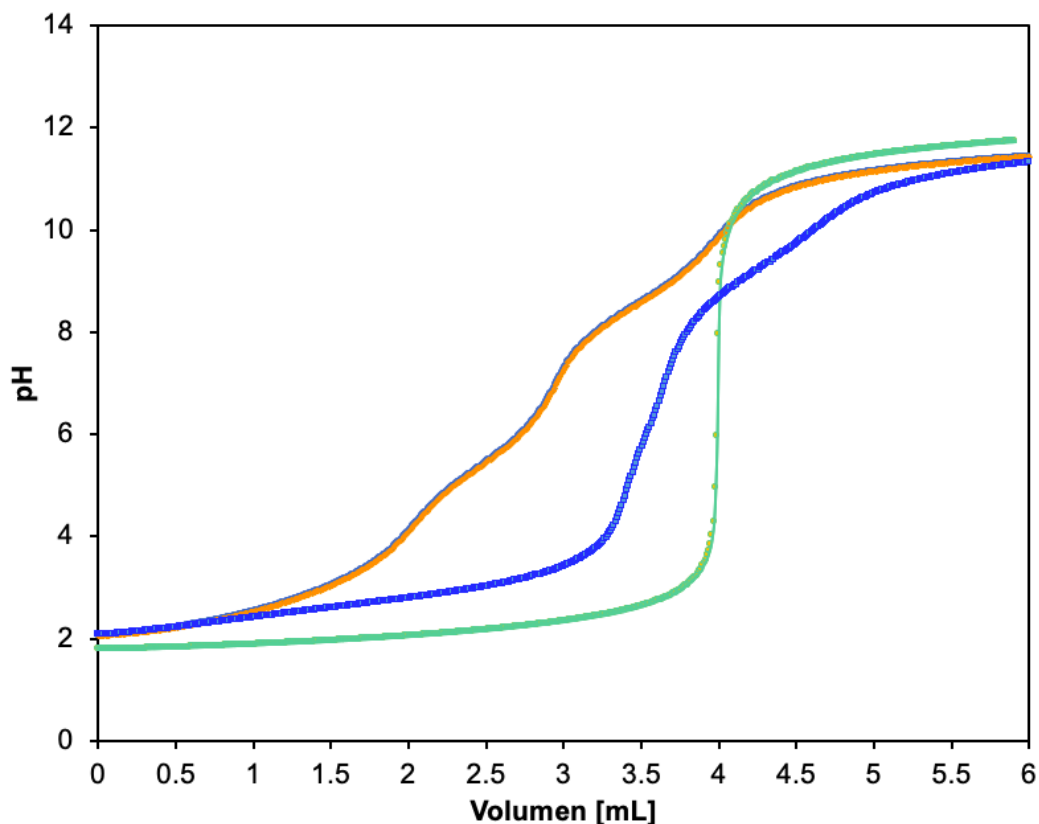


Fig. 5.3.2.1. Curva de titulación potenciométrica de: i. 1 eq. *miep* + 4 eq. H^+ (♦), ii. 4 eq. H^+ (●) y iii. 1 eq. Cu^{2+} , 1 eq. *miep* y 4 eq. H^+ (■) a 25 °C y fuerza iónica 0.1 mol L^{-1} .

De la gráfica de titulación del sistema con el ligante *miep* (fig. 5.3.2.1) podemos discutir que, comparando la zona inicial de las titulaciones, se aprecian nuevamente diferencias en los valores de pH iniciales, siendo estos valores iguales para la curva i y iii; el valor de pH inicial para la curva ii es menor, debido a la acidez libre en cada una de las disoluciones.

Un valor de pH inicial mayor para las curvas de titulación i y iii se debe a una menor cantidad de iones H^+ libres a consecuencia de la protonación del ligante, esto puede interpretarse como que el ligante debe desprotonarse para poder formar el complejo. Sin embargo, al paso en el que el ligante comienza desprotonarse, éste se coordina al catión de $Cu(II)$ formando la especie $[Cu(Hmiep)]^{3+}$, por lo que la curva de titulación i y iii dejan de empalmarse dada la formación de dicho complejo.

Además, al comparar el transcurso de la curva **ii** y **iii** en función de los equivalentes añadidos de NaOH es notable la diferencia después de añadir 3.5 eq. de OH⁻; este fenómeno se le atribuye a la formación del complejo [Cu(*miep*)]²⁺.

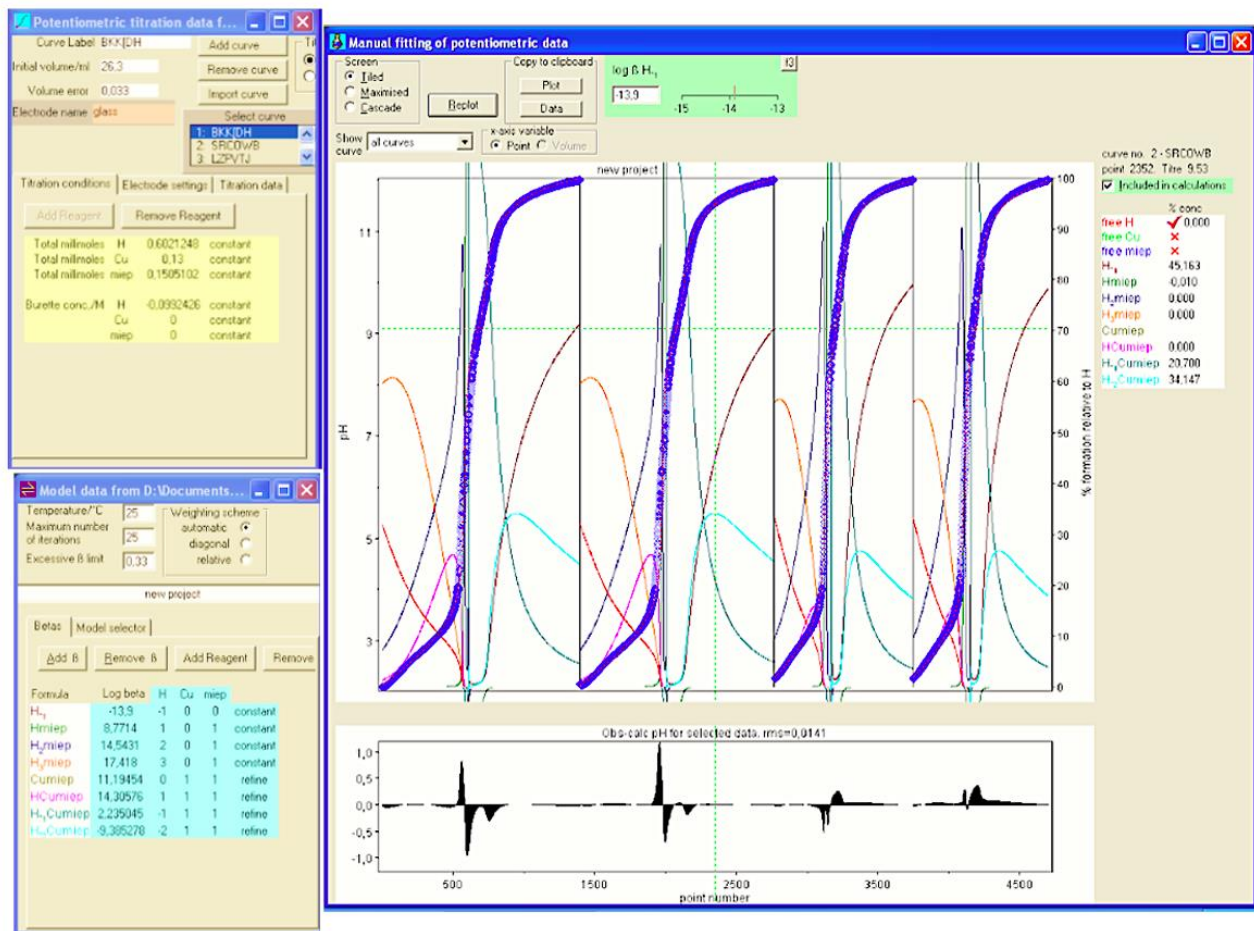
La hidrólisis del complejo formado se logra distinguir entre 4 y 4.5 eq. de OH⁻.

A partir de los datos obtenidos de las titulaciones potenciométricas y a su vez, determinadas las constantes de acidez del ligante *miep*, se realiza el ajuste de las constantes de formación e hidrólisis de los complejos de Cu(II) mediante el programa Hyperquad 2003. Los resultados obtenidos se presentan a continuación, en la tabla 5.3.2.1.

Tabla 5.3.2.1. Resultados de la determinación de constantes de formación e hidrólisis de los complejos [Cu(*miep*)]²⁺ y [Cu(*mimp*)]²⁺ a 25 °C e I = 0.1 mol L⁻¹.

$\beta_{x,y,z} = \frac{[\text{Cu}_x^{2+}\text{H}_y\text{L}_z]}{[\text{Cu}^{2+}]^x [\text{H}]^y [\text{L}]^z}$		$K_a^{(i)} = \frac{[\text{Cu}_x^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{6-i}(\text{OH})_i][\text{H}^+]^i}{[\text{Cu}_x\text{L}(\text{H}_2\text{O})_{6-i+1}(\text{OH})_{i-1}]}$	
[Cu(<i>miep</i>)] ²⁺			
logK _w = -13.9			
logβ _{1,0,1} = 11.19			
logβ _{1,1,1} = 14.31			
logβ _{1,-1,1} = 2.24		pK _a ⁽¹⁾ = 8.95	
logβ _{1,-2,1} = -9.38		pK _a ⁽²⁾ = 11.62	

Adicionalmente, en la fig. 5.3.2.2 se presenta una captura de pantalla del ajuste de tres curvas de valoración refinadas simultáneamente para obtener los valores presentados en la tabla 5.3.2.1.



Por otro lado, en la figura 5.3.2.3 se presentan los diagramas de fracción molar distributiva contruidos a partir de las constantes de formación e hidrólisis determinadas.

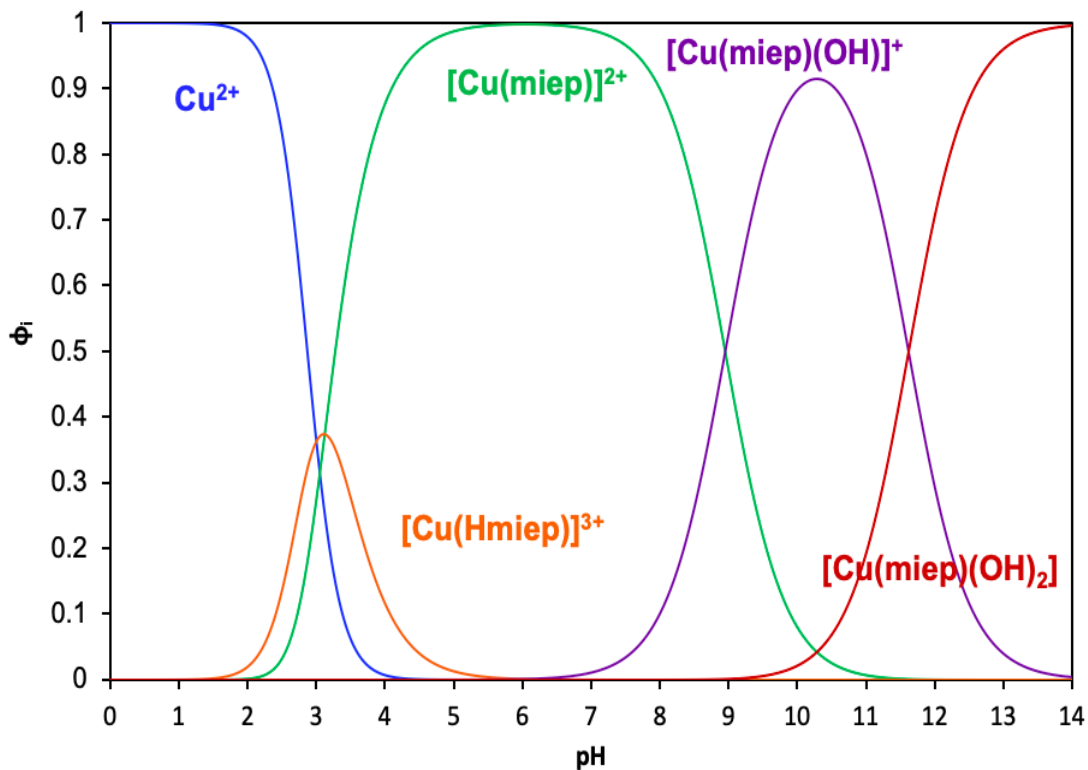


Fig. 5.3.2.3. Diagramas de fracción molar distributiva para el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ a 25 °C y fuerza iónica 0.1 mol L⁻¹.

Como se puede observar en el diagrama, el complejo $[\text{Cu}(\text{Hmiep})]^{3+}$ alcanza a formarse en un máximo de 36% a un pH alrededor de 3.2, sin embargo, nunca predomina ya que a este mismo valor de pH la proporción del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ es similar.

Por otro lado, la especie $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ sí alcanza un predominio de prácticamente el 100% sucede en el intervalo de $5.5 \leq \text{pH} \leq 6.7$, las especies hidrólizadas $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{OH})]^+$ y $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{OH})_2]$ comienzan a predominar en pH mayor a 9 y 12, respectivamente.

5.4. Estudios cinéticos de los complejos $[Cu(miep)]^{2+}$ y $[Cu(mimp)]^{2+}$

Con el objetivo de evaluar la actividad catalítica de los complejos de Cu(II), como catalizadores en el acoplamiento oxidativo del *o*-aminofenol (OAP) para dar como producto 2-amino-3*H*-fenoxazin-3-ona (actividad fenoxazinona sintasa). La reacción catalítica se monitorea mediante espectroscopía UV-vis a una λ_{max} de 430 nm, correspondiente a la absorción de la fenoxazinona, en los primeros instantes de la reacción.

En el estudio catalítico, intervienen diversos factores que deben ser controlados a lo largo de la experimentación, como son:

- Temperatura: este parámetro se controla colocando las disoluciones en un baño de agua a 25 °C y con un peltier cuando se realiza el estudio cinético en el espectrofotómetro UV-vis.
- Medio de reacción: se emplea un medio MeOH:H₂O_{pH} (1:1) en todas las disoluciones, ya que el OAP es poco soluble en agua.
- pH del medio: las soluciones se amortiguan con una serie de distintos buffers en medio MeOH:H₂O_{pH} (1:1). La relación [Buffer]:[Complejo], va de 830 hasta 5000, por lo que se asegura de que las especies presentes al pH impuesto, son las responsables de dicha actividad. Por otro lado, la relación [Buffer]:[Sustrato] va desde 15 hasta 1000. Debido a que la solubilidad del buffer no es posible preparar disoluciones de mayor concentración.
- Concentración de O₂ en la solución: se mantiene relativamente constante, con el O₂ disuelto del aire a 586 mmHg, presión de la Ciudad de México.

En el estudio de la actividad catalítica, como primera aseveración se propone emplear el modelo cinético de Michaelis-Menten, debido a que estudios de actividad fenoxazinona sintasa que presentan muchos complejos bioinspirados de Cu(II) reportados en la literatura presentan un dicho comportamiento.⁴⁷ Cabe destacar que para emplear dicho modelo se debe realizar una serie de experimentos previos para establecer las condiciones adecuadas para proponer dicho modelo enzimático. Primeramente se realiza una gráfica de la variación de la velocidad inicial en función

del pH, lo que nos permite determinar un valor de pH en el que el proceso oxidativo es óptimo y a su vez, nos ayuda a proponer una especie activa capaz de catalizar el acoplamiento del 2-aminofenol. Posteriormente, se realiza una gráfica de la variación de la velocidad inicial en función de la concentración de catalizador, con la finalidad de poder aseverar que el modelo de Michaelis-Menten puede emplearse; se espera que esta gráfica presente un comportamiento lineal. Por último, se evalúa la variación de la velocidad inicial frente a la variación de la concentración de sustrato de acuerdo al modelo matemático de Michaelis-Menten para determinar los parámetros cinéticos: K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M .

En los siguientes apartados se presentará los resultados obtenidos de los estudios cinéticos de la reacción de acoplamiento oxidativo del OAP, empleando como catalizadores $[Cu(miep)]^{2+}$ y $[Cu(mimp)]^{2+}$.

5.4.1. Variación de la velocidad inicial en función del pH

Se sabe que el pH del medio puede modificar la esfera de coordinación de $Cu(II)^{52}$, por ende, resulta relevante realizar el estudio del efecto de la variación de la velocidad inicial en función del pH para los complejos de este trabajo; en este caso, se mantuvieron constantes las concentraciones de OAP (2 mmol L^{-1}), de catalizador (0.04 mmol L^{-1}) y buffer (0.016 mol L^{-1}); y se emplearon distintos pares ácido-base para amortiguar el pH en un intervalo de $7.0 \leq \text{pH} \leq 9.5$; las especies empleadas para el amortiguamiento del pH se encuentran en el apartado 7.6.1.

En la fig. 5.4.1.1 se presenta la gráfica de la variación inicial en función del pH para el sustrato sin catalizador (\blacklozenge), sustrato con $[Cu(miep)]^{2+}$ (\bullet) y sustrato con $[Cu(mimp)]^{2+}$ (\bullet).

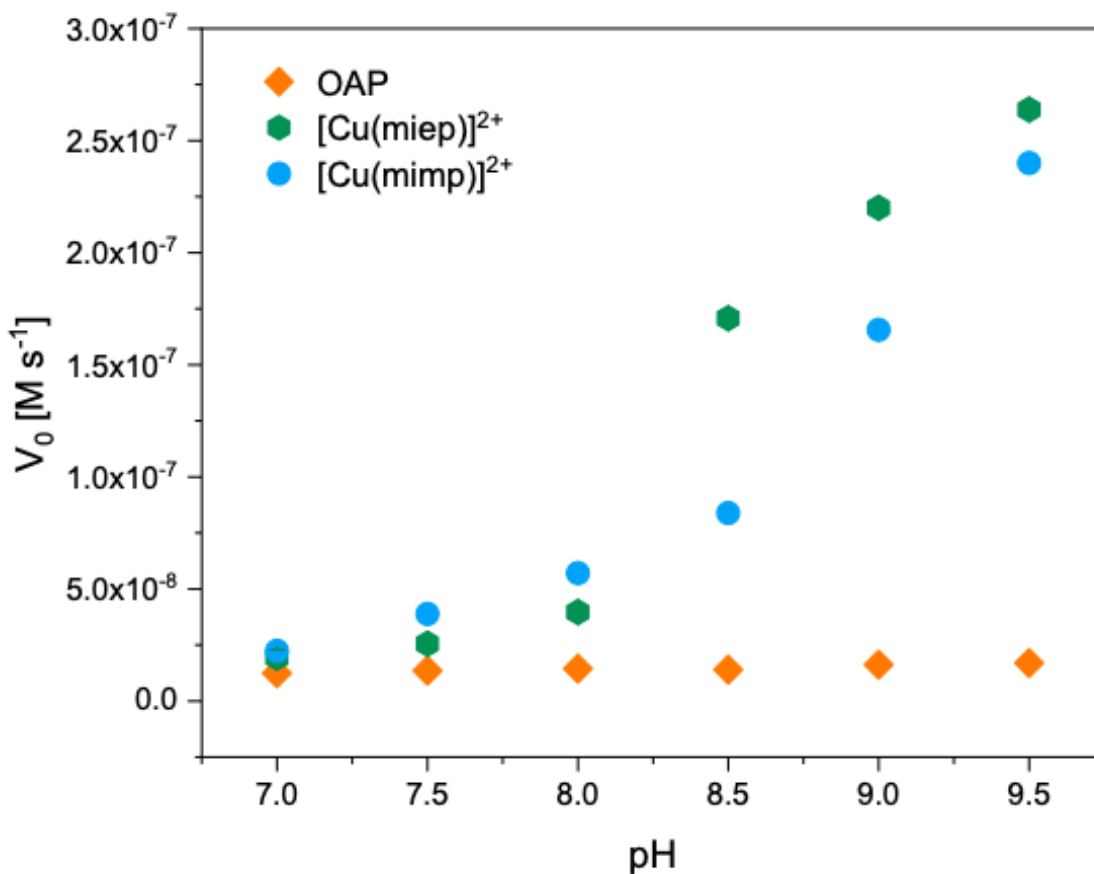


Fig. 3.4.1.1. Gráfica de la variación de la velocidad inicial (V_0) en función del pH para (♦) OAP (2 mmol L^{-1}) + Buffer (0.016 mol L^{-1}); (●) OAP (2 mmol L^{-1}) + $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ (0.04 mmol L^{-1}) + Buffer (0.016 mol L^{-1}) y (●) OAP (2 mmol L^{-1}) + $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$ (0.04 mmol L^{-1}) + Buffer (0.016 mol L^{-1}).

Se encontró que la oxidación del OAP en ausencia de catalizador no depende significativamente del valor del pH del medio, ya que para que ocurra el acoplamiento oxidativo del 2-aminofenol debe de existir el anión fenolato y este, no se encuentra en cantidades apreciables en el intervalo de trabajo debido a que el valor de pK_a es 9.97^{54} ; sin embargo, la presencia de los catalizadores repercute en un incremento significativo de la velocidad inicial a valores de pH superiores a 8.0 en ambos casos.

En la figura 3.4.1 se puede notar lo siguiente:

- i. Para ambos catalizadores se observa un máximo en la velocidad inicial a pH 9.5.
- ii. La mayor actividad catalítica es del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$.
- iii. A pH 8.5 existe una mayor diferencia en las velocidades iniciales.

Al relacionar estos resultados con los diagramas de distribución de especies presentados en el apartado 5.3.2, podemos observar que la especie hidroxilada del complejo con el ligante $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ comienza a formarse aproximadamente a pH de 7, sin embargo su predominio comienza a pH superior a 9.0, debido a esto, se propone que la especie por la cual se exhibe una alta actividad catalítica al pH de 9.5 es el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{OH})]^+$ a pesar de que exista una fracción considerable del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$.

Los estudios posteriores se realizaron a pH 8.5, para comparar la diferencia de la actividad catalítica en dicho salto significativo y a pH 9.5 para asegurar el predominio de la especie activa.

Por otro lado, como ya se hizo mención, debido a la contingencia sanitaria, no se pudieron determinar las constantes de formación para el complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$, sin embargo, los estudios presentados más adelante para dicho catalizador se realizaron a pH 8.5 y 9.5, basándonos en el comportamiento presentado en la figura 3.4.1, en donde se propone que la especie activa sea también $[\text{Cu}(\text{mimp})\text{OH}]^+$ debido al incremento de la V_0 frente a la variación del pH.

5.4.2. Variación de la velocidad inicial en función de la concentración del catalizador

Este experimento es de suma importancia para conocer el orden de reacción con respecto al catalizador ya que, si este presenta una relación proporcional entre la velocidad inicial y la concentración de catalizador, la reacción será de primer orden; este comportamiento es una condición necesaria para emplear el modelo matemático de Michaelis-Menten.

Los estudios se realizaron a una temperatura de 25 °C en una mezcla de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}_{\text{pH}}$ (1:1) y valores de pH 8.5 y 9.5 para ambos catalizadores. Estos valores de pH se tomaron con base en el estudio presentado en el apartado 5.4.1 donde, a pH 8.5 existe un incremento significativo de la velocidad inicial y, a pH 9.5, se da el máximo valor de velocidad inicial en el intervalo de pH de trabajo.

Se amortiguó el pH con una disolución de buffer CHES 0.1 mol L⁻¹, la concentración de sustrato fue de 2 mmol L⁻¹ y se fue variando la concentración de los complejos de cobre (II) de 0.02 – 0.1 mmol L⁻¹. Las gráficas obtenidas así como su ajuste lineal se presentan a continuación:

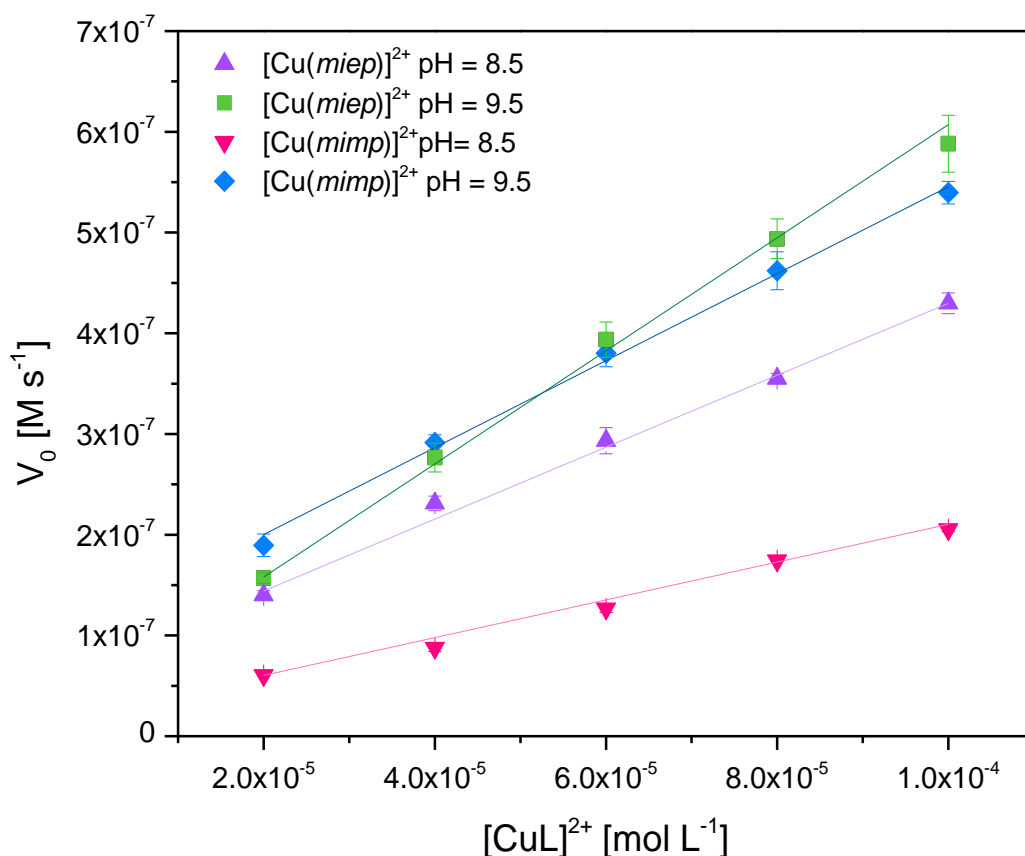


Fig. 5.4.2.1. Gráfico de la dependencia de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de: [Cu(miep)]²⁺ a pH 8.5 (▲) 9.5 (■); [Cu(mimp)]²⁺ a pH 8.5 (▼) y 9.5 (◆) en MeOH:H₂O_{pH} (1:1) a 25 °C.

Se encontró una dependencia lineal entre la velocidad inicial y la concentración de catalizador; esto indica que el orden de reacción en el intervalo de concentraciones estudiadas es de primer orden para ambos catalizadores. Dicho esto, la ecuación de velocidad se expresa como:

$$v = k_{\text{obs}}[[\text{CuL}]^{2+}]$$

En donde k_{obs} es una constante de velocidad y $[[CuL]^{2+}]$ es la concentración del catalizador.

Los valores de k_{obs} , correspondiente a la pendiente de la recta, así como el valor del coeficiente de determinación se presentan en la tabla 5.4.2.1 para ambos catalizadores.

Tabla 5.4.2.1. Valores de la k_{obs} y el coeficiente de determinación para los complejos en medio MeOH:H₂O_{pH}.

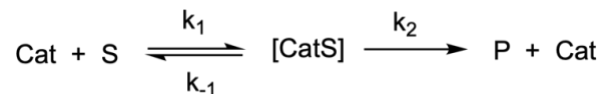
Catalizador	pH	$k_{obs} [x10^{-3} s^{-1}]$	$\sigma [x10^{-3} s^{-1}]$	r^2
[Cu(<i>miep</i>)(OH)] ⁺	8.5	3.57	0.14	0.994
	9.5	5.61	0.14	0.998
[Cu(<i>mimp</i>)(OH)] ⁺	8.5	1.88	0.042	0.998
	9.5	4.32	0.14	0.996

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 5.4.2.1, se afirma que para evaluar la actividad catalítica de los complejos se puede emplear el modelo de Michaelis-Menten, ya que los coeficientes de correlación son $r^2 \geq 0.99$.

Además, los resultados de la tabla 3.4.2 muestran que, el complejo [Cu(*miep*)]²⁺ es el catalizador que presenta una k_{obs} mayor, comparando los mismos valores de pH. Esto puede atribuirse a que en su estructura dicho complejo presenta un anillo quelato de 6 miembros, en comparación con el complejo [Cu(*mimp*)]²⁺, lo que le confiere una mayor flexibilidad para que ocurra el rearrreglo geométrico entre los cambios de oxidación de Cu^{II} a Cu^I. De esta forma, el complejo [Cu(*miep*)]²⁺ transforma un mayor número de moléculas de sustrato a producto en un menor tiempo, en comparación con el complejo [Cu(*mimp*)]²⁺.

5.4.3. Variación de la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato

El modelo enzimático de Michaelis-Menten considera que la reacción catalítica global está constituida por dos etapas. En la primer etapa se forma un complejo entre el catalizador (Cat) y el sustrato (S), formándose el complejo catalizador-sustrato ([CatS]); y en la segunda etapa, el complejo formado se descompone en el producto (P) y el catalizador que se regenera, de acuerdo al siguiente esquema:



La velocidad de reacción se representa de la siguiente manera:

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{CatS}]$$

Para emplear el modelo de Michaelis-Menten, la velocidad de la reacción debe ser evaluada en los primeros instantes (velocidad inicial), cuando la concentración del producto es mínima, y por lo tanto la reacción inversa puede considerarse insignificante. Se plantea que la reacción es irreversible ya que el producto no vuelve a ligarse con el catalizador una vez que se efectúa la reacción.

Con estas consideraciones, se puede emplear la aproximación del estado estacionario, ya que la concentración formada del complejo [CatS] es pequeña y se mantiene casi constante a lo largo de la reacción, esto significa que las velocidades de formación y de disociación de [CatS] son iguales, obteniéndose así la ecuación 1.

$$\frac{d[\text{CatS}]}{dt} = k_1[\text{Cat}][\text{S}] - k_{-1}[\text{CatS}] - k_2[\text{CatS}] = 0 \quad \text{Ec. 1}$$

Si se despeja [CatS] de la ecuación 1, se obtiene:

$$[\text{CatS}] = \frac{k_1[\text{Cat}][\text{S}]}{k_{-1} + k_2} \quad \text{Ec. 2}$$

Y se asume que en la reacción catalítica, la concentración del catalizador libre es igual a la concentración inicial del catalizador menos la concentración del complejo [CatS] formado:

$$[\text{Cat}] = [\text{Cat}]_0 - [\text{CatS}] \quad \text{Ec. 3}$$

Sustituyendo la ecuación 3 en la ecuación 2, se obtiene:

$$\text{Ec. 4}$$

$$[\text{CatS}] = \frac{k_1([\text{Cat}]_0 - [\text{CatS}])[S]}{k_{-1} + k_2}$$

Se define entonces la relación entre las constantes cinéticas como la constante de Michaelis-Menten, K_M :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Ec. 5}$$

Entonces:

$$[\text{CatS}] = \frac{([\text{Cat}]_0 - [\text{CatS}])[S]}{K_M} \quad \text{Ec. 6}$$

Reordenando la ecuación 6, tenemos que:

$$K_M[\text{CatS}] = [S][\text{Cat}]_0 - [\text{CatS}][S]$$

$$[\text{CatS}] = \frac{[\text{Cat}]_0[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. 7}$$

Se define entonces la velocidad de la reacción como:

$$\frac{dP}{dt} = k_2[\text{CatS}] \quad \text{Ec. 8}$$

Si sustituimos la ecuación 7 en 8, obtenemos:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \frac{[\text{Cat}]_0[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. 9}$$

La velocidad máxima a la que la reacción puede llegar ocurre cuando todo el catalizador se encuentra unido al sustrato, $[\text{Cat}]_0 = [\text{CatS}]$:

$$V_{\text{max}} = k_2[\text{Cat}]_0 \quad \text{Ec. 10}$$

Así finalmente obtenemos la expresión del modelo matemático de Michaelis-Menten:

$$V_o = V_{\text{max}} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. 11}$$

La constante k_2 también conocida como constante catalítica, k_{cat} , o número de recambio, nos indica el número de moléculas de sustrato transformadas en producto por unidad de tiempo por molécula de catalizador.

De acuerdo al modelo enzimático de Michaelis-Menten, la constante K_M , indica la afinidad de la enzima por el sustrato. El parámetro cinético K_M relaciona las constantes cinéticas del proceso catalítico global, dado que $k_2 \ll k_1$, entonces la

constante se reescribe como $\frac{k_1}{k_1}$, siendo esta constante una relación equivalente al equilibrio de disociación del complejo [CatS]. Dicho esto, tener valores elevados de K_M indica una baja afinidad del catalizador por el sustrato, mientras que, valores bajos de K_M representan una gran afinidad del catalizador por el sustrato.

Los parámetros K_M y k_{cat} son característicos del proceso catalítico. El cociente $\frac{k_{cat}}{K_M}$ se define como la eficiencia catalítica y es otro parámetro cinético que engloba todo el proceso catalítico; tanto el equilibrio de formación de [CatS], como la transformación de sustrato a producto. Además, este cociente se emplea para comparar la actividad catalítica de diversos sistemas biomiméticos.

Dicho esto, una vez determinado el orden de reacción respecto a la concentración de catalizador, se realizó el estudio de la variación de la velocidad inicial en función de la concentración de OAP. El estudio se realizó nuevamente en la mezcla MeOH:H₂O_{pH} (1:1), a 25 °C, manteniendo constante el pH (0.1 mol L⁻¹, pH de 8.5 y 9.5) y la concentración de catalizador (0.4 mmol L⁻¹). El intervalo de concentraciones de OAP empleado fue de 0.1 - 6 mmol L⁻¹, para ambos complejos.

En la fig. 5.4.3.1 y 5.4.3.2 se presentan las curvas de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato para ambos catalizadores a pH 8.5 y 9.5, así como su ajuste hiperbólico o hiperbola más recta, según sea el caso.

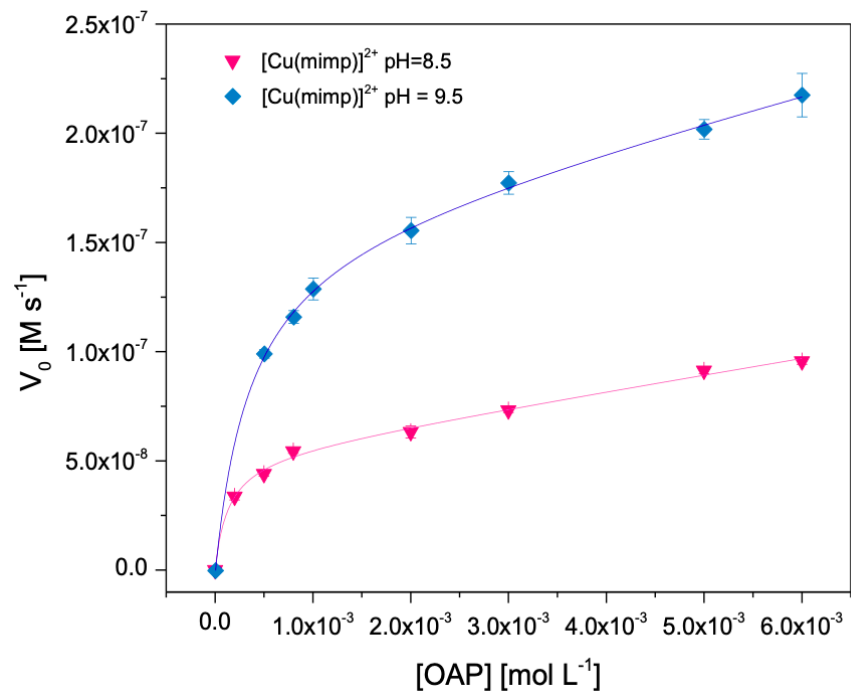
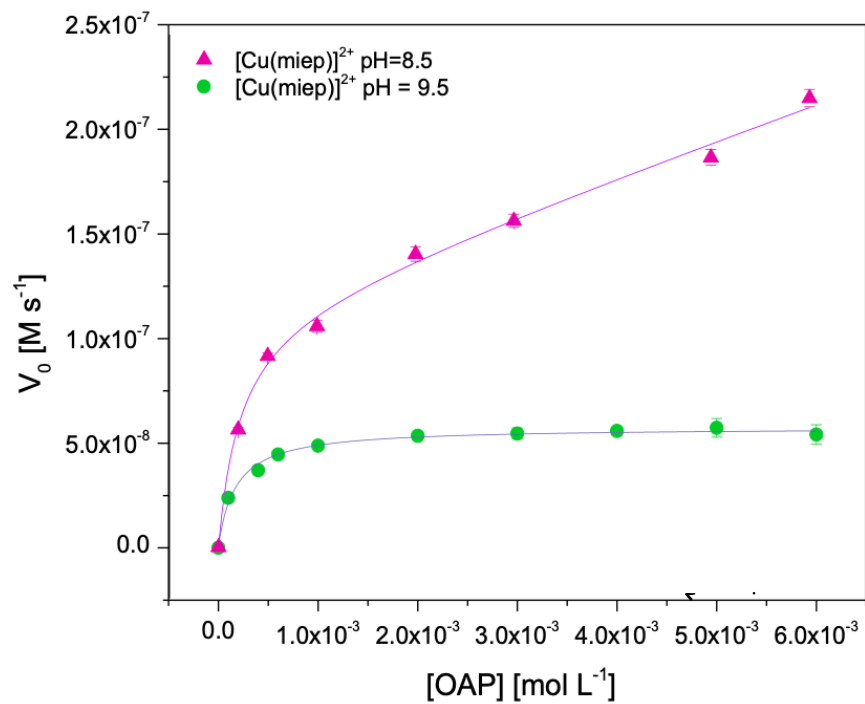


Fig. 5.4.3.1. Gráficos de velocidad inicial en función de la concentración de OAP para el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ a 25°C en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) a pH: 8.5 (\blacktriangle) y 9.5 (\bullet) y $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$ a 25°C en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) a pH: 8.5 (\blacktriangledown) y 9.5 (\blacklozenge).

En la fig. 5.4.3.1, el gráfico verde presenta un comportamiento hiperbólico, en el cual, a concentraciones bajas de sustrato $[OAP] < 1 \text{ mmol L}^{-1}$, se observa que hay una variación en la velocidad inicial, sin embargo, a concentraciones superiores a 1 mmol L^{-1} , esta velocidad inicial comienza a mantenerse constante, lo que nos indica que el catalizador llegó a su saturación. Por otro lado, en los gráficos morado, rosa y azul, siguen el modelo matemático de Michaelis-Menten antes de la concentración 1 mmol L^{-1} , y después de esta concentración el modelo adopta una relación proporcional. Realizando el ajuste hipérbola+recta para las curvas de color rosa, morada y azul e hipérbola para el gráfico verde con la ecuación de Michaelis-Menten (ec. 11), obtenemos los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} y V_{max} , los cuales se encuentran a continuación:

Tabla 5.4.3.1. Parámetros cinéticos del ajuste no lineal de la reacción de acoplamiento oxidativo del OAP en $\text{MeOH:H}_2\text{O}_{\text{pH}}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Catalizador	pH	K_M [M]	σ [M]	V_{max} [Ms^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	Ef. catalítica (k_{cat}/K_M) [$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
$[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$	8.5	2.16×10^{-4}	6.48×10^{-5}	1.16×10^{-7}	2.9×10^{-3}	13.42
	9.5	1.76×10^{-4}	2.30×10^{-5}	5.68×10^{-8}	1.42×10^{-3}	8.07
$[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$	8.5	1.35×10^{-4}	3.76×10^{-5}	5.34×10^{-8}	1.34×10^{-3}	9.92
	9.5	3.56×10^{-4}	4.40×10^{-5}	1.61×10^{-7}	4.02×10^{-3}	11.29

Los valores de los parámetros cinéticos presentados en la tabla anterior se pueden comparar en cuatro vertientes: afinidad de la enzima por el sustrato (K_M), velocidad de la reacción (V_{max}), la transformación de sustrato a producto (k_{cat}) y la eficiencia del catalizador (k_{cat}/K_M).

De los resultados obtenidos en la tabla 5.4.3.1 a pH 8.5 para ambos complejos, se puede discutir lo siguiente:

- El complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$ presenta una mayor afinidad por el sustrato bajo dicho valor de pH, por lo que se obtiene una K_M menor, en comparación con el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$. Una de las diferencias estructurales entre los dos

catalizadores es el número de miembros en el anillo quelato que se describieron en el apartado 3.2.4. Posiblemente un anillo quelato de 5 miembros aumente la dureza del centro metálico y por ende aumente la afinidad por el sustrato fenólico que tiene naturaleza dura.

- Los valores de k_{cat} bajo las condiciones antes mencionadas de pH, el catalizador $[Cu(miep)]^{2+}$ puede llevar a cabo la transformación del complejo [CatS] a producto más rápidamente, esto debido a que en su estructura presenta una cadena alifática mayor lo que desemboca en un aumento en el número de miembros del anillo quelato lo que le confiere una mayor flexibilidad para los cambios de geometría en los estados reducidos de Cu^{II} a Cu^I .
- La mayor eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) la posee el catalizador $[Cu(miep)]^{2+}$ en un 35% más con respecto al complejo $[Cu(mimp)]^{2+}$, a pesar de que dicho complejo no presente un sitio activo tan afín al sustrato. En el complejo $[Cu(miep)]^{2+}$, el número de recambio repercute positivamente en el parámetro, pues bajo las condiciones de trabajo resulta más relevante las propiedades estructurales que la presencia de especies hidrolizadas.

A continuación, se discutirán los datos obtenidos en la tabla 5.4.3.1 bajo condiciones de amortiguamiento de pH igual a 9.5:

- Para el parámetro de afinidad del catalizador por el sustrato, el menor valor de K_M lo posee el complejo $[Cu(miep)]^{2+}$, dicho valor es 2 veces menor que el obtenido para el complejo $[Cu(mimp)]^{2+}$, esto se debe a que, en comparación con el pH 8.5, al pH de trabajo se tiene un predominio de la especie $[Cu(miep)(OH)]^+$ la cual de acuerdo con los resultados presenta un sitio más afín al sustrato.
- El número de recambio del catalizador $[Cu(mimp)]^{2+}$ es 2.8 veces mayor que el del complejo $[Cu(miep)]^{2+}$, esta diferencia puede deberse a que en el valor de pH de trabajo la especie hidrolizada $[Cu(mimp)(OH)]^+$ se encuentra en un porcentaje mayor al 77%, que es el porcentaje que se tiene de la especie $[Cu(miep)(OH)]^+$, lo que repercute en la facilidad del complejo $[Cu(mimp)]^{2+}$ para convertir un número mayor de moléculas de sustrato a producto en el

mismo tiempo. Adicionalmente, a pH 9.5 existe la especie dihidrolizada $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{OH})_2]$ en una proporción del 1%, lo que podría ocasionar una disminución en el valor de k_{cat} .

- Por último, el complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$ presenta una eficiencia catalítica del 40% más con respecto al complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$, esto a pesar de que el complejo $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ presente un valor de K_M menor. De acuerdo con lo discutido, la característica más impactante bajo estas condiciones es el grado de hidrólisis que presenta el complejo sin importar su estructura.

En conclusión, estos dos comparativos realizados nos muestran que a un valor de pH de 8.5, los factores estructurales juegan un papel muy importante, pues promueven un valor mayor de eficiencia catalítica; por otro lado, a un pH de 9.5, la especiación de los complejos en disolución toma mucha más relevancia, pues la presencia de especies dihidrolizadas ocasiona una inhibición en la actividad catalítica; dicho esto, la eficiencia catalítica de la reacción de acoplamiento oxidativo del o-aminofenol mediada por los complejos $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ y $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$ depende rotundamente del valor de pH que se emplee.

Por último, de acuerdo a los resultados presentados en la tabla 2.3.2.1 del apartado 2.3.2, podemos inferir de manera preliminar que, el ligante dinuclear $[\text{Cu}_2(\text{diep})]^{4+}$ es 27% más eficiente que su análogo mononuclear $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ bajo las mismas condiciones de trabajo, lo que nos indica que la presencia de un segundo átomo en la estructura del catalizador influye rotundamente en la actividad catalítica del mismo.

6. Conclusiones

De la síntesis y caracterización de los ligantes y complejos de cobre (II) presentes en este trabajo podemos concluir que:

- Mediante la reacción de Mannich en medio básico se lograron sintetizar los ligantes *miep* y *mimp*; asimismo, se caracterizaron mediante análisis elemental, espectroscopía IR y resonancia magnética nuclear de protón, encontrando que ambos ligantes contienen 2 moléculas de agua.
- Los dos ligantes son capaces de formar complejos mononucleares mezclándolos en cantidades estequiométricas de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$.
- De acuerdo con la caracterización de los complejos $[\text{Cu}(\textit{miep})(\text{NO}_3)_2]$ y $[\text{Cu}(\textit{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ en estado sólido mediante difracción de rayos X, se sabe que la geometría que presentan cada centro metálico es octaédrica manifestando una notable distorsión de Jahn-Teller de elongación.

De los estudios potenciométricos podemos concluir que:

- El ligante *miep* presenta 3 constantes de acidez, además de que las tres especies son estables en toda la escala de pH.
- La formación del complejo $[\text{Cu}(\textit{miep})]^{2+}$ es predominante en el intervalo $5.5 \leq \text{pH} \leq 6.7$; asimismo, a un $\text{pH} \geq 9.0$, las especies hidrolizadas comienzan a predominar.

De los estudios cinéticos se concluye lo siguiente:

- Los complejos $[\text{Cu}(\textit{miep})]^{2+}$ y $[\text{Cu}(\textit{mimp})]^{2+}$ sintetizados presentan actividad fenoxazinona sintasa relevante a $\text{pH} > 8.0$.
- Ambos complejos presentan orden de reacción 1 frente a la reacción de acoplamiento oxidativo del 2-aminofenol, por lo que puede emplearse el modelo de Michaelis-Menten.
- Ambos complejos presentan actividad catalítica fenoxazinona sintasa similar.
- La mezcla de especies $[\text{CuL}]^{2+}$ y $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$ a $\text{pH} 8.5$ es responsable del valor de eficiencia catalítica para el complejo $[\text{Cu}(\textit{miep})]^{2+}$. Por el contrario, la presencia de especies del tipo $[\text{CuL}(\text{OH})_2]$ repercute en la inhibición de la actividad catalítica.

- El amortiguamiento del pH resulta ser relevante muy importante en la en el estudio de la actividad catalítica de los complejos $[\text{Cu}(\text{miep})]^{2+}$ y $[\text{Cu}(\text{mimp})]^{2+}$.
- La presencia de un segundo átomo de cobre(II) dentro de la estructura ocasiona un incremento de la actividad fenoxazinona sintasa.

7. Parte experimental

7.1. Síntesis del ligante miep

Se disuelve 4.64 g (40 mmol) de 2-etil-4-metilimidazol en 30 mL de metanol. A esta mezcla de reacción se le adicionan 5.7 mL (40 mmol) de 2-[(metilamino)etil]piridina, 4 mL (50 mmol) de formaldehído al 37% en agua. La disolución se lleva a un pH básico adicionando 2 mL (14 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se calienta en un baño de aceite a 60 °C. Al cabo de 24 horas, la disolución pasa de un color amarillo a un color naranja. El producto obtenido se concentra y se purifica por columna en una mezcla MeOH/CHCl₃ (1:9). Se obtiene un aceite color ámbar.

7.2. Síntesis del ligante mimp

Se disuelven 1.16 g (10 mmol) de 2-etil-4-metilimidazol en 30 mL de metanol. A esta mezcla se le adicionan 1.26 mL (10 mmol) de 2-[(metilamino)metil]piridina, 1.21 mL (15 mmol) de formaldehído al 37% en agua. La disolución se lleva a un pH básico adicionando 2 mL (14 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se calienta en baño de aceite a 60 °C. Al cabo de 24 horas, la disolución pasa de color amarillo a color naranja intenso. El producto obtenido se concentra y se purifica por columna con una mezcla de MeOH/CHCl₃ (1:1). Se obtiene un aceite color ámbar.

7.3. Síntesis del complejo [Cu(miep)(NO₃)₂]

En un vaso de precipitado se disuelven 29.4 mg (0.1 mmol) del ligante miep y se adiciona una mínima cantidad de MeOH. En otro vaso de precipitado se pesan aproximadamente 23.2 mg (0.1 mmol) de Cu(NO₃)₂•2.5H₂O y se disuelven en una mínima cantidad de MeOH. Una vez disuelto el ligante y la sal de cobre (II), se mezclan y se agita hasta homogeneizar. El vaso de precipitado se deja reposar para que se evapore el MeOH y se formen cristales.

7.4. Síntesis del complejo [Cu(mimp)(NO₃)₂]

En un vaso de precipitado se disuelven 28 mg (0.1 mmol) del ligante mimp y se adiciona una mínima cantidad de MeOH. En otro vaso de precipitado se pesan aproximadamente 23.2 mg (0.1 mmol) de Cu(NO₃)₂•2.5H₂O y se disuelven en una mínima cantidad de MeOH. Una vez disuelto el ligante y la sal de cobre (II), se mezclan y se agita hasta homogeneizar. El vaso de precipitado se deja reposar para que se evapore el MeOH y se formen cristales.

7.5. Equilibrios en disolución

7.5.1. Preparación y estandarización de solución estándar de NaOH

Se midieron aproximadamente 100 mL de hidróxido de sodio de una disolución 1 mol L⁻¹. Este volumen se entrega en un matraz volumétrico de 1.0 L y se agrega H₂O destilada (previamente hervida) c.b.p. 1.0 L.

Se emplea como patrón primario para la estandarización biftalato de potasio, teniendo como resultado una concentración de (0.09942 ± 0.00077) mol L⁻¹.

7.5.2. Preparación y estandarización de solución estándar de HNO₃

Se mide aproximadamente 5 mL de HNO₃ concentrado y se entrega en un vaso de precipitado de 500 mL. Una vez adicionado el ácido nítrico, se agrega H₂O destilada c.b.p. 250 mL.

De esta disolución se toma una alícuota de 10.0 mL y se entrega en un vaso de precipitado de 250 mL y se adiciona H₂O destilada c.b.p. 100 mL. Esta disolución se titula por triplicado con la disolución de NaOH previamente estandarizada.

7.5.3. Preparación de solución patrón de Cu²⁺

Se pesan 3.2 g (50 mmol) de alambre de Cu⁰ estándar y se le adiciona 15 mL (0.2 mol) de HNO₃ (13.6 mol L⁻¹).

Por otro lado, se prepara 10.0 mL una disolución 0.1 mol L⁻¹ de Cu(NO₃)₂·2.5H₂O y se mide el pH de esta solución.

Una vez solubilizado todo el Cu⁰, se adiciona H₂O destilada c.b.p 400 mL y a esta solución se le adiciona NaOH hasta ajustar el pH al de solución de Cu(NO₃)₂·2.5H₂O (aproximadamente pH=5). Una vez ajustado el pH, se transfiere a un matraz volumétrico de 500.0 mL y se le adiciona H₂O destilada c.b.p 500.0 mL.

7.5.4. Determinación de pK_as

Se prepara una disolución stock 0.1 mol L⁻¹ del ligante en cuestión, pesando 1 mmol y disolviéndolo en 5 mL de una disolución de KCl 0.1 mol L⁻¹. Una vez disuelto, se transfiere a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se le adiciona solución de KCl c.b.p. 10.0 mL.

De esta disolución se entregan 2.0, 3.0 y 4.0 mL en tres matraces volumétricos de 100.0 mL, además, se adiciona 0.6, 0.9 y 1.2 mL de HCl (1 mol L⁻¹) respectivamente. Finalmente se lleva al aforo con la solución de KCl para mantener la fuerza iónica. Cada una de las disoluciones se titulan por triplicado con NaOH (0.099 mol L⁻¹).

7.5.5. Determinación de logβ

Se pesan 0.2 mmol, 0.4 mmol y 0.6 mmol del ligante en cuestión y se disuelven en 20 mL de una solución de KNO₃ (0.1 mol L⁻¹). Además, se adiciona 8.5, 16.8 y 25.3 mL de HNO₃ (0.095 mol L⁻¹) respectivamente. Cada una de las soluciones se transfieren a tres matraces volumétricos de 100.0 mL y se agrega KNO₃ c.b.p. 100.0 mL.

Para la titulación, se toman 25.0 mL de cada una de las disoluciones y se entregan en la celda; a estas soluciones se les agrega 0.5, 0.7 y 1.5 mL, respectivamente, de la solución estándar de Cu(II) y se titulan por triplicado.

7.6. Actividad catalítica

7.6.1. Variación de la velocidad inicial en función del pH

Se prepara una solución stock de catalizador 2 mmol L^{-1} en MeOH/H₂O. De esta disolución se entregan 0.4 mL en siete matraces volumétricos de 10.0 mL y se les adiciona 4.0 mL de buffer (0.08 mol L^{-1}) a distintos pH. A estas disoluciones también se les agrega 4.0 mL de MeOH grado espectroscópico para mantener la proporción MeOH/H₂O_{pH}.

A continuación, se presenta la tabla de los distintos buffers a los distintos valores de pH de trabajo.

Tabla 5.6.1.1. Buffer empleado y valores de pH de trabajo.

Buffer	pH
MES	7.0
	7.5
HEPES	8.0
	8.5
	9.0
CHES	9.5
	10.0

Además, se prepara una disolución de sustrato (OAP) de concentración 8 mmol L^{-1} . Cabe destacar que todas las concentraciones en el momento en el que se encuentran en la celda del espectrofotómetro se diluyen a la mitad.

7.6.2. Variación de la velocidad inicial en función del catalizador

Se prepara una disolución buffer 0.5 M a pH 9.5 en H₂O destilada. Adicional a esta, se prepara una disolución en MeOH/H₂O de OAP de concentración 8 mmol L⁻¹.

Por otro lado, se prepara una disolución stock de [CuL]²⁺, pesando 0.02 mmol del ligante en cuestión, se disuelven en 2.0 mL de MeOH y se añaden 2.0 mL de H₂O destilada; se adicionan 0.2 mL de la disolución estándar de Cu(II) y enseguida se añaden 0.2 mL de MeOH para mantener la proporción 1:1. La mezcla se transfiere a un matraz volumétrico de 10.0 mL. Se añade mezcla MeOH/H₂O c.b.p. 10.0 mL.

A continuación, se presentan los volúmenes añadidos de la disolución stock de catalizador, de buffer y la concentración final de la misma.

Tabla 5.6.2.1. Volúmenes agregados de disolución stock de catalizador y de disolución de buffer, así como la concentración final de la mismas.

V_{stock} [CuL] [mL]	V_{buffer} pH=9.5 [mL]	C_{final} [mmol L⁻¹]
0.2	4.0	0.04
0.4	4.0	0.08
0.6	4.0	0.12
0.8	4.0	0.16
1.0	4.0	0.20
1.2	4.0	0.24

A los volúmenes de buffer se les agrega adicionalmente un volumen igual de MeOH para mantener la proporción MeOH/H₂O.

Todas las concentraciones se diluyen a la mitad en el momento en el que se encuentran en la celda del espectrofotómetro.

7.6.3. Variación de la velocidad inicial en función del sustrato

Primeramente, se prepara una disolución stock de $[\text{CuL}]^{2+}$ a pH 9.5, pesando 0.02 mmol del ligante en cuestión y añadiendo 0.2 mL de la disolución estándar de Cu(II). Todos los volúmenes de agua añadidos deberán ser compensados con un volumen igual de MeOH para mantener la proporción MeOH/H₂O. Esta mezcla se transfiere a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se agrega mezcla MeOH/H₂O c.b.p. 10.0 mL. Posteriormente se toman 4.0 mL de la disolución stock de $[\text{CuL}]^{2+}$ y se entregan en un matraz volumétrico de 100.0 mL, a esta disolución se le agrega 40.0 mL de disolución buffer (0.5 mol L⁻¹) y 40.0 mL de MeOH, se lleva al aforo con mezcla MeOH/H₂O c.b.p. 100.0 mL.

En el caso de las disoluciones de sustrato, se preparan 25.0 mL de una disolución stock 0.02 mol L⁻¹ en MeOH/H₂O. En la tabla 5.6.3.1 se muestran los volúmenes empleados de la disolución stock de OAP y la concentración final de las mismas.

Tabla 5.6.3.1. Volúmenes de disolución stock utilizados en la preparación de distintas disoluciones de OAP.

$V_{\text{stock OAP}}$ [mL]	C_{final} [mmol L ⁻¹]
0.1	0.2
0.4	0.8
0.6	1.2
1.0	2
2.0	4
3.0	6
4.0	8
5.0	10
6.0	12

Todas las concentraciones se diluyen a la mitad cuando se encuentran en la celda del espectrofotómetro.

8. Bibliografía y referencias

- ¹ J.S. Holman, P. Stone. (2001). *Chemistry* (133). United Kingdom: Nelson Thornes Ltd.
- ² S. Balboa-Benavente. (2007). *Características de los metales: cobre y paladio. En Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II derivados de α -hidroxicarboxilatos* (35). Santiago de Compostela: USC.
- ³ N. N. Greenwood, A. Earnshaw. (1997). *Chemistry of the Elements*. 2a Ed., Oxford, Butterworth- Heinemann.
- ⁴ F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Boschmann. (1999). *Advanced Inorganic Chemistry*. 6a Ed., John Wiley & Sons, Nueva York.
- ⁵ B. J. Hathaway. (1987). *Comprehensive Coordination Chemistry: the synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds*. (533). Eds. G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Pergamon Press, Oxford, Vol. 5.
- ⁶ M. F. Kamte, C. Wagner, W. Schaefer. *Direct electrosynthesis of cyano copper(I) complexes: X-Ray crystal structure of (cyano-C)(2,2'-bipyridine-N,N')(triphenylphosphine)copper(I)*. *J. Coord. Chem.* **57** (2004) 55.
- ⁷ B. Gustafsson, M. Hakansson, S. Jagner. *Complexes between copper(I) chloride and polydentate aromatic amines*. *Inorg. Chim. Acta.* **350** (2003) 209.
- ⁸ M. A. Malik, C. Byrom, P. O'Brien, M. Motevalli. *Synthesis and X-ray single crystal structures of copper(I) complexes: $Cu(S_2P^iBu_2)(PMe_3)$ and $Cu(S_2P^iBu_2)(PPh_3)_2$* . *Inorg. Chim. Acta* **338** (2002) 245.
- ⁹ T. N. Sorrell, D. L. Jameson. *Synthesis, structure and reactivity of monomeric two-coordinate copper(I) complexes*. *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 6013.
- ¹⁰ T. C. Deivaraj, G. X. Lai, J. J. Vittal. *Chemistry of thiocarboxylates: Synthesis and structures of neutral copper(I) thiocarboxylates with triphenylphosphine*. *Inorg. Chem.* **39** (2000) 1028.
- ¹¹ J. D. Lee. (1991). *Concise Inorganic Chemistry*. 4a Ed., Chapman & Hall, London.

- ¹² B. J. Hathaway. *A new look at the stereochemistry and electronic properties of complexes of the copper(II) ion: Structure and Bonding*. Springer-Verlag. **57** (1984) 55.
- ¹³ J. E. Huheey. (1999). *Química Inorgánica. Principios de estructura y reactividad*. (428-429). 4^a Ed. New York, Harper/Row.
- ¹⁴ K. Kurdziel. T. Glowiak. *Crystal structure and physico-chemical characterization of the nitrate complexes of copper(II) with 1-ethoxymethylimidazole*. *Trans. Met. Chem.* **24** (1999) 366.
- ¹⁵ L. Forti, L. Menabue. M. Saladini. *Co-ordination behaviour of N-protected amino acids. Structural and spectroscopic study of complexes of Co^{II}, Ni^{II} and Cu^{II} with N-(4-Aminobenzoyl)glycine*. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **11** (1991) 2955.
- ¹⁶ S. Youngme, N. Chaichit, K. Damnatara. *The coordination chemistry of dinitrato-di-2-pyridylamine copper(II). Crystal structures of catena-poly[[di-2-pyridylamine)(nitrate-O,O')copper(II)]-μ-nitrate-O:O'] and bis(nitrate-O,O')(di-2-pyridylamine)copper(II) dihydrate*. *Polyhedron* **21**. (2002). 943.
- ¹⁷ L. Antolini, L. P. Battaglia, A. Bonamartini Corradi, G. Marcotrigiano, L. Menabue, G. C. Pellacani, M. Saladini, M. Sola. *Tridentate facially coordinated L-Aspartate ion complexation with the copper(II) ion: spectroscopic and structural properties of Aqua(L-aspartato)(1,10-phenanthroline)copper(II) tetrahydrate*. *Inorg. Chem.* **25** (1986) 2901.
- ¹⁸ Y. Yamada, H. Sakurai, Y. Miyashita, K. Fujisawa, K. Okamoto. *Crystal structures, electronic absorption properties of five-coordinated chlorocopper(II) complexes with 5,6-disubstituted-1,10-phenanthroline*. *Polyhedron* **21** (2002). 2143.
- ¹⁹ M. Liang, W. Wang, Z. Liu, D. Liao, Z. Jiang, S. Yan, P. Cheng. *A new mixed-ligand copper(II) complex containing azide and 1,10-phenanthroline: crystal structure and properties*. *J. Coord. Chem.* **56** (2003) 1473.
- ²⁰ B. Macias, I. García, M. V. Villa, J. Borrás, M. González-Álvarez, A. Castiñeiras. *Structural characterisation and nuclease activity of mixed*

- copper(II) complexes with sulfonamides and bipyridyl*. Inorg. Chim. Acta **353** (2003) 139.
- ²¹ A. C. Massabni, O. R. Nascimento, K. Halvorson, R. D. Willett. *Synthesis, structure and electronic and EPR spectra of copper(II) complexes containing the [CuBr₄]²⁻ anion and triphenylarsine oxide*. Inorg. Chem. **31** (1992) 1779.
- ²² S. Youngme, K. Poopasit, K. Chinnakali, S. Chantrapromma, H. Fun. *The crystal structures and electronic properties of bis(di-2-pyridylamine)copper(II), bis(tetrafluoroborate) and bis[bis-aquabis(di-2-pyridylamine)copper(II)] sulfate heptahydrate*. Inorg. Chim. Acta. **292** (1999) 57.
- ²³ G. D. Hosken, C. C. Allan, J. C. A. Boeyens, R. D. Hancock. *Structure of the copper(II) complex of a highly preorganized tetradentate ligand based on bispidine (3,7-diazabicyclo-[3.3.1]nonane)*. J. Chem. Soc., Dalton Trans. **22** (1995) 3705.
- ²⁴ N. Matsumoto, S. Yamashita, A. Ohyoshi, S. Kohata, H. Okawa. *Synthesis and X-ray crystal structures of an imidazolate-bridged polynuclear copper(II) complex exhibiting a unique helicoid structure and its precursor mononuclear complex*. J. Chem. Soc., Dalton Trans. **7** (1988) 1943.
- ²⁵ Alcañiz, E. J. . (2019). *Fundamentos de reactividad inorgánica*. 2020, de Universidad Alcalá Sitio web:
http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/QI/Tema_3A.pdf
- ²⁶ M. P. Collados-de Díaz. (1967). *Estudio de los complejos formados en solución por los sistemas: A) Cobalto (II)-2-nitroso-1-naftol, B) cobalto (II)-OH, C) Cobre (II) dimetilglioxima*. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias. Universidad de Madrid.
- ²⁷ M. Vallet, J. Faus, E. García-España, J. Moratal. (2005). *Introducción a la química bioinorgánica* (207). España: Editorial Síntesis.
- ²⁸ W. Kaim, B. Schwederski. (1994). *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life* (187-212). England: Wiley.
- ²⁹ R. Fromme, Y. S. Bukhman-deRuyter, H. Mi, P. Fromme. (2009). *Crystal Structure of the double mutant D44A D45A Plastocyanin from Phormidium*

- laminosum*. March 2020, de Protein Data Bank Sitio web: <https://www.rcsb.org/structure/3BQV>
- ³⁰ L. González-Sebastián. (2005). *Estructura y reactividad del complejo dinucleat de Cu(II) con un ligante derivado de imidazol y piridina*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ³¹ F. Yu, J. E. Penner-Hahn, V. L. Pecoraro. *De novo-designed metallopeptides with type 2 copper centers: modulation of reduction potentials and nitrite reductase activities*. J. Am. Chem. Soc. **135** (2013) 18096.
- ³² Rosette, M. Roat-Malone. (2002). *Bioinorganic Chemistry: A Short Course* (187). New Jersey: Wiley-Interscience.
- ³³ C. Henriquez. (2015). *Galactosa oxidasa: Metaloproteína de Cobre*. Marzo 23, 2020, de Revista BiosCobre Sitio web: <https://bioscobre.wordpress.com/2015/06/19/galactosa-oxidasa-metaloproteina-de-cobre/>
- ³⁴ E.A. Lewis, W. B. Tolman. *Reactivity of Dioxygen-Copper Systems*. Chem. Rev. **104** (2004) 1047.
- ³⁵ Nawaz-A., Shafi, T., Khaliq, A., Mukhtar, H., Ikram ul Haq. (2017). *Tyrosinase: Sources, Structure and Applications*. Marzo 23, 2020, de BioCore Sitio web: <https://biocoreopen.org/ijbb/Tyrosinase-Sources-Structure-and-Applications.php>
- ³⁶ I. Kampatsikas, A. Bijelic, M. Pretzler, A. Rompel. (2019). *A Peptide-Induced Self-Cleavage Reaction Initiates the Activation of Tyrosinase*. A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker , 10. Marzo, 2020, De Protein Data Bank (PDB) Base de datos.
- ³⁷ A. U. Mendieta-Martínez. (2016). *Acoplamiento oxidativo 2,6-dimetilfenol utilizando compuestos de coordinación dinucleares de Cu(II) como catalizadores*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

- ³⁸ I. Monte-Pérez. (2011). *Formación y efecto catalítico del puente imidazolato en compuestos de coordinación de Cu(II)*. (Tesis de Maestría). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ³⁹ A. M. Sosa-Reyes. (2006). *Estudio de las propiedades electroquímicas de complejos dinucleares de cobre con ligantes derivados de imidazol en relación con su actividad catalítica*. (Tesis Doctoral). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁴⁰ J. L. Pierre. *One electron at a time oxidation and enzymatic paradigms: from metallic to non-metallic redox centers*. Chem. Soc. Rev. **20** (2000) 251.
- ⁴¹ M. R. Mendoza-Quijano. (2010). *Complejos de Cu (II) con ligantes derivados de imidazol con actividad catecolasa*. (Tesis de Maestría). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁴² L. González-Sebastián. (2008). *Estudio electroquímico de la reacción de oxidación del H₂DTBC catalizada por el compuesto Cu₂Dimp*. (Tesis de Maestría). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁴³ D. E. Morett-Aguilar. (2016). *Acoplamiento de fenoles sustituidos catalizado por compuestos de coordinación de Cu(II) con ligantes derivados de imidazol*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁴⁴ A. W. Smith, A. Camara-Artigas, M. Wang, J. P. Allen, W. A. Francisco. *Structure of phenoxazinone synthase from Streptomyces antibioticus reveals a new type 2 copper center*. Biochemistry. **45** (2006) 4378.
- ⁴⁵ A. U. Mendieta-Martínez. (2018). *Acoplamiento de fenoles sustituidos catalizado por complejos bioinspirados de Cu(II)*. (Tesis de Maestría). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁴⁶ N. Hakulinen, C. Gasparetti, H. Kaljunen, K. Kruus, J. Rouvinen. *The Crystal Structure of an Extracellular Catechol Oxidase from the Ascomycete Fungus Aspergillus oryzae*. J. Bio. Inor. Chem. **18** (2013) 917.
- ⁴⁷ S. K. Dey, A. Mukherjee. *Catechol Oxidase and Phenoxazinone Synthase: Biomimetic Functional Models and Mechanistic Studies*. Coordination Chem. Rev. **310** (2015) 80.

- ⁴⁸ M. R. Mendoza-Quijano, G. Ferrer-Sueta, M. Flores-Álamo, N. Aliaga-Alcalde, V. Gómez-Vidales, V. M. Ugalde-Saldívar, L. Gasque. *Mechanistic insight on the catecholase activity of dinuclear copper complexes with distant metal centers*. Dalton. Trans. **41** (2012) 4985.
- ⁴⁹ L. González-Sebastián, V. M. Ugalde-Saldívar, E. Mijangos, M. R. Mendoza-Quijano, L. Ortiz-Frade, L. Gasque. *Solvent and pH effects on the redox behavior and catecholase activity of a dicopper complex with distant metal centers*. J. Inorg. Biochem. **104**, (2010) 1112.
- ⁵⁰ M. L. Roes-Hill, C. Goodwin, S. Burton. *Phenoxazinone synthase: what's in a name?* Trends Biotechnol. **27** (2009) 248.
- ⁵¹ Baeza-Reyes, A. (2016). *Introducción a la Química Analítica*. 18 mayo 2020. Sitio web: https://www.uv.es/baeza/Tema_1_IntroduccionQA_2016.pdf
- ⁵² Torelli, S., Belle, C., Gautier-Luneau, I., Pierre, J.L., Saint-Aman, E., Latour, J.M., Le Pape, L., Luneau, D. *pH-Controlled change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity*. Inorg. Chem. **39**, (2000) 3526.
- ⁵³ Mihalylov, M.Y., Zdravkova, V.R., Ivanova, E.Z., Aleksandrov, H.A., Petko, P.St., Vayssilov, G.N., Hagjiivanov, K.I. *Infrared Spectra of Surface Nitrates: Revisio of the Current Opinions Based on the Case Study of Ceria*. Journal of Catalysis. (2020).
- ⁵⁴ H. William. (2016). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. (5–94) 97th ed. CRC Press.