



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPLEJOS DE CU CON LIGANTES QUE CONTIENEN
GRUPOS IMIDAZOL Y PIRIDINA COMO CATALIZADORES
EN LA OXIDACIÓN DE FENOLES**

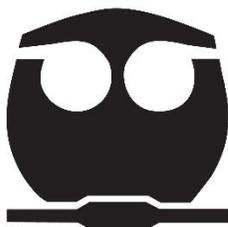
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA
ALFONSO ALAM ARMENTA CHACÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2023





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 MARÍA

VOCAL: Profesor: MARÍN BECERRA ARMANDO

SECRETARIO: Profesor: UGALDE SALVÍDAR VÍCTOR MANUEL

1er. SUPLENTE: Profesor: CAÑIZARES MACÍAS MARÍA DEL PILAR

2° SUPLENTE: Profesor: MACÍAS RUBALCAVA MARTHA LYDIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 215, UNIDAD DE POSGRADO EDIFICIO “B” FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

UGALDE SALDÍVAR VÍCTOR MANUEL

SUPERVISOR TÉCNICO:

MENDIETA MARTÍNEZ ALAN ULISES

SUSTENTANTE:

ARMENTA CHACÓN ALFONSO ALAM

A mis padres

Pido perdón a los niños por haber dedicado mi tesis a dos personas adultas. Pero tengo una excusa muy importante: estas personas son las personas más importantes que tengo en el mundo. Y tengo otra excusa, estas personas son capaces de entenderlo todo, hasta los libros para niños. Todavía tengo una tercera excusa, estas dos personas viven en México y se han sacrificado para evitar que pase hambre y frío. Si no fuesen suficientes todas estas excusas, entonces deseo dedicar esta tesis a los niños que una vez fueron. Corrijo mi dedicatoria:

A mis padres
cuando eran niños.

Agradecimientos

A mis padres por todo el apoyo que me han brindado para seguir mis sueños y por todo lo sacrificado.

A mis hermanas, Gloria y Josy, y a mi hermanito Alexis porque a pesar de todas las peleas siempre permanecemos juntos.

A mi tía Laura y a mis primos Said y Edgar por todo el apoyo incondicional.

A mis abuelitos, Javier y Hurith porque sé que estarían muy orgullosos de lo que he logrado y por todo el amor que me dieron cuando niño.

A mis sobrinos Alondra, Coral y Jony. A mis tíos Martín y Adela. A mi abuelita Gloria.

A la Dra. Gasque y al Dr. Ugalde por dejarme ser parte de este proyecto y por todo el conocimiento que me dieron y la paciencia que me tuvieron.

A Alan por todo su apoyo durante el desarrollo de este proyecto, el cual fue esencial.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Brenda y Efrén, por todo su apoyo.

A los amigos que durante toda la carrera me apoyaron de diversas formas e incondicionalmente: Getse, Pao, Dani Bonilla, Álvaro, Richo, Diana, Emmaús, Eliseo, Alex, Emilia, Cristina, Ivonne, Lalo, Adara, Nolo, Michelle, Eva, Sara, Cami, Arturo, Edwin, Ale, Daniela Villaluna, Abril, Víctor, Fer Larc, Malau, Fer Ávila, Diego, Caro, Mapy, Faty, Hiromi, Amanda, Aranza, Melissa, Dianita, Bryan, Lau, Guille, Gloria, Andy, Aldo y Fabi.

A mis amigos del intercambio por acompañarme en esa bonita experiencia: Antonia, Marissa, Taty, Dani, Sierra, Eneko, Karen, Belén, Karla, Matteo, Greta, Winnie, Wiktoría, Ema y Patricia, Rodrigo, Felipe, Yoss y Nerea.

Y a mis amigas que a pesar del tiempo siguen conmigo: Cristina, Mariana, Ana, Adairis, Marlene y Karla.

A todos los profesores que me han brindado una visión diferente del conocimiento y de la vida, en especial, a la profesora Natalia por incursionarme en esta rama de la ciencia. Y a los profesores Arturo, Mayté y Nayeli.

A todas mis mascotas que he tenido y que nos han dado, a mí y a mi familia, el amor más sincero. Nombrarlos a todos tomaría mucho tiempo, pero en el corazón llevo el nombre de cada gato y cada perro que se ha cruzado en mi camino. Pero quiero agradecer en especial al Vivols por desvelarse conmigo haciendo tareas y estudiando.

A la UNAM que me ha brindado un hogar durante casi 10 años. A la Facultad de Química por todo el conocimiento y experiencias que tuve en sus aulas.

Al programa 127 "Formación de investigadores" por proveer económicamente para el desarrollo de este proyecto.

Índice

Índice	1
Abreviaturas.....	4
1. Introducción.....	5
2. Marco teórico.....	7
2.1. Química de coordinación y en disolución del cobre	7
2.1.1. Química de coordinación del cobre (I).....	8
2.1.2. Química de coordinación del cobre (II).....	8
2.1.3. Química en disolución e hidrólisis del cobre.....	9
2.1.4. Propiedades oxido-reducción del cobre	11
2.2. El cobre en sistemas biológicos	12
2.2.1. Generalidades de las metaloproteínas de cobre	12
2.2.2. Clasificación de las enzimas de cobre.....	13
2.3. Catecol oxidasa.....	15
2.3.1. Compuestos bioinspirados en la catecol oxidasa	16
3. Antecedentes	18
3.1. Síntesis de los complejos de cobre	18
3.1.1. Ligantes	18
3.1.2. Complejos.....	19
3.2. Actividad catalítica.....	19
3.2.1. Modelo de Michaelis-Menten	20
3.3. Ligantes y catalizadores considerados en el estudio	24
3.3.1. Estructura.....	26
3.3.2. Actividad catecolasa	29
3.3.3. Nuclearidad en la actividad catalítica de los complejos de Cu (II)	30
4. Objetivos	34
4.1. Objetivo general	34
4.2. Objetivos particulares.....	34
5. Hipótesis.....	35

6.	Resultados y discusión de resultados.....	36
6.1.	Estudios en disolución de los sistemas L/[CuL]	36
6.1.1.	Determinación de las constantes de acidez (pKa) de los ligantes	36
6.1.1.1.	Ligante <i>mimp</i>	37
6.1.1.2.	Ligante <i>miep</i>	41
6.1.2.	Determinación de las constantes de hidrólisis de los hidroxocomplejos de Cu(II)	44
6.1.2.1.	Complejo <i>mimp</i>	44
6.1.2.2.	Complejo <i>miep</i>	47
6.2.	Estudios electroquímicos de los sistemas de Cu(II)/Cu(I).....	50
6.2.1.	Propiedades redox del medio de reacción MeOH/H ₂ O _{pH=9.0}	51
6.2.2.	Propiedades redox de los ligantes derivados del grupo imidazol	53
6.2.3.	Propiedades redox de la sal de Cu(II) (CuCl ₂).....	54
6.2.4.	Propiedades redox de los complejos de Cu(II)	56
6.2.4.1.	Complejo <i>Cumimp</i>	56
6.2.4.2.	Complejo <i>Cumiep</i>	59
6.2.5.	Efecto electrocatalítico	61
6.2.5.1.	Complejo <i>Cumimp</i>	62
6.2.5.2.	Complejo <i>Cumiep</i>	63
6.3.	Estudios cinéticos.....	64
6.3.1.	Variación del pH.....	66
6.3.2.	Variación de la concentración del catalizador CuL	69
6.3.3.	Variación de la concentración inicial de 3,5-DTBC	71
7.	Conclusiones.....	75
8.	Parte experimental	76
8.1.	Síntesis	76
8.1.1.	Síntesis del ligante <i>miep</i>	76
8.1.2.	Síntesis del ligante <i>mimp</i>	76
8.1.3.	Síntesis del complejo [Cumimp]	77
8.1.4.	Síntesis del complejo [Cumiep]	77
8.2.	Estudios en disolución.....	77

8.2.1.	Valoraciones	78
8.2.1.1.	Valoración NaOH.....	78
8.2.1.2.	Valoración HCl.....	78
8.2.2.	Titulaciones.....	78
8.2.2.1.	Titulación HCl	78
8.2.2.2.	Titulaciones <i>miep</i> y <i>Cumiep</i>	79
8.2.2.3.	Titulaciones <i>mimp</i> y <i>Cumimp</i>	79
8.3.	Electroquímica	80
8.3.1.	Medio	80
8.3.2.	Ligantes	81
8.3.3.	<i>Cumiep</i>	81
8.3.4.	<i>Cumimp</i>	81
8.4.	Actividad catecolasa.....	81
8.4.1.	<i>Miep</i>	82
8.4.1.1.	v_0 vs pH	82
8.4.1.2.	v_0 vs [<i>Cumiep</i>].....	82
8.4.1.3.	v_0 vs [DTBC]	83
8.4.2.	<i>Mimp</i>	83
8.4.2.1.	v_0 vs pH	83
8.4.2.2.	v_0 vs [<i>Cumimp</i>].....	83
8.4.2.3.	v_0 vs [DTBC]	83
	Referencias.....	84

Abreviaturas

MeOH - Metanol

HPLC - Cromatografía de líquidos de alta resolución (high-performance liquid chromatography)

CHES - Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

Cumiep - Cu^{II}*miep*

Cumimp - Cu^{II}*mimp*

DTBC - 3,5-diterbutilcatecol

K_M - Constante de Michaelis-Menten

v₀ - Velocidad inicial

v_{máx} - Velocidad máxima

k_{cat} - Constante catalítica

DTBQ - 3,5-diterbutilquinona

β - Constante de formación global

K_a - Constante de acidez

λ_{max} - Longitud de onda máxima

miep - N-((2-etil-4-metil-1H-imidazol-5-il)metil)-N-metil-2-(piridin-2-il)etan-1-amina

mimp - 1-(2-etil-4-metil-1H-imidazol-5-il)-N-metil-N-(piridin-2-il-metil)metanamina

1. Introducción

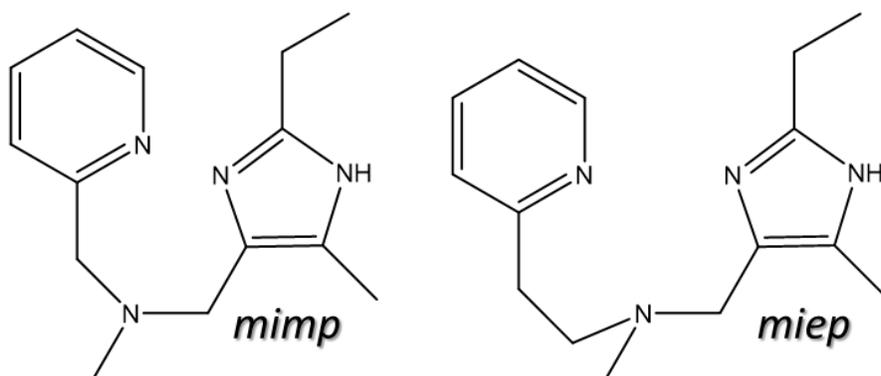
En el grupo de trabajo se han estudiado diversos compuestos de coordinación de cobre (II) con ligantes derivados del grupo imidazol como catalizadores bioinspirados para reacciones de oxidación de fenoles, encontrando una actividad superior a la mayoría de los sistemas descritos en la literatura. Se ha encontrado que tanto las constantes de formación globales de los complejos como las de hidrólisis, son factores que influyen de manera importante en su actividad catalítica. Otro factor importante para la actividad de los catalizadores de cobre (II) en las reacciones de oxidación, es precisamente su potencial redox, E° .

De los estudios cinéticos que se han realizado usando estos catalizadores mediante el modelo de Michaelis-Menten, se ha observado que la familia de catalizadores estudiados en el grupo presenta un valor de K_M más pequeño que la mayoría de los sistemas reportados en la literatura. El parámetro K_M permite estimar la afinidad del catalizador por el sustrato; entre más pequeño sea su valor, se espera que dicha afinidad sea mayor.

La reacción utilizada dentro del grupo de investigación y que, así mismo, se utiliza en la literatura para el estudio cinético de este tipo de catalizadores, es la reacción de oxidación del 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ.

La mayoría de los estudios realizados y publicados por el grupo hasta el momento involucran catalizadores que son complejos dinucleares, pero recientemente se ha comenzado un estudio comparativo entre la reactividad de éstos con la de sus análogos mononucleares. Los ligantes mononucleares estudiados en el presente trabajo (figura 1), son los ligantes *mimp* y *miep*, análogos a dos ligantes dinucleares previamente trabajados, *dimp* y *diep*. A los respectivos complejos de cobre (II) de dichos ligantes mononucleares se les hizo un estudio en disolución, determinando así sus constantes de formación.

Posteriormente se les realizó un estudio de voltamperometría cíclica obteniendo así sus parámetros electroquímicos y los potenciales redox del par Cu(II)/Cu(I) en dichos ligantes. Por último, se realizó el estudio cinético obteniendo los parámetros: K_M , K_{cat} , y K_{cat}/K_M ; así mismo se comparó con sus análogos dinucleares.



Esquema 1. Ligantes mononucleantes estudiados en el presente trabajo; ligante corto (izquierda), ligante largo (derecha).

2. Marco teórico

El cobre es un metal de transición ubicado en la primera serie de transición dentro del grupo 11, posee un número atómico de 29 y una masa atómica de 63.55 g/mol, su configuración electrónica es $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$. Este elemento se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en forma de diversos minerales, como la azurita, la calcopirita y la malaquita; es un metal de color rojo y es dúctil, y tiene una alta conductividad térmica y eléctrica, propiedades las cuales son sólo superadas por las de la plata.

2.1. Química de coordinación y en disolución del cobre

El cobre es uno de los pocos metales, además de los metales alcalinos, que presentan un estado de oxidación 1+. En disolución acuosa es común encontrar al cobre en forma de cobre (II) ya que el cobre (I) es inestable. [1] Si bien se sabe la existencia de algunos compuestos sintetizados con un estado de oxidación 3+ y se ha propuesto este estado de oxidación como un intermediario en algunas reacciones catalíticas, los más comunes y representativos son el 2+ y 1+.

El entorno químico de cada estado de oxidación es distinto, mientras que el cobre (II) es considerado un ácido intermedio, el cobre (I) se considera un ácido blando por lo que este último prefiere coordinarse a bases blandas tales como el cianuro que tiene una nube de electrones que se puede polarizar, también se coordina a compuestos azufrados, mientras que por el otro lado el cobre (II) presenta una fuerte coordinación con ligantes que contienen oxígeno, nitrógeno o halógenos. [1],[2]

2.1.1. Química de coordinación del cobre (I)

El cobre (I), en ausencia de ligantes, tiene una vida media en agua muy baja, debido a que dismuta en cobre (II) y cobre (0). Generalmente sus compuestos de coordinación son incoloros, debido a que en este estado de oxidación el cobre perdió el único electrón que se encontraba en el orbital 4s, por lo que no hay transiciones electrónicas, a menos que el ligante proporcione el color o este estimule la transferencia de carga. Otra característica es que al tener una configuración electrónica d^{10} tiene todos los orbitales d ocupados y sus electrones apareados, [1] como consecuencia sus compuestos presentan propiedades diamagnéticas. Sus números de coordinación suelen ser 2, 3 y 4, con una geometría lineal, trigonal y tetraédrica respectivamente. El cobre (I) se puede estabilizar cuando se encuentra en sales bastante insolubles como el cloruro de cobre (I) (CuCl), [3] así como por bases blandas como el cianuro (CN^-) y el yoduro (I^-). [4],[5]

2.1.2. Química de coordinación del cobre (II)

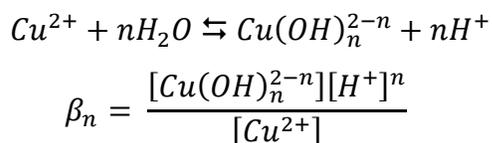
El cobre (II) por su parte posee a los compuestos de cobre más conocidos. En este estado de oxidación el cobre tiene una configuración electrónica d^9 , teniendo así sólo un electrón desapareado, por lo que los compuestos cúpricos presentan propiedades paramagnéticas. Sus compuestos presentan una banda de absorción entre los 600 y los 900 nm, lo que se puede traducir como un color azul o verde en dichos compuestos. Los números de coordinación más comunes son el 4, 5 y 6, presentando una geometría cuadrada plana, piramidal de base cuadrada y octaédrica distorsionada respectivamente. La distorsión en los compuestos octaédricos se debe a la distorsión Jahn-Teller, esta distorsión hace que los ligantes en las posiciones axiales estén a una mayor distancia del centro metálico que aquellos ligantes en las posiciones ecuatoriales. [3],[4],[5]

En este estado de oxidación es posible encontrar especies dinucleares, en donde el momento magnético es menor a lo esperado debido a que suelen aparearse los electrones de los dos átomos de cobre. [1]

2.1.3. Química en disolución e hidrólisis del cobre

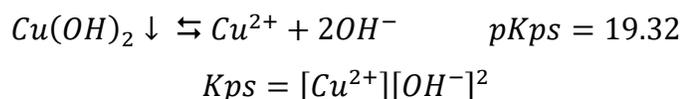
La mayoría de las sales de cobre (II) se disocian en agua para formar el ion hexa-hidratado de cobre (II), $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$, el cual tiene un color azul característico. Se puede ir sustituyendo al agua de la esfera de coordinación agregándole otros ligantes al medio como en el caso del amoníaco (NH_3), el cual va ocupando un espacio en la esfera de coordinación, desplazando así a una molécula del agua. Una consecuencia del efecto Jahn-Teller es que, debido al distanciamiento de los ligantes en las posiciones axiales, las moléculas de amoníaco no pueden ocupar estas posiciones debido a la débil atracción con el centro metálico, formando así el complejo $[Cu(NH_3)_4(H_2O)_2]^{2+}$. [1],[4],[6]

El cobre presenta cuatro hidrólisis consecutivas las cuales vienen representadas por la siguiente expresión:



$$\log(\beta_n) = (n = 1) - 7.5; (n = 2) - 16.2; (n = 3) - 27.5; (n = 4) - 40.4$$

El cobre también se ve envuelto en una reacción de precipitación, la cual se rige por la expresión del producto de solubilidad:



Tomando en cuenta ambos equilibrios, hidrólisis y precipitación, se puede elaborar un diagrama heterogéneo que describa las especies que predominan a distintos valores de pH:

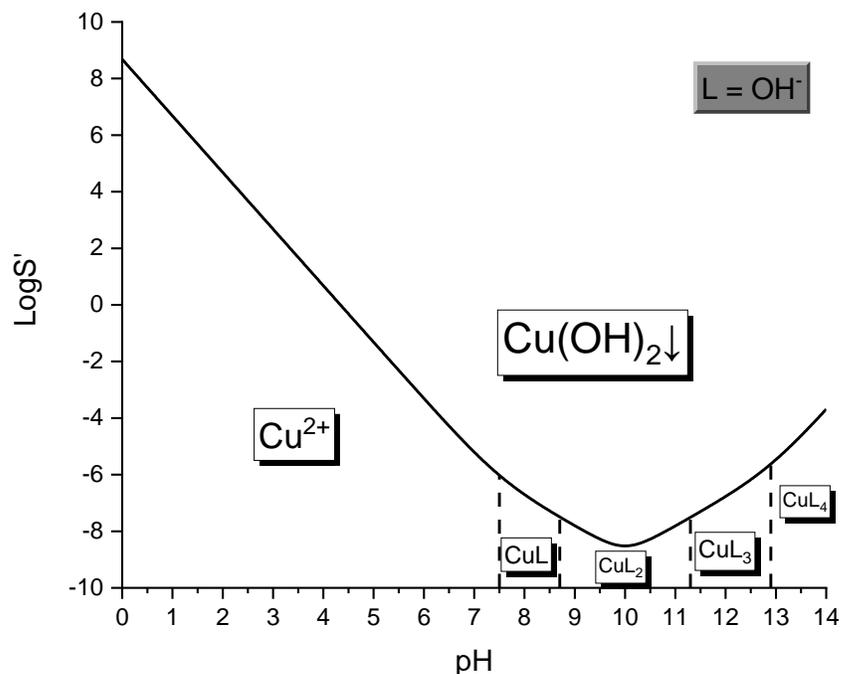


Figura 1. Diagrama heterogéneo de solubilidad del cobre y de predominio de especies a distintos valores de pH.

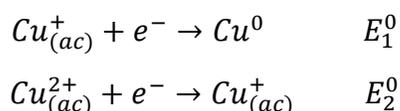
Las líneas punteadas representan equilibrios homogéneos, es decir, representan cada una de las hidrólisis que sufre el cobre (II) a distintos valores de pH; mientras que la línea continua representa a los equilibrios heterogéneos que se dan entre cada una de las especies de cobre y el hidróxido de cobre (II). La zona por encima de la curva (línea continua) representa la zona en la cual existe la presencia de precipitado, por otro lado, la zona por debajo de dicha curva indica la ausencia de precipitado y que especie predomina en dicho intervalo de pH.

2.1.4. Propiedades oxido-reducción del cobre

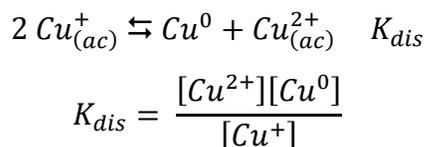
El cobre es el elemento menos oxidable de la primera fila de los elementos de transición, es gracias a ello que sus propiedades son utilizadas tanto para fines industriales como para fines analíticos.

Los estudios electroquímicos del cobre se realizan en su mayoría en disolventes no acuosos para garantizar la solubilidad del cobre (I), principalmente se usa el acetonitrilo debido tanto a su capacidad para disolver los ligantes orgánicos por su gran constante dieléctrica, además es capaz de estabilizar al cobre (I). [7],[8]

La electroquímica del cobre en disolución en ausencia de ligantes puede ser descrita por dos procesos que involucran un electrón cada uno:



Se ha observado que en disolventes tales como el agua, metanol o mezclas de metanol agua el potencial de reducción del cobre(I) es mayor que el potencial de reducción de cobre (II) por lo que el cobre (I) presenta un fenómeno de dismutación:



Aunque la constante de dismutación del cobre (I) es grande en este tipo de disolventes, siempre que se tenga una disolución de cobre (II) en contacto con cobre metálico, va a haber una pequeña cantidad de cobre (I). También se ha observado que al disminuir la concentración del cobre en disolución se incrementa la cantidad de cobre (I) presente en dicha disolución. [7]

Tabla 1. Potenciales del cobre en distintos disolventes.

Disolvente	E_1^0	E_2^0	K_{dis}
Agua	0.52	0.159	1.7×10^6
MeOH 80%	0.64	0.40	1.1×10^4
MeOH*	0.58	0.20	2.0×10^6
MeCN	-0.344	0.133	8.7×10^{-9}

Datos recuperados de (Rorabacher *et al.*, 2007). E vs ENH

*Disolvente 80% MeOH – 20 % agua.

2.2. El cobre en sistemas biológicos

Dentro de los organismos vivos, como plantas y animales, existen una gran variedad de metaloproteínas de cobre, las cuales pueden llevar a cabo funciones como el transporte de oxígeno, transporte de electrones y llevan a cabo reacciones de oxidación de diversos sustratos orgánicos en donde son capaces de fijar el oxígeno a la proteína para poder llevar a cabo dicha oxidación. Una gran parte del cobre activo se encuentra en proteínas fuera de la célula o en vesículas. Un ejemplo de estas proteínas es la hemocianina que es una metaloproteína dinuclear de cobre, la cual es la responsable del transporte de oxígeno en algunos moluscos, crustáceos y arácnidos, así como del color azul de su sangre. [9],[10],[11]

2.2.1. Generalidades de las metaloproteínas de cobre

Los átomos de cobre dentro de estas metaloproteínas generalmente están coordinados con residuos de aminoácidos que contienen nitrógeno y azufre, como lo son la histidina, la cisteína y la metionina. El cobre en los sitios activos de las enzimas existe en geometrías distorsionadas e intercambiables. [9],[10]

Los potenciales redox del cobre se ven alterados dependiendo de la naturaleza de los ligantes en cada una de las proteínas, haciendo que el sistema se oxide ya sea más o menos fácilmente.

Como ya se mencionó el cobre (I) tiene afinidad por las bases blandas, mientras que el cobre (II) por bases duras; en proteínas de cobre envueltas en reacciones de óxido-reducción es común encontrar en el sitio activo ambos tipos de bases. [9]

Existen algunas metaloproteínas, en su mayoría chaperonas, que contienen exclusivamente cobre (I) y no están envueltas en procesos de óxido-reducción. [12]

2.2.2. Clasificación de las enzimas de cobre

Al haber una gran diversidad de proteínas de cobre, surgió la necesidad por clasificarlas, estas se empezaron a agrupar de acuerdo con las características espectroscópicas del cobre en el sitio activo de la proteína, en un inicio se distinguieron entre tres tipos de sitios activos:

- Tipo 1: Son proteínas que participan regularmente en procesos de transferencia de electrones. También se conocen como proteínas azules de cobre, debido a su color azul intenso en su estado oxidado, esto se debe a la presencia de una banda de transferencia de carga del ligante al ion metálico (Cys-Cu²⁺), alrededor de los 620 nm. La esfera de coordinación del cobre del centro activo está constituida por dos átomos de nitrógeno proveniente de dos residuos de histidina, un azufre proveniente de un residuo de cisteína y otro azufre proveniente, en su mayoría, de un residuo de metionina; los cuatro átomos se arreglan en una geometría tetraédrica distorsionada. Dos ejemplos de este tipo de proteínas son la plastocianina y la azurina, la primera encontrada en la mayoría de las plantas y la segunda encontrada en algunas bacterias.
- Tipo 2: Estas proteínas son conocidas como proteínas normales, ya que su comportamiento en EPR y en el UV es similar a los complejos más sencillos de cobre (II). Generalmente están envueltas en procesos catalíticos como en la dismutación del anión superóxido (O₂⁻).

La esfera de coordinación del cobre en el centro activo está formada por cuatro residuos de aminoácidos donadores de oxígeno y nitrógeno, tales como histidina y tirosina, dentro de un arreglo cuadrado plano o tetraédrico distorsionado. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la galactosa oxidasa que es una metaloenzima que cataliza la oxidación de D-galactosa.

- Tipo 3: A diferencia de los dos tipos de cuproproteínas anteriores, estas proteínas son dinucleares y cada átomo está rodeado por tres nitrógenos provenientes de residuos de histidina. No presentan espectro de *EPR* debido a un fuerte acoplamiento ferromagnético entre ambos átomos de cobre. Este tipo de proteínas tienden a unirse con oxígeno molecular a temperatura ambiente, este grupo está representado por tres proteínas características, dos de ellas metaloenzimas, la hemocianina, la tirosinasa y la catecol oxidasa, la primera transporta oxígeno en moluscos y crustáceos, mientras que las dos últimas fijan el oxígeno para llevar a cabo la oxidación de catecoles a sus respectivas o-quinonas, que posteriormente estas se polimerizan para formar la melanina.

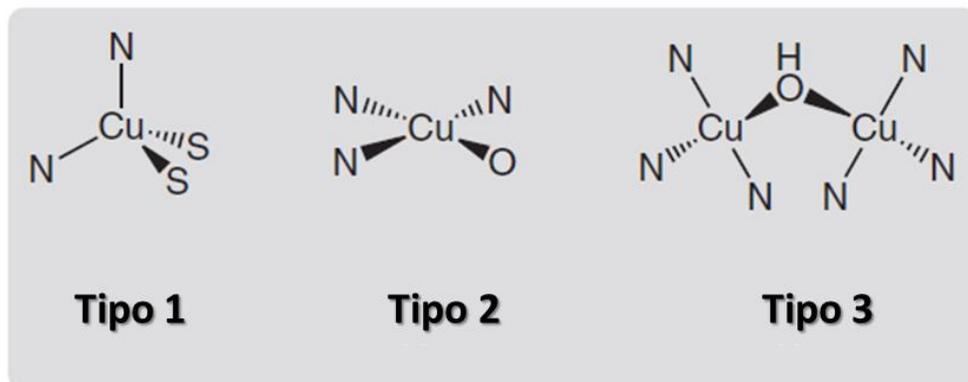


Figura 2. Los tres tipos de centros activos encontrados en la mayoría de las metaloproteínas de cobre.

Debido al desarrollo y mejora de las técnicas espectroscópicas y de la cristalografía, algunos estudios más recientes distinguen entre 7 tipos de sitios activos de proteínas que contienen cobre.

Es importante mencionar que estos tipos son más complejos que los primeros tres ya que suelen tener más de dos cobres en su estructura; estos tipos son: tipo 4, Cu_A, Cu_B y Cu_Z. [9],[10],[12],[13]

2.3. Catecol oxidasa

La enzima catecol oxidasa es considerada una enzima con un sitio activo del tipo 3 y a diferencia de la tirosinasa, cataliza exclusivamente la oxidación de catecoles a sus correspondientes orto-quinonas, en un proceso conocido como actividad catecolasa. Estas o-quinonas como ya se mencionó se autopimerizan para formar melanina, un proceso que sirve para proteger del daño de los insectos u otros factores a las plantas; la enzima catecol oxidasa puede ser encontrada en los tejidos de las plantas y en los crustáceos. Hay que señalar que la primera enzima de este tipo fue aislada en 1937. Actualmente la catecol oxidasa puede obtenerse a partir de papa, espinaca y manzana principalmente. La catecol oxidasa varía de forma y tamaño dependiendo del tejido y del organismo de donde se obtenga. [11],[14],[15]

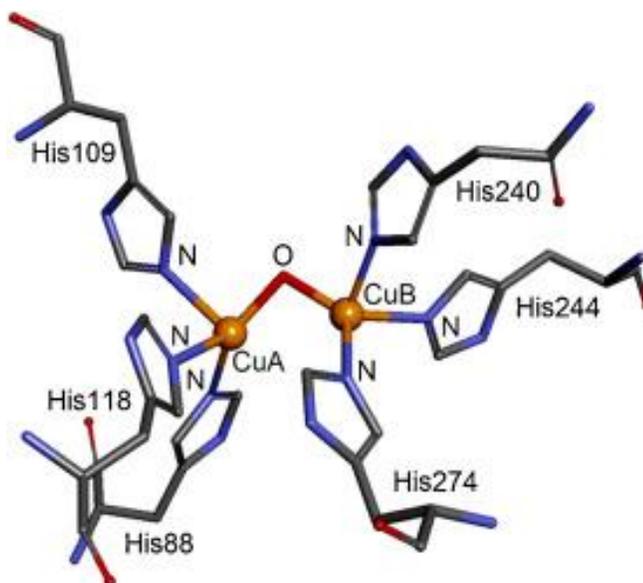


Figura 3. Estructura cristalina de la catecol oxidasa, obtenida a través de difracción de rayos X. [14]

2.3.1. Compuestos bioinspirados en la catecol oxidasa

La alta actividad catalítica de las enzimas ha inspirado y ha llevado a los investigadores a tratar de imitarlas para diversos propósitos, pero no son sólo las enzimas son las musas de los científicos sino es en general la naturaleza, así como sus procesos, son una fuente de inspiración. A este proceso de desarrollar compuestos químicos inspirados en los existentes en los sistemas biológicos se le llama química biomimética o bioinspirada.

Esta habilidad de las proteínas de cobre para fijar oxígeno molecular en condiciones ambientales ha llevado a muchos grupos de investigación a desarrollar catalizadores de cobre bioinspirados en la catecol oxidasa para poder usarlos como catalizadores en reacciones de oxidación. [11],[14]

Los primeros intentos por realizar reacciones de oxidación con compuestos de cobre (II) surgieron en los años 60s cuando se reportó que se llevó a cabo la oxidación del 3,5-diterbutilcatecol (3,5-DTBC) a 3,5-diterbutilquinona (3,5-DTBQ) con un rendimiento del 55%; cabe resaltar que en estos primeros intentos se usó el cloruro de cobre (II) (CuCl_2). Fue hasta los años 80s cuando empezaron a emplearse complejos dinucleares de cobre (II) para llevar a cabo la oxidación de diversos sustratos orgánicos, basándose así en las enzimas dinucleares de cobre, obteniéndose mejores resultados con estos últimos compuestos. [16],[17]

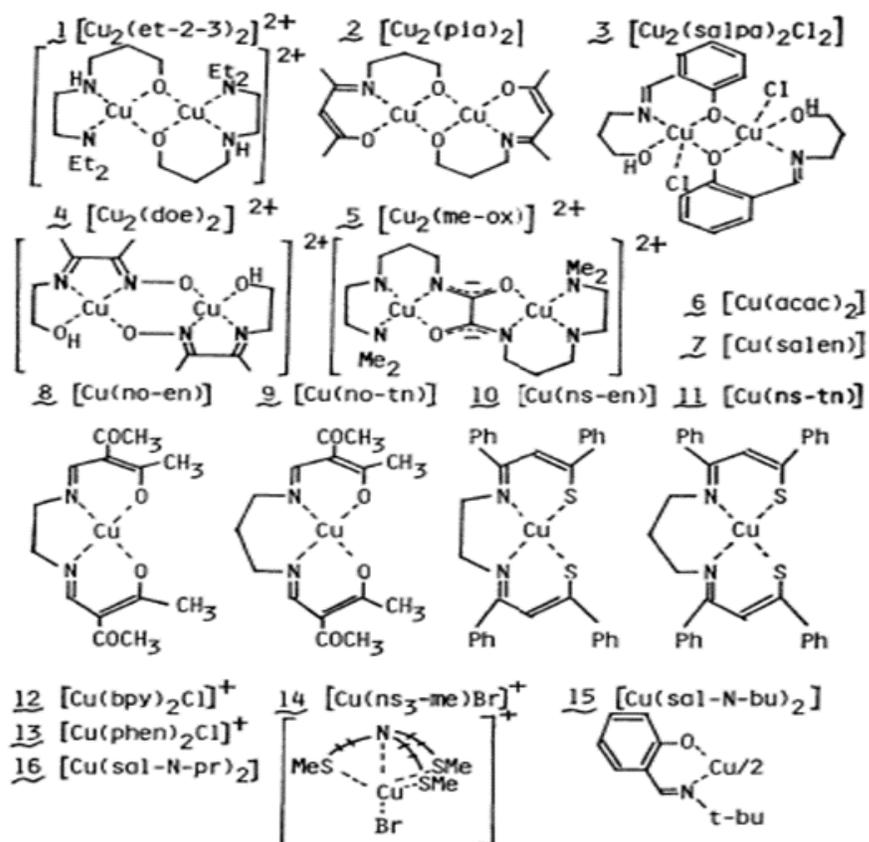
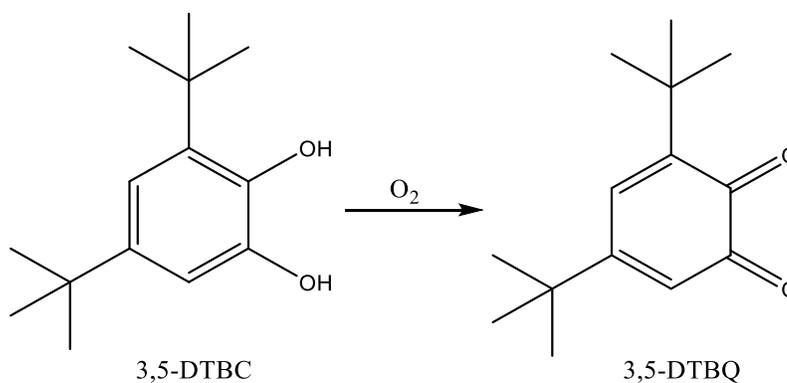


Figura 4. Esquemas de los primeros complejos de cobre (II) utilizados en la actividad catecolasa. [17]

La reacción que más se ha usado como modelo para el estudio de estos catalizadores de cobre, es la ya mencionada, la reacción de oxidación del 3,5-DTBC a la 3,5-DTBQ:



Esquema 2. Reacción modelo de la actividad catecolasa.
Oxidación de 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ.

3. Antecedentes

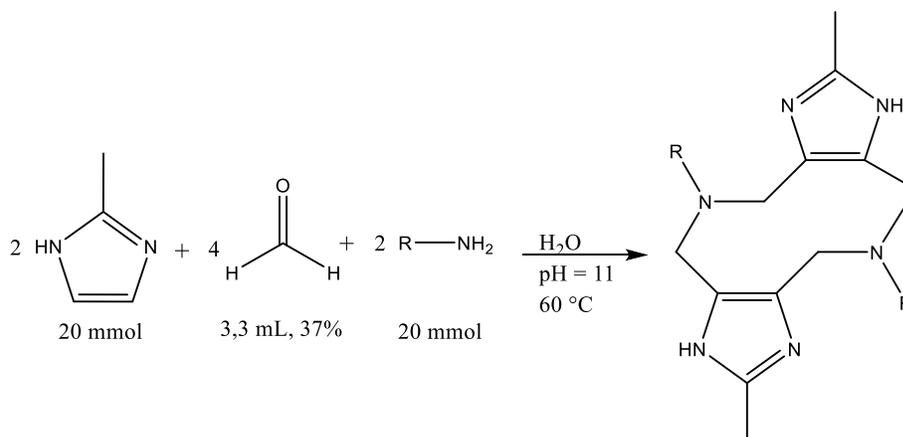
En el grupo de trabajo se han estudiado diversos compuestos de coordinación de cobre con ligantes derivados del grupo imidazol como catalizadores bioinspirados para reacciones de oxidación y acoplamiento oxidativo de fenoles. En su mayoría se ha trabajado con complejos dinucleares, pero en los últimos años se han desarrollado algunos complejos mononucleares con el fin de comparar y entender la importancia de los dos centros metálicos en la actividad catalítica. A todos estos compuestos se les ha caracterizado a través de difracción de rayos X, potenciometría para determinar sus constantes de formación, voltamperometría, espectroscopía de EPR, pero el presente trabajo se centrará en el estudio de la actividad catecolasa de estos catalizadores.

3.1. Síntesis de los complejos de cobre

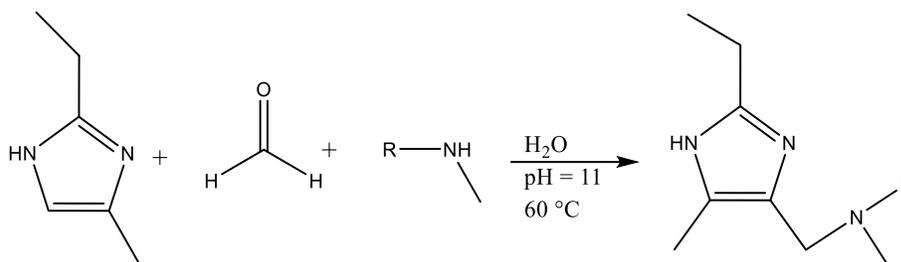
3.1.1. Ligantes

Los ligantes se sintetizan a través de la reacción de Mannich en condiciones básicas, que consiste en la formación de enlaces entre el carbono del aldehído, el grupo imidazol y una amina ya sea primaria o secundaria. Se usa como compuesto de partida el 2-metilimidazol en el caso de los complejos dinucleares (esquema 3) y 2-etil-4-metilimidazol para los mononucleares (esquema 4), además de formaldehído y una amina primaria o secundaria en donde estará contenido el grupo R de interés. [18],[19],[20]

Se utiliza condiciones básicas para favorecer la sustitución en los carbonos sp^2 del anillo heterocíclico, por el contrario, en medio ácido el nitrógeno sp^2 tiende a formar compuestos sustituidos. [18]



Esquema 3. Reacción de Mannich para ligantes dinucleantes.



Esquema 4. Reacción de Mannich para ligantes mononucleantes.

3.1.2. Complejos

Los complejos de cobres descritos en este grupo se han formado cuantitativamente al mezclar uno o dos equivalentes de una sal de cobre (II) (para los ligantes mononucleantes un equivalente y para los dinucleantes dos equivalentes) y un equivalente del ligante. [18]

3.2. Actividad catalítica

El estudio de la actividad catalítica se lleva a cabo a través de la reacción modelo, la cual plantea la reducción del cobre (II) a cobre (I), oxidando de esta forma al catecol en su respectiva quinona, y posteriormente gracias al oxígeno atmosférico el cobre (I) se vuelve a oxidar a cobre (II) para así completarse el ciclo catalítico, a la vez que produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Gracias a la presencia de dobles enlaces conjugados en la 3,5-DTBQ, la reacción se sigue a través de espectrofotometría de UV-vis verificando el aumento en la concentración de la 3,5-DTBQ a una longitud de onda de 407nm.

La mayor parte de los experimentos cinéticos se llevaron a cabo en una mezcla de disolventes, estos son MeOH/H₂O y MeCN/H₂O los cuales se les determinó el pH idóneo, 7.5 para el primer par de disolventes y 8.5 para el segundo par, ya que a esos valores de pH en ambos disolventes se alcanzaban las mayores velocidades de reacción. [21],[22]

Para estos estudios se usó el modelo de las velocidades iniciales, el cual consiste en medir la variación de la concentración del producto en los primeros instantes de la reacción, y la pendiente de dichos primeros instantes es la velocidad inicial a la que el sustrato se transforma en producto.

Al graficar la velocidad inicial (v_0) en función de la concentración de sustrato ([S]), se observa que los catalizadores siguen un modelo tipo Michaelis-Menten.

3.2.1. Modelo de Michaelis-Menten

El modelo de Michaelis-Mente es un modelo que explica el comportamiento cinético de las enzimas.

Se sabe que uno de los factores que afectan a la cinética enzimática es la concentración del sustrato [S], sin embargo, la concentración de sustrato cambia durante todo el experimento por lo que el estudio se vuelve complejo. Una metodología usada para el estudio de la variación de la concentración inicial de sustrato $[S]_0$ es justo la medición de la velocidad inicial (v_0), ya que en los primeros instantes de la reacción se contempla que [S] casi no ha cambiado por lo que se puede decir que se ha mantenido constante. Cuando se realiza una gráfica de la v_0 en función de la [S] se observa el siguiente comportamiento de parábola rectangular: [19],[23],[24]

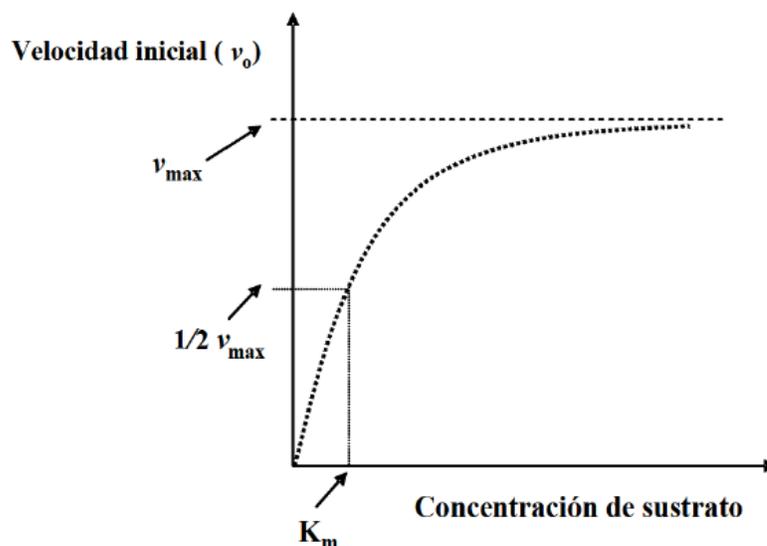
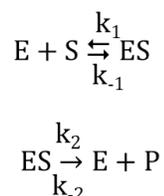


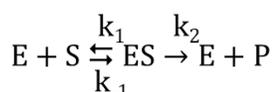
Figura 5. Gráfica de v_0 en función de $[S]$. Comportamiento enzimático. [19]

Para explicar este comportamiento Michaelis y Menten postularon que la enzima (E) se une al sustrato (S) de manera reversible en un primer paso formando así el complejo enzima-sustrato (ES). El complejo ES se separa en un segundo paso más lento, dando como resultado la enzima libre y el producto de reacción (P).



La ecuación de Michaelis Menten se puede deducir a través del modelo enzimático, en donde debe tomarse en cuenta tanto la reacción de formación como la de descomposición del complejo enzima-sustrato.

Debido a que en los primeros instantes de la reacción la concentración del producto [P] es mínima, se puede ignorar la reacción inversa a la descomposición del complejo enzima-sustrato, que se describe por la constante k_{-2} .



La v_0 está determinada por la descomposición del complejo enzima-sustrato para dar el producto, que depende de la concentración del complejo enzima-sustrato [ES].

$$v_0 = k_2[ES]$$

Debido a que [ES] no es un parámetro que se pueda medir directamente, se introducirá el término de concentración total de enzima $[E_T]$, que representa a la concentración de la enzima, ya sea enzima libre o como complejo enzima-sustrato. Por lo que la concentración de la enzima libre [E] puede expresarse como $[E_T] - [ES]$.

Las velocidades de formación (v_F) y de descomposición (v_D) del complejo enzima-sustrato viene determinada por las constantes de velocidad k_1 , k_{-1} y k_2 .

$$v_F = k_1([E_T] - [ES])[S]$$

$$v_D = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Gracias a la hipótesis del estado estacionario se supone que [ES] es constante, por lo que las velocidades de descomposición y formación del complejo enzima-sustrato son iguales.

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

Se simplifica y se despeja [ES]

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

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

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

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

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1}$$

Para simplificar aún más la expresión todas las constantes se combinan dando origen así a la constante de Michaelis (K_M). [23],[24]

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

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

Se sustituye [ES] en la expresión de velocidad para la formación del producto.

$$v_0 = k_2[ES]$$

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

A concentraciones altas de sustrato toda la enzima se encuentra saturada, es decir, en forma de complejo enzima-sustrato, por lo que se alcanza la velocidad inicial máxima o velocidad máxima ($v_{m\acute{a}x}$).

$$v_{m\acute{a}x} = k_2[E_T]$$

Por último, se sustituye $v_{m\acute{a}x}$ en la ecuación de v_0 , dando como resultado la ecuación de Michaelis-Menten. [20]

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_M}$$

De la ecuación de Michaelis-Menten surge una relación especial, cuando la v_0 es exactamente la mitad de la $v_{m\acute{a}x}$, la concentración inicial del sustrato [S] es igual a la K_M . Lo cual puede ser observado en la figura 5. La K_M representa la cantidad necesaria de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad inicial máxima ($v_{m\acute{a}x}$). [25],[26]

$$\frac{v_{m\acute{a}x}}{2} = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_M}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$$K_M + [S] = 2[S]$$

$$K_M = 2[S] - [S]$$

$$K_M = [S]$$

Gracias a que los complejos siguen este tipo de comportamiento se puede obtener los siguientes parámetros, que permiten contrastar los datos obtenidos con los ya encontrados en la literatura:

- La constante de Michaelis (K_M), que es un parámetro que permite conocer la afinidad de la enzima por el sustrato, entre más pequeño sea este valor, mayor afinidad tendrá la enzima.
- La velocidad máxima ($v_{m\acute{a}x}$) representa la velocidad máxima a la que puede llegar una enzima debido a la saturación de los sitios activos de la enzima.
- La constante del catalizador (k_{cat}) representa el número de moléculas de sustrato transformadas en producto por unidad de tiempo por molécula de catalizador.

Existe otro parámetro que además de mostrar la eficiencia del catalizador, permite comparar los catalizadores trabajados con los de la literatura, este parámetro es la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M).

3.3. Ligantes y catalizadores considerados en el estudio

Se sabe que la catecol oxidasa tiene a dos iones de cobre (II) coordinados a residuos de histidina en su sitio activo; por lo que en el grupo de trabajo con el que se colabora se han sintetizado, en su mayoría, ligantes capaces de coordinar a dos iones de cobre (II), es decir, ligantes dinucleantes derivados del grupo imidazol. Estos ligantes dinucleantes tiene un anillo de diez miembros en su estructura, siendo 2 de estos átomos de nitrógeno y los 8 restantes átomos de carbono (anillo de diazecina).

Los ligantes sintetizados tienen dos sitios de coordinación tridentados. Los átomos coordinantes de su sitio activo se conforman por el nitrógeno proveniente del imidazol y por el nitrógeno de la amina, mientras que el tercer átomo corresponde al grupo R de la amina. [20],[27]

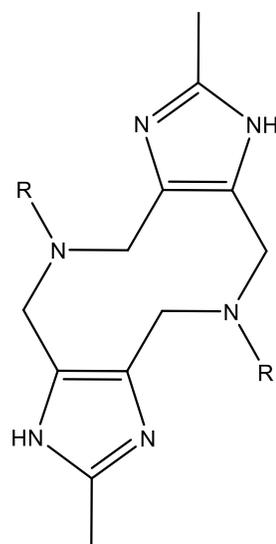


Figura 6. Estructura base para los ligantes dinucleantes.

Los ligantes dinucleantes se clasifican en ligantes cortos y largos, esto depende de la longitud de la cadena alifática entre la amina terciaria y el tercer átomo donador, en el caso de los ligantes cortos es de 2 átomos de carbono y 3 en el caso de los largos.

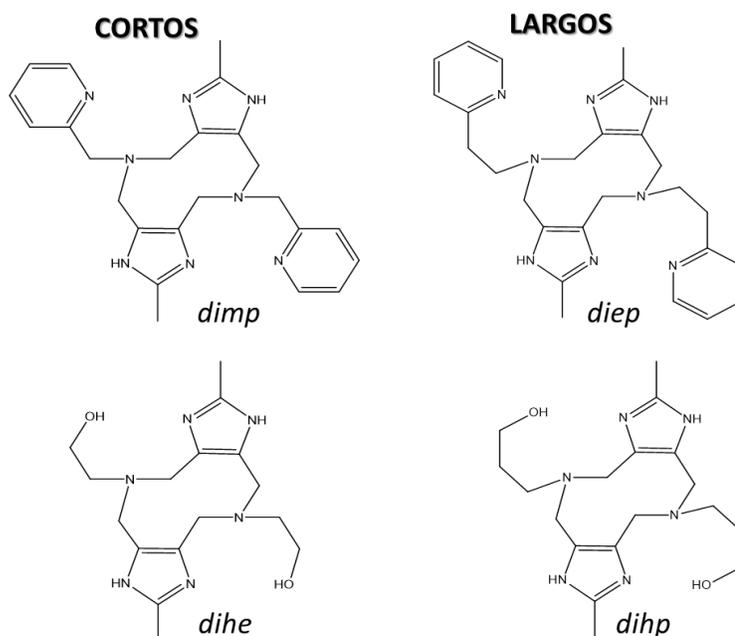


Figura 7. Estructuras de los ligantes dinucleantes trabajados más recientemente. Clasificados en ligantes cortos (*dimp* y *dihe*) y ligantes largos (*diep* y *dihp*).

Recientemente en el grupo de investigación con el que se colabora se han empezado sintetizar y caracterizar algunos complejos con ligantes mononucleantes con el fin de contrastar su actividad catalítica con sus homólogos dinucleares. La estructura de estos ligantes es muy similar a la de los dinucleantes, puesto que el único sitio de coordinación que poseen está conformado por el nitrógeno de la amina, el nitrógeno del imidazol y por un tercer átomo donador; este último proveniente del grupo R de la amina usada en la síntesis. Otro aspecto compartido es que se pueden clasificar en cortos y largos dependiendo de su cadena alifática.

3.3.1. Estructura

Se ha podido determinar la estructura de los complejos de cobre, tanto dinucleares como mononucleares, gracias a la difracción de rayos X.

Los compuestos dinucleares de cobre tienen una estructura piramidal de base cuadrada un poco distorsionada y siguen el siguiente modelo $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_4]$. Donde la base la forman los átomos provenientes del ligante y una molécula de agua y la posición apical la ocupa otra molécula de agua. [18],[28]

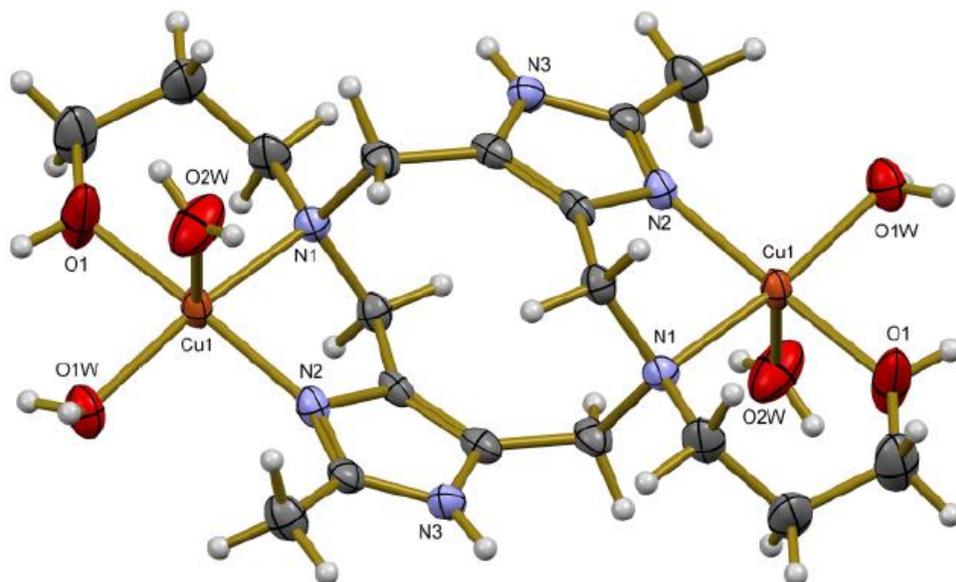


Figura 8. Estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}_2(\text{dihe})(\text{H}_2\text{O})_4]^{4+}$ a través de difracción de rayos x. [18]

Los complejos con ligantes mononucleantes se han logrado cristalizar únicamente usando de disoluciones metanólicas y usando nitrato como contraión. En estas condiciones, los nitratos permanecen coordinados al metal, por lo que los complejos presentan una geometría piramidal de base cuadrada, siguiendo el siguiente modelo $[\text{Cu}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$, donde las posiciones de la base la conforman los átomos de nitrógeno del ligante y un átomo de oxígeno proveniente del grupo nitrato, mientras que la posición apical la ocupa el otro grupo nitrato. [28],[29]

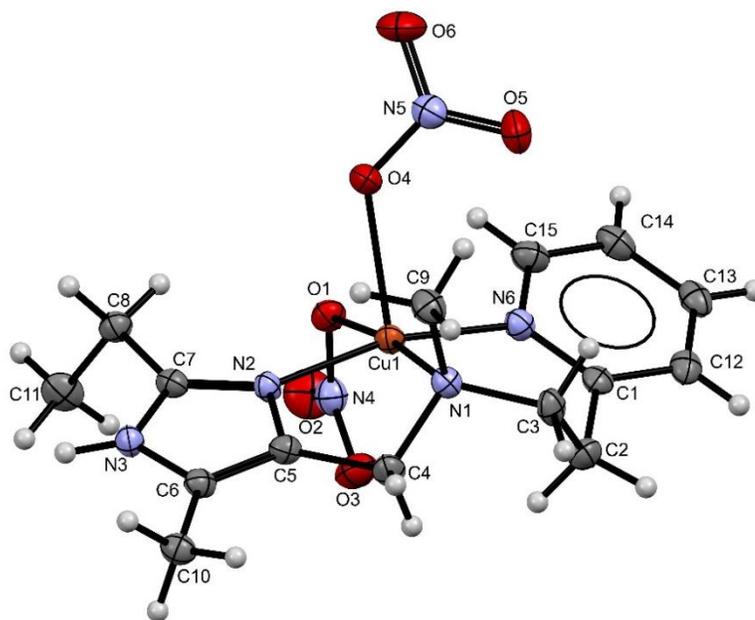


Figura 9. Estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}(\text{miep})(\text{NO}_3)_2]$ a través de difracción de rayos x.

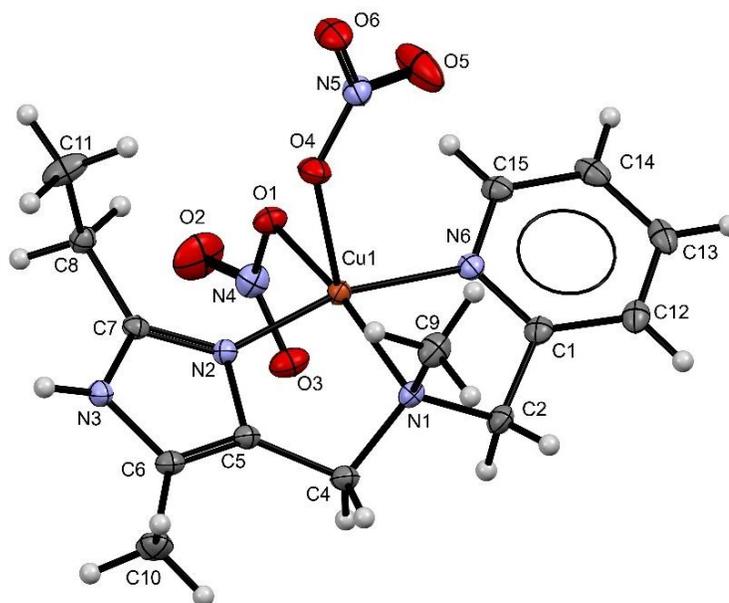


Figura 10. Estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}(\text{mimp})(\text{NO}_3)_2]$ a través de difracción de rayos x.

Hay que destacar que a los complejos de ligantes mononucleantes, sólo se les han realizado estudios estructurales.

3.3.2. Actividad catecolasa

Se debe tomar en cuenta que todos los estudios cinéticos en los complejos dinucleares se hicieron a pH ligeramente básicos, entre 7.5 y 8.5, por lo que se puede decir, gracias a los estudios en disolución, que son las formas hidrolizadas de los complejos, del grupo con el que se colabora, los que están teniendo una considerable actividad catalítica.

A continuación, se muestra una tabla que recopila la información obtenida a través del estudio de la actividad catecolasa para cuatro de los más recientes catalizadores dinucleares desarrollados en el grupo de investigación mencionado:

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la actividad catecolasa

<i>Complejo</i>	Log β	k_{cat} [s ⁻¹]	$K_M \times 10^4$ [molL ⁻¹]	k_{cat}/K_M	Cadena lateral
<i>Cu₂dimp</i>	18.63	0.0788	5.16	153	CH ₂ -py
<i>Cu₂diep</i>	19.07	0.0175	0.289	605	CH ₂ -CH ₂ -py
<i>Cu₂dihe</i>	10.82	0.0435	0.7024	620	CH ₂ -CH ₂ -OH
<i>Cu₂dihp</i>	9.91	0.0657	0.2396	2742	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH

py = piridina.

Se puede observar que, en ambos grupos (los ligantes con piridina y los ligantes con hidroxilo) el catalizador con una cadena alifática más larga, ligantes largos, es el que presenta una mayor eficiencia catalítica. Lo anterior puede explicarse debido a que en un anillo de seis miembros hay mayor flexibilidad para el cambio de geometría derivado del cambio en el estado de oxidación del cobre. [18],[28]

Es importante destacar que los catalizadores empleados en este grupo de investigación presentan una constante de Michaelis más alta en comparación de otros catalizadores de este rubro encontrados en la literatura, [14],[28] lo que da pie a seguir trabajando sobre ellos.

3.3.3. Nuclearidad en la actividad catalítica de los complejos de Cu (II)

Durante muchos años, en este grupo de investigación se han realizado distintos estudios que explican las propiedades espectroscópicas, en disolución y catalíticas que exhiben los distintos complejos dinucleares de Cu(II) descritos anteriormente. Particularmente, en los estudios cinéticos se ha encontrado que sus complejos dinucleares de Cu(II) presentan una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) en procesos oxidativos superiores a muchos otros catalizadores.

Ante los notables resultados cinéticos y dado que, en diferentes enzimas de Cu, participan varios iones metálicos, en el grupo de trabajo surgió la interrogante respecto a una posible sinergia entre los 2 átomos de Cu(II) de los complejos.

Esta interrogante motivó en primera instancia a proponer y realizar estudios cinéticos comparativos entre los complejos dinucleares y 2 equivalentes de su análogo mononuclear. De estos nuevos estudios se encontró que los 2 equivalentes del complejo mononuclear de Cu(II) presentan una actividad catecolasa inferior a un equivalente de su análogo dinuclear, pero hasta la fecha no se ha comprendido la causa de este fenómeno.

La primera evidencia que se obtuvo se deriva de estudios de actividad catecolasa con los complejos que se muestran en la siguiente tabla: [18]

Tabla 3. Valores de parámetros cinéticos de la actividad catecolasa en MeOH/H₂O a 25°C.

Catalizador	[Cu ₂ (<i>glimeim</i>)(H ₂ O) ₄] ²⁺	[Cu ₂ (<i>dimeim</i>)(H ₂ O) ₂] ⁴⁺	[Cu(<i>emisar</i>)(H ₂ O) ₂] ⁺	[Cu(<i>emitrim</i>)(H ₂ O) ₂] ²⁺
K _M (M)	0.76 x 10 ⁻³	1.81x 10 ⁻³	47.24 x 10 ⁻³	9.02 x 10 ⁻³
k _{cat} (s ⁻¹)	0.07399	0.1193	0.1854	0.0616
k _{cat} /K _M	97.36	65.91	3.93	6.83

Notablemente, se puede observar en la tabla 3 que la relación k_{cat}/K_M de los complejos mononucleares de Cu(II) son muy inferiores a los de sus análogos dinucleares. Lo que indica que la presencia de un segundo centro metálico de Cu(II) eleva significativamente su actividad catecolasa.

La primera y única explicación hasta la fecha de esta manifestación proviene de un estudio teórico-experimental [36] que consiste principalmente en relacionar el valor calculado del carácter electroceptor (ω^+ , en eV) de algunos complejos de Cu(II) con el valor experimental constante de Michaelis-Menten (K_M , en mmol/L) obtenida de los estudios de actividad catecolasa. El mayor carácter electroceptor como se puede observar en la figura 11 obtenido para los complejos dinucleares sugiere que, la presencia de un segundo catión metálico en ellos mejora la capacidad electroceptora del complejo, lo que a su vez puede asociarse a una mayor afinidad por el sustrato.

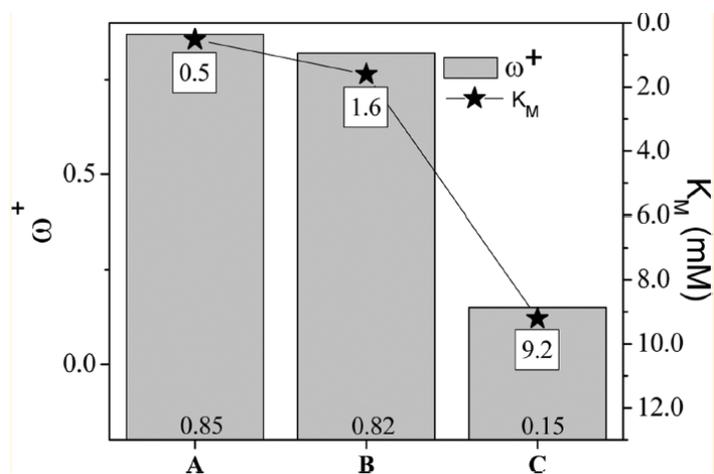


Figura 11. Relación entre el carácter electroceptor (ω^+) de complejos de Cu(II) con el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_M). [36]

Años más tarde, [18] se realizaron estudios preliminares comparativos de actividad fenoxazinona sintasa entre complejos dinucleares y 2 equivalentes de sus análogos mononucleares de Cu(II). En la figura 12, se logra observar notablemente que el crecimiento de la banda en 433 nm asociada a la formación del producto de acoplamiento del 2-aminofenol en el mismo intervalo de tiempo es muy superior para los complejos dinucleares de Cu(II) en comparación con 2 equivalentes de su análogo mononuclear.

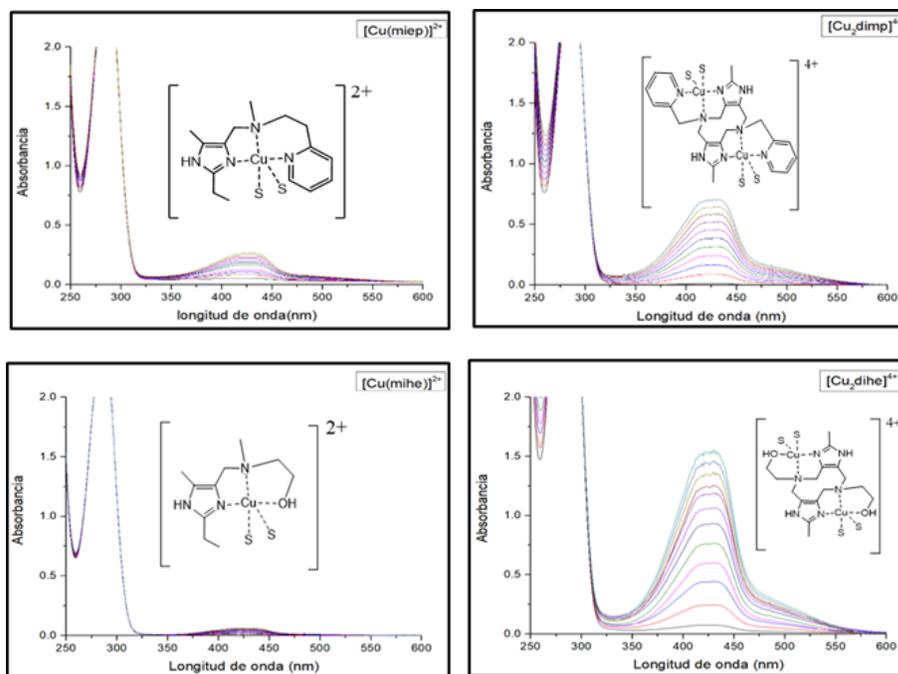


Figura 12. Comparación de los avances de reacción entre complejos mononucleares (izquierda) y ligantes dinucleares (derecha).

Esta nueva evidencia también apuntó hacia que la presencia de un segundo átomo de Cu(II) es relevante en su actividad catalítica.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad catecolasa de los complejos mononucleares de cobre (II) con ligantes derivados del imidazol y compararlos con sus análogos dinucleares. Así mismo, relacionar el comportamiento catalítico de los complejos mononucleares de cobre (II) con su comportamiento electroquímico.

4.2. Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar los ligantes *miep* y *mimp* a través de la reacción de Mannich en medio básico.
- Determinar potenciométricamente las constantes de acidez, K_a , de los ligantes *miep* y *mimp*.
- Obtener la especiación de los complejos, *Cumiep* y *Cumimp*, en función del pH determinar las constantes de formación, β , así como sus constantes de hidrólisis, K_a ; mediante potenciometría de corriente nula.
- Determinar las propiedades redox en disolución de los complejos *Cumiep* y *Cumimp*, empleando voltamperometría cíclica.
- Evaluar la actividad catalítica de los complejos *Cumiep* y *Cumimp* en la reacción de oxidación del di-tert-butil catecol en medio MeOH/H₂O.
- Comparar la actividad catecolasa de los complejos mononucleares *Cumiep* y *Cumimp* con sus análogos dinucleares *Cu₂diep* y *Cu₂dimp*.

5. Hipótesis

- La actividad catalítica del complejo *Cumiep* será mayor que en el complejo *Cumimp*, debido a que posee un anillo quelato de más miembros que facilita el cambio de geometría en el proceso de reducción del Cu^{2+} a Cu^+ .
- Los complejos dinucleares Cu_2diep y Cu_2dimp , presentarán una mayor actividad catecolasa en comparación con 2 equivalentes de sus análogos mononucleares *Cumiep* y *Cumimp*, respectivamente.

6. Resultados y discusión de resultados

6.1. Estudios en disolución de los sistemas L/[CuL]

Debido al medio en el que se realizan los experimentos catalíticos, es importante comprender el comportamiento o especiación de nuestros complejos en función del pH; ya que esto ayudará a proponer la especie activa catalíticamente.

Estos estudios consisten en determinar los valores tanto las constantes de acidez (pK_a) de los ligantes, así como las constantes de formación ($\log\beta$) de sus respectivos complejos e hidroxocomplejos de cobre (II), con las cuales se pudo obtener el diagrama de predominio de especies para ambos complejos, *Cumiep* y *Cumimp*.

Se realizaron titulaciones potenciométricas para ambos ligantes, *miep* y *mimp*, así mismo como a sus respectivos complejos a tres distintas concentraciones 2 mmol/L, 3 mmol/L, y 5 mmol/L, y con exceso de H^+ , para lo cual se empleó una disolución de HCl 0.1 mol/L estandarizada. Todos los estudios se hicieron por triplicado, usando como titulante una disolución de NaOH 0.1 mol/L estandarizada.

6.1.1. Determinación de las constantes de acidez (pK_a) de los ligantes

Para poder obtener las constantes de formación de los complejos es necesario conocer las constantes de acidez de los ligantes (*miep* y *mimp*), por lo que la primera parte consta en determinar estos valores.

Para poder interpretar de una forma correcta las curvas de titulación, es importante conocer la estructura de los ligantes y saber así cuales son los posibles sitios de protonación. Ambos ligantes tienen tres sitios de protonación: el primero ubicado en el nitrógeno del anillo de piridina; el siguiente en el nitrógeno terciario de la cadena alifática y el último sitio en el nitrógeno disponible, nitrógeno sp^2 , del imidazol. (figura 13)

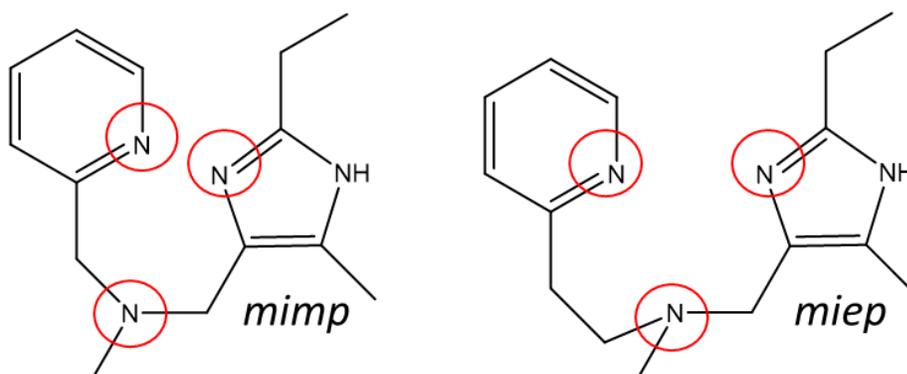


Figura 13. Sitios protonables en las representaciones estructurales de los ligantes *miep* y *mimp*.

Debido a que se plantean los tres sitios protonables en ambos ligantes, se agregaron 4 equivalentes de ácido clorhídrico para asegurar la protonación de todos los sitios.

6.1.1.1. Ligante *mimp*

A continuación, se muestran las titulaciones realizadas para el ligante *mimp* a tres distintas concentraciones: 2 mmol/L, 3 mmol/L y 5 mmol/L. Cada curva de titulación del *mimp* fue contrastado con una curva de ácido fuerte (HCl) con una concentración 4 veces mayor que la concentración de *mimp*.

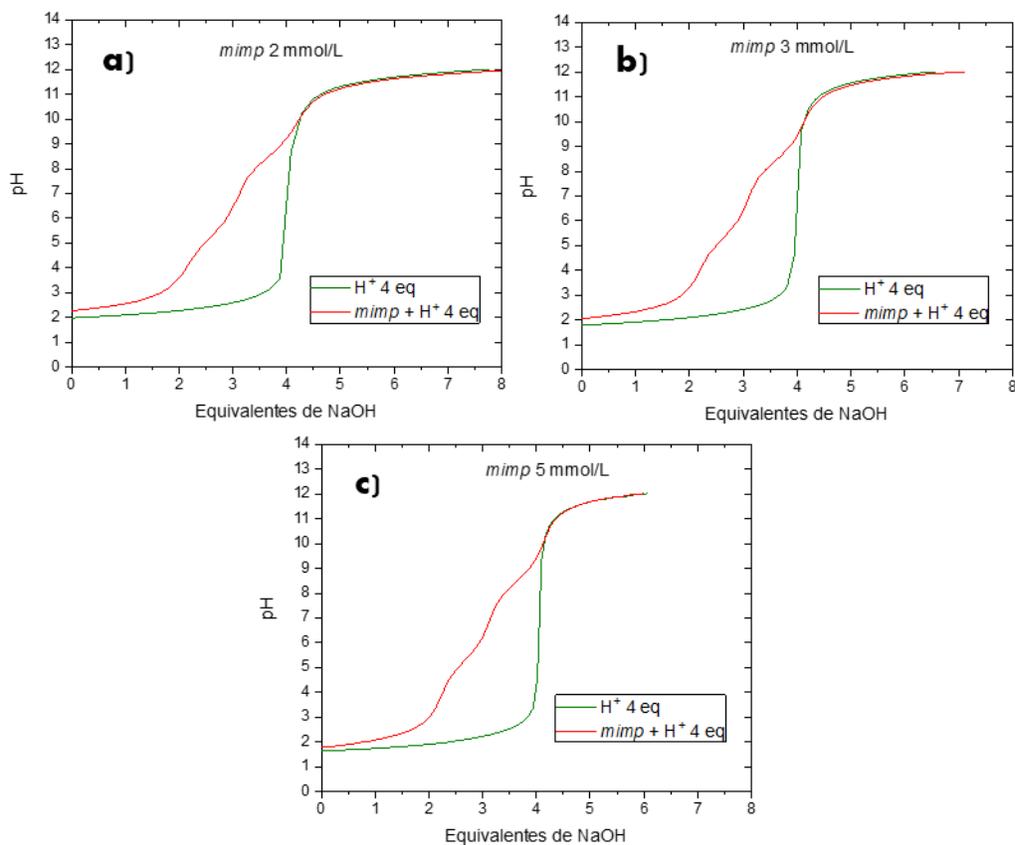


Figura 14. Gráficas de titulaciones del *mimp* a diferentes concentraciones.
 a) 2 mmol/L b) 3 mmol/L c) 5 mmol/L.

En la figura 14, se puede observar que el último salto de pH en la curva del *mimp* coincide con el valor de 4 equivalentes en la curva del ácido fuerte, que fueron los equivalentes agregados a la disolución de *mimp*. En la curva de titulación del ligante *mimp*, se observa un primer salto de pH cercano a los 2 equivalentes de NaOH agregados, esto implica que una de las protonaciones sugeridas para el ligante presenta un pKa por debajo de 1.5 y en esta condición se comporta como ácido fuerte.

Se observa también que si bien ambas curvas tienen el mismo número de equivalentes de H⁺, el pH inicial de la curva del *mimp* (roja) es más alto que la curva de ácido fuerte (verde), debido a que el ligante al estar protonado con 2 equivalentes de H⁺ deja 2 equivalentes de H⁺ libre comparados con los 4 equivalentes de H⁺ libre que tiene el ácido fuerte, lo que explicaría el pH de este último es más bajo.

Con ayuda del programa *Hyperquad 2008*, se puede obtener un ajuste matemático de los distintos valores de las constantes de formación de las especies involucradas, con dichas constantes se pueden obtener los valores de pKa para el *mimp*, los cuales son:

Tabla 4. Valores de pKa para *mimp*

Equilibrio	pKa
$(H_2mimp)^{2+} \rightleftharpoons (Hmimp)^+ + H^+$	4.79 ± 0.02
$(Hmimp)^+ \rightleftharpoons mimp + H^+$	8.12 ± 0.04

Con estos valores se puede realizar una gráfica de distribución de especies a lo largo de la escala de pH, con ayuda de la fracción molar distributiva (ϕ_x).

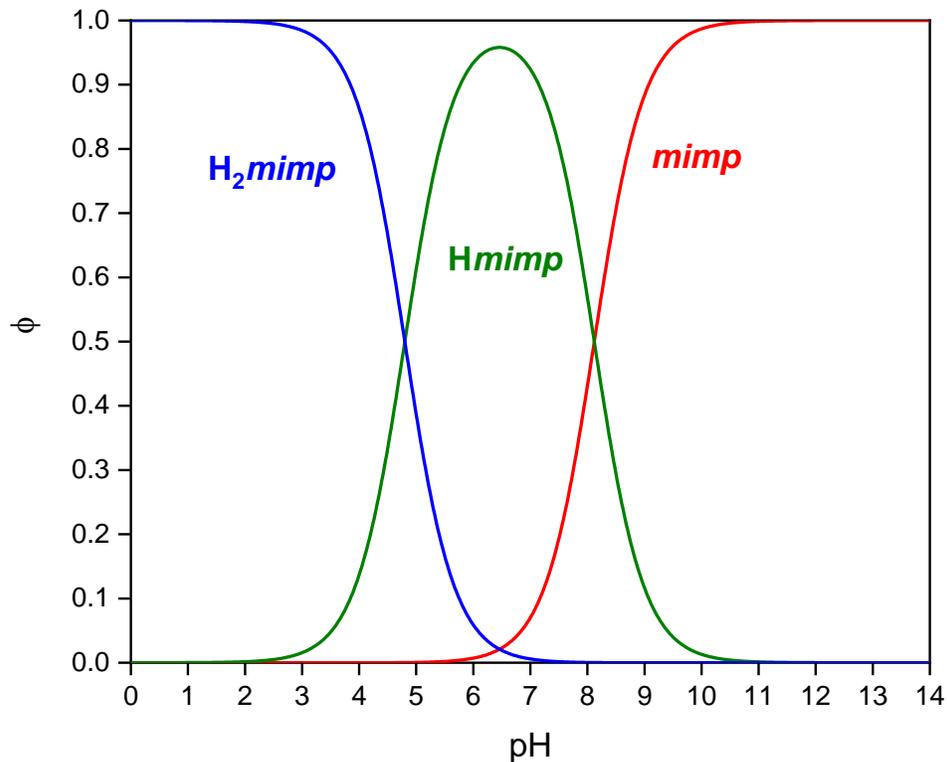


Figura 15. Diagrama de distribución de especies en función del pH para el ligante *mimp*.

Esta técnica junto con el programa *Hyperquad 2008* permite conocer los valores de pKa de una sustancia, pero no aporta información acerca de la ubicación estructural de estos protones.

Indagando en la literatura se puede encontrar que las aminas terciarias tienen valores de pKa que van desde 9.4 a 10.2, el grupo imidazol tiene valores de 6.7-7.0, mientras que las piridinas tienen valores de pKa de 5.0-6.0. [30],[31],[32]

Una vez que se conoce el comportamiento ácido-base de cada grupo individual, es posible proponer una asignación de los valores de pKa al ligante (*mimp*). La propuesta se describe en la figura 16.

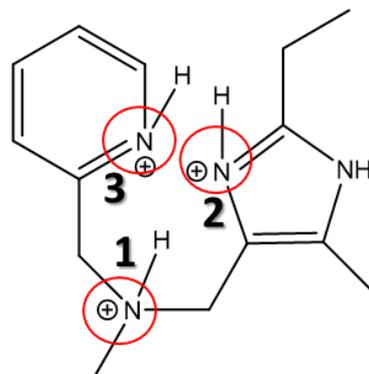


Figura 16. Asignación de los valores de pKa a la estructura del *mimp*.

1) 8.12, 2) 4.79 y 3) En disolución acuosa se comporta como ácido fuerte.

6.1.1.2. Ligante *miep*

A continuación, se muestran las titulaciones realizadas para el ligante *miep* a tres distintas concentraciones: 2 mmol/L, 3 mmol/L y 5 mmol/L. Cada curva de titulación del *miep* fue contrastado con una curva de ácido fuerte (HCl) con una concentración 4 veces mayor que la concentración de *miep*.

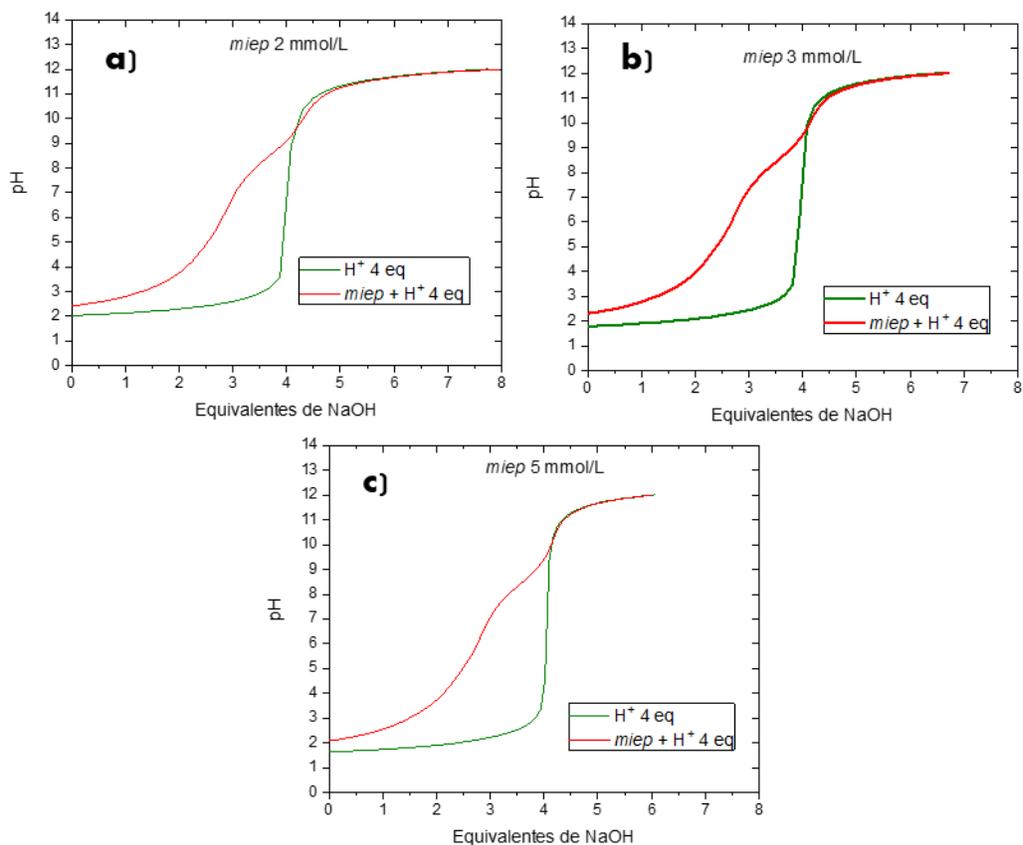


Figura 17. Gráficas de titulaciones del *miep* a diferentes concentraciones.
a) 2 mmol/L b) 3 mmol/L c) 5 mmol/L.

En la figura 17, en las curvas de titulación, no se observan distintivamente los saltos de pH en comparación con la curva de titulación del ligante *mimp*; pero sí se alcanza a apreciar que en efecto se titularon 4 equivalentes ácidos, ya que la curva del ligante coincide con la de ácido fuerte. Si bien, los saltos no se observan claramente, se puede notar que el pH inicial de la curva del *miep* (curva roja) es más alto que la curva de ácido fuerte (curva verde), lo que indica que al estar protonado con 3 equivalentes de H^+ deja 1 equivalente de H^+ libre, comparado con los 4 equivalentes de H^+ libre que tiene el ácido fuerte, lo cual explica que el pH de la curva verde sea más bajo.

Con ayuda del programa *Hyperquad 2008*, se puede obtener de un ajuste matemático los distintos valores de las constantes de formación de las especies involucradas, con los cuales se puede concluir que en este caso los tres sitios del *miep* en efecto están protonados, así mismo se obtiene que los 3 valores de pKa para el *miep*, los cuales son:

Tabla 5. Valores de pKa para *miep*

Equilibrio	pKa
$(H_3miep)^{3+} \rightleftharpoons (H_2miep)^{2+} + H^+$	2.11 ± 0.05
$(H_2miep)^{2+} \rightleftharpoons (Hmiep)^+ + H^+$	5.04 ± 0.07
$(Hmiep)^+ \rightleftharpoons miep + H^+$	8.14 ± 0.08

Con estos valores se puede realizar una gráfica de distribución de especies a lo largo de la escala de pH, con ayuda de la fracción molar distributiva (ϕ_x).

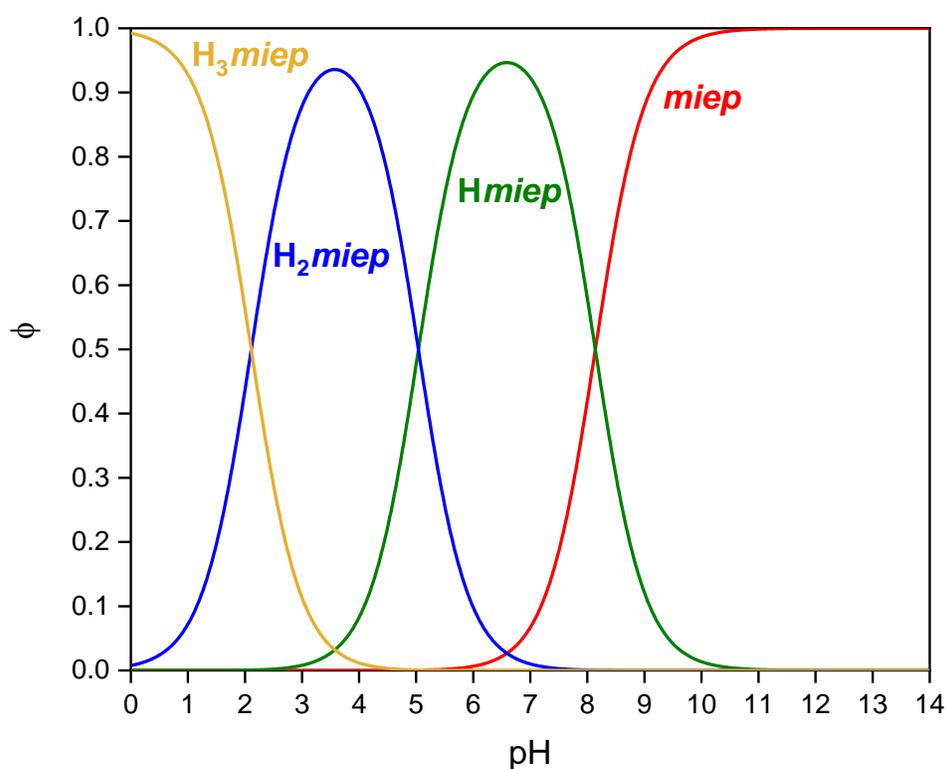


Figura 18. Diagrama de distribución de especies en función del pH para el ligante *miep*.

Como ya se explicó en la discusión del *mimp*, esta técnica no permite asignar los valores de pKa a los sitios protonables de los ligantes, por lo que es necesario recurrir a la literatura para poder tener un punto de partida.

La propuesta de asignación de valores de pKa para el ligante *miep* se observa en la figura 19.

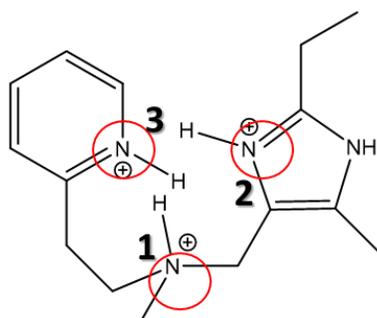


Figura 19. Asignación de los valores de pKa a la estructura del *miep*.

1) 8.14, 2) 5.04 y 3) 2.11

6.1.2. Determinación de las constantes de hidrólisis de los hidroxocomplejos de Cu(II)

Para poder asignar la especiación de nuestros complejos a distintos valores de pH hace falta obtener las constantes de formación del cobre con los distintos ligantes (*miep* y *mimp*) y de sus correspondientes hidroxocomplejos.

6.1.2.1. Complejo *mimp*

Al igual que con el *mimp*, se realizaron 3 titulaciones a tres distintas concentraciones de *mimp*: 2 mmol/L, 3 mmol/L y 5 mmol/L; a las cuales se les añadió un equivalente de Cu²⁺ estandarizado (CuCl₂). Cada curva se contrasta con una curva de ácido fuerte (HCl) y con la curva de titulación del *mimp*. Dichas curvas de titulación se muestran a continuación.

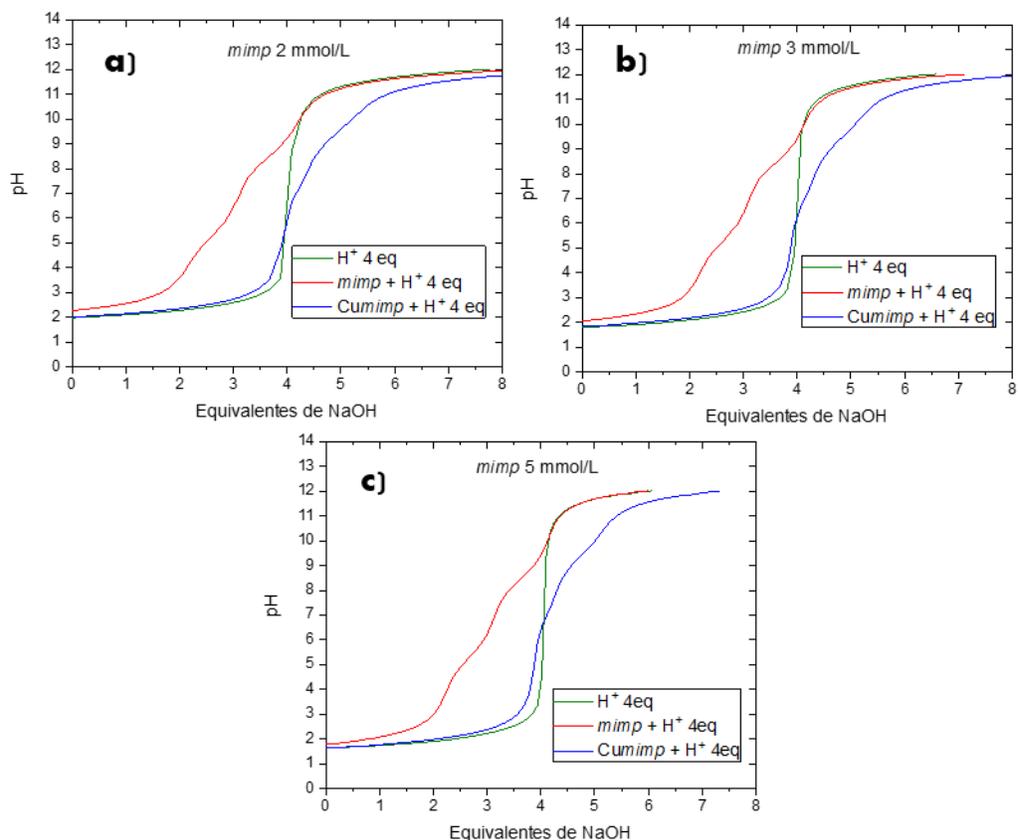


Figura 20. Gráficas de titulaciones del *Cumimp* a diferentes concentraciones. a) 2 mmol/L b) 3 mmol/L c) 5 mmol/L.

En la figura 20, se observa que la curva de titulación del complejo *Cumimp* inicia en el mismo valor de pH que la curva de ácido fuerte, lo que dice que el ligante prefiere coordinarse al cobre libre que a tener sus sitios protonados. Esto se confirma al observar la forma del salto cerca de los 4 equivalentes, indicio de que esos equivalentes estaban como protones libres en la disolución. Se observa también que en un valor de 5 equivalentes de NaOH hay un salto de pH, el cual puede ser asociado a la formación del complejo hidroxilado, $[Cumimp(OH)]^+$.

En ambos complejos de Cu(II), alrededor de pH=11 ya se comienza a observar aparición de un precipitado cuya identidad es la del dihidroxocomplejo, por lo que se puede observar una inflexión en la curva de titulación correspondiente a la formación del $[\text{Cumimp}(\text{OH})_2]_{(\text{ac})}$, pero debido al efecto nivelador de la precipitación sobre esta especie no es posible conocer con exactitud su valor de pKa. Esta información es de suma importancia para el tratamiento de los datos en el programa *Hyperquad*.

Con ayuda del programa *Hyperquad 2008*, se obtiene que los valores de $\log\beta$ para el *Cumimp* son:

Tabla 6. Valores de $\log\beta$ y de pKa para *Cumimp*

Equilibrio	pKa	$\log\beta$
$\text{Cu}^{2+} + \text{mimp} \rightleftharpoons [\text{Cumimp}]^{2+}$	---	15.58 ± 0.1
$\text{Cu}^{2+} + \text{mimp} + \text{OH}^- \rightleftharpoons [\text{Cumimp}(\text{OH})]^+$	---	20.95 ± 0.08
$[\text{Cumimp}]^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cumimp}(\text{OH})]^+ + \text{H}^+$	8.63	---

Con estos valores se puede realizar una gráfica de distribución de especies a lo largo de la escala de pH, con ayuda de la fracción molar distributiva (ϕ_x).

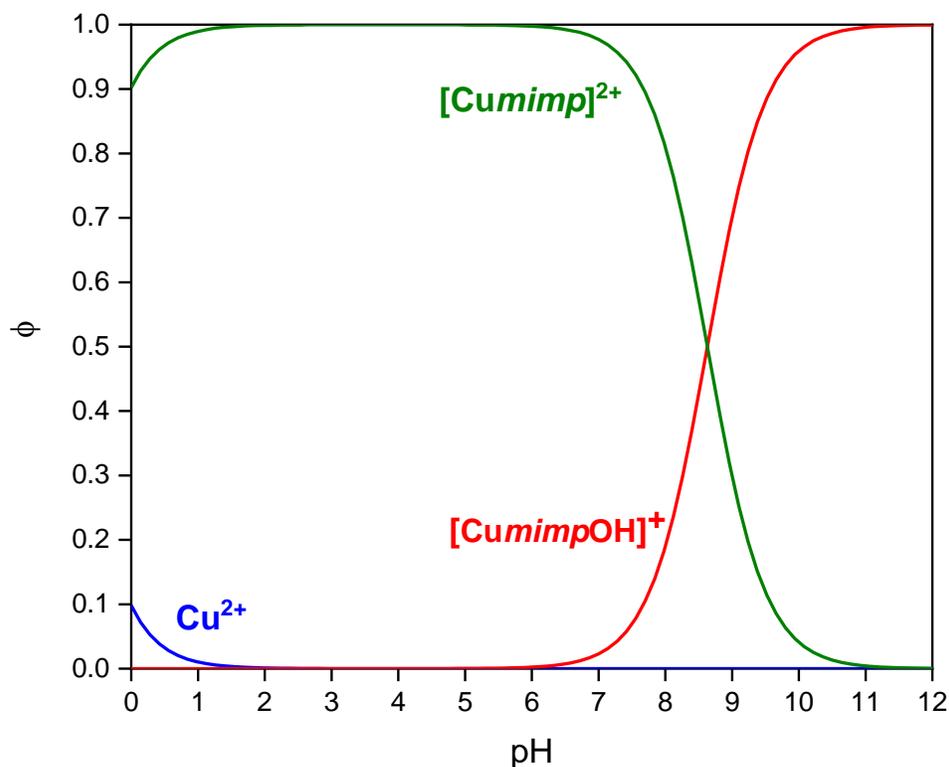


Figura 21. Diagrama de distribución de especies para *Cumimp*.

En la figura 21, se puede observar que el cobre (II) no predomina a ningún valor de pH en presencia del ligante *mimp*, por lo que se podría dividir la escala de pH entre el complejo *Cumimp* y el hidroxocomplejo $[\text{CumimpOH}]^+$.

6.1.2.2. Complejo *miep*

Al igual que con el *mimp*, se realizaron 3 titulaciones a tres distintas concentraciones de *miep*: 2 mmol/L, 3 mmol/L y 5 mmol/L; a las cuales se les añadió un equivalente de Cu^{2+} estandarizado (CuCl_2). Cada curva se contrasta con una curva de ácido fuerte (HCl) y con la curva de titulación del *miep*. Dichas curvas de titulación se muestran a continuación.

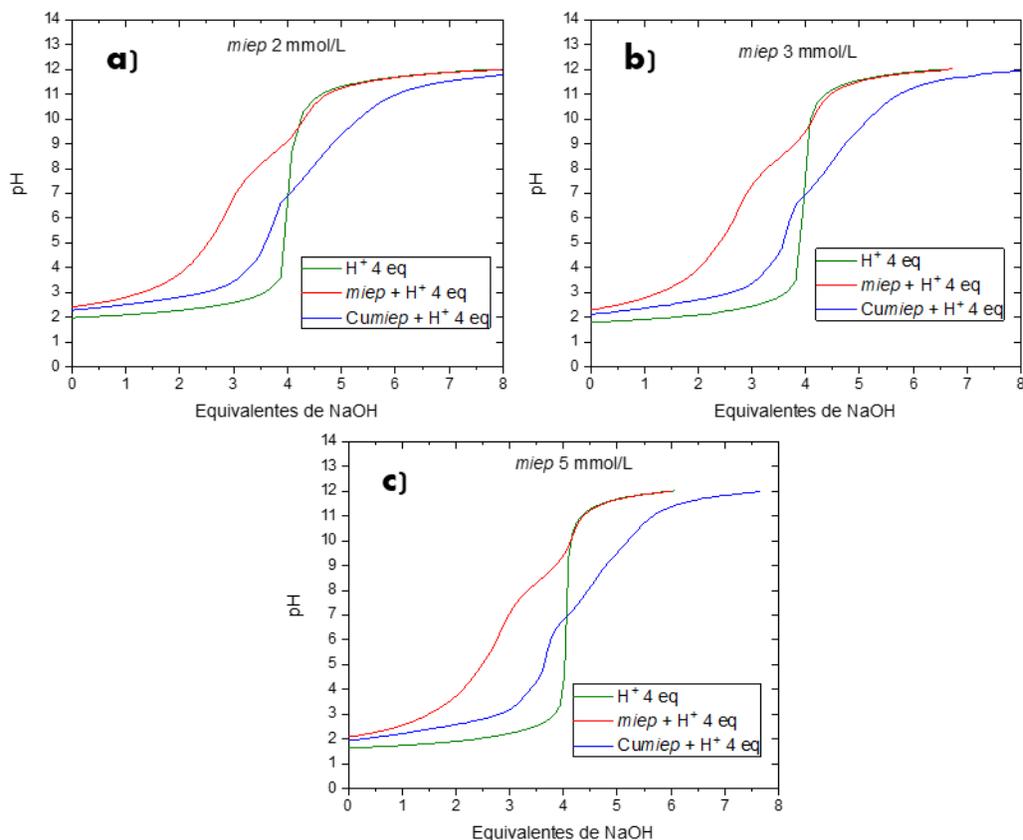


Figura 22. Gráficas de titulaciones del *Cumiep* a diferentes concentraciones. a) 2 mmol/L b) 3 mmol/L c) 5 mmol/L.

Al realizar el tratamiento de los resultados en *Hyperquad* se obtuvo que existe la formación de un complejo ácido, esto es congruente con la gráfica observada en la figura 22 en el que la curva azul (*Cumiep* + 4H⁺) no se logra empalmar con la curva verde (ácido fuerte) debido a la existencia de un H⁺ fuertemente unido al ligante.

Conforme el número de equivalentes de NaOH va aumentando, los protones contenidos en el ligante se van liberando hacia el seno de la disolución y eventualmente son neutralizados y simultáneamente el cobre va coordinándose al *miep*. Sin embargo, se logra observar que para llegar al punto de equivalencia se necesitan 3.5 eq NaOH y no 4 eq de NaOH. Una posible explicación ante este resultado es que un protón se esté compartiendo entre dos complejos [*Cumiep*], por lo que

la especie que se propone es la siguiente: $[\text{Cu}_2\text{Hmiep}_2]$, lo que explicaría el hecho de que el primer salto de la gráfica ocurra en 3.5 eq de NaOH.

Con la ayuda del programa *Hyperquad 2008*, se obtienen los valores de $\log\beta$ para el *Cumiep*, los cuales son:

Tabla 7. Valores de $\log\beta$ y de pKa para *Cumiep*

Equilibrio	pKa	$\log\beta$
$\text{Cu}^{2+} + \text{miep} \rightleftharpoons [\text{Cumiep}]^{2+}$	---	10.5 ± 0.1
$\text{Cu}^{2+} + \text{miep} + \text{OH}^- \rightleftharpoons [\text{Cumiep}(\text{OH})]^+$	---	16.3 ± 0.04
$\text{Cu}^{2+} + \text{miep} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuHmiep}]^{3+}$	---	14.4 ± 0.09
$[\text{Cumiep}]^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cumiep}(\text{OH})]^+ + \text{H}^+$	8.20	---
$[\text{CuHmiep}]^{3+} \rightleftharpoons [\text{Cumiep}]^{2+} + \text{H}^+$	3.90	---

Con estos valores se puede realizar una gráfica de distribución de especies a lo largo de la escala de pH, con ayuda de la fracción molar distributiva (ϕ_x).

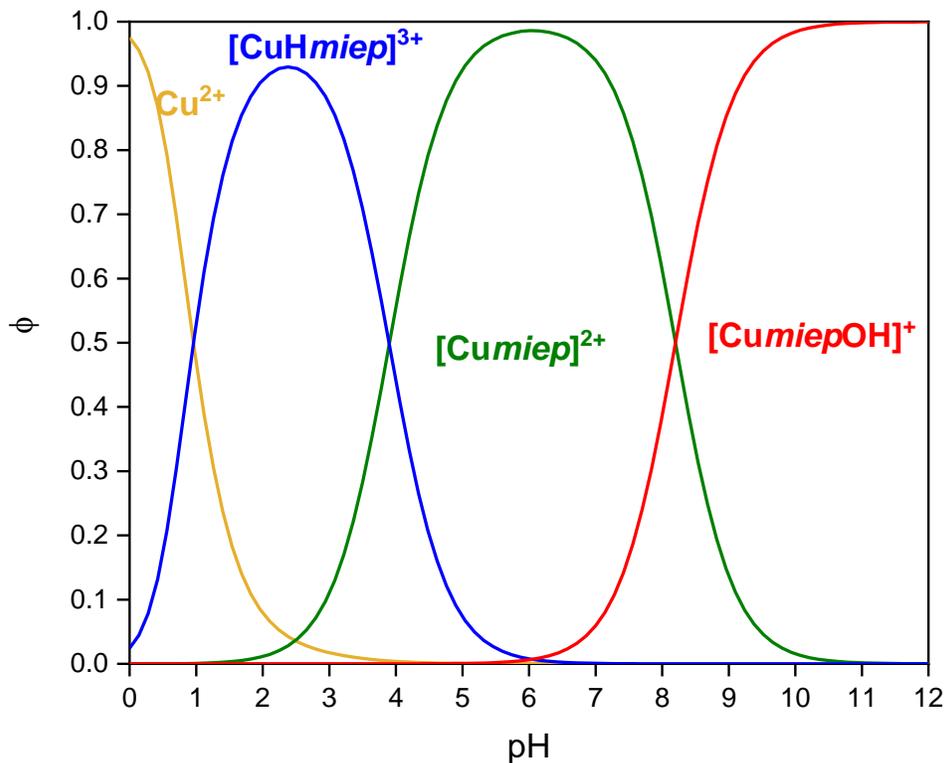


Figura 23. Diagrama de distribución de especies para *Cumiep*.

Se puede observar en la figura 23, que a pH muy bajos empieza a coordinarse el cobre al *miep*. El complejo $[\text{Cumiep}]^{2+}$ tiene una zona de predominio que va de un valor de pH de 5 a 8, antes de pH 5 se tiene una zona en la que coexisten el complejo y el complejo ácido $[\text{CuHmiep}]^{3+}$, y después de pH 8 aumenta el predominio del hidroxocomplejo $[\text{CumiepOH}]^+$.

6.2. Estudios electroquímicos de los sistemas de Cu(II)/Cu(I)

Este estudio es útil para poder determinar la reversibilidad de los sistemas estudiados. Los sistemas reversibles son aquellos en donde tanto la especie oxidada como la reducida son estables en disolución y no presentan pérdidas energéticas debido a los cambios estructurales ni por los procesos químicos colaterales, cosa que se desearía en un sistema catalítico, cuando el proceso catalítico implica un proceso redox. Estos estudios también son importantes ya que dentro del ciclo catalítico se ven envueltas las especies de cobre (II) y cobre (I); se ha sugerido que los iones de cobre (II) participan activamente en la transferencia de electrones por lo que se propone la existencia de especies intermediarias de cobre (I), lo que es importante debido a que dentro del ciclo catalítico, la especie reducida de cobre (I) sufre un proceso de reoxidación a cobre (II) con ayuda del oxígeno molecular, por lo tanto si existen especies derivadas de cobre (I) y estas no presentan una posterior oxidación, la eficiencia catalítica del catalizador será menor. Los resultados en este estudio pueden arrojar datos para poder comprender mejor el comportamiento de estos catalizadores, así mismo es posible determinar el potencial estándar para poder determinar el poder oxidante del par redox Cu(II)/Cu(I) dentro de los catalizadores. [12],[15],[16]

Tanto al oxígeno molecular (O_2), como a los complejos *Cumimp* y *Cumiep* se les realizó una caracterización electroquímica a través de la técnica de voltamperometría cíclica (CV).

Los estudios se realizaron iniciando el barrido de potencial en el potencial de circuito abierto (OCP por sus siglas en inglés), haciendo barridos tanto en sentido catódico como en sentido anódico, para la disolución que se emplea como electrolito soporte, así como a los catalizadores en presencia y ausencia de $O_2(g)$, burbujeando $N_2(g)$ para lograr esto último. Todos estos estudios se realizaron en el mismo medio que los estudios catalíticos, es decir, en una mezcla de metanol-agua (1:1) a pH fijo. La velocidad usada para los estudios fue de 0.1 V s^{-1} con una ventana de -1.2 V a 0.8 V .

Una vez obtenidos los voltamperogramas se determinan los valores de potencial de pico para los complejos, es necesario referenciarlo con respecto al par ferroceno-ferrocinio (Fc/Fc^+) que tiene un potencial de 0.145 V con respecto al par plata-cloruro de plata ($Ag^0/AgCl$).

De los estudios electroquímicos también es posible obtener los siguientes parámetros:

- (I_{lc}/I_{la}) el cociente entre las corrientes, el cual indica la reversibilidad química del sistema.
- (ΔE_p) la diferencia de los potenciales de pico, que indica la rapidez con la que se realiza la oxidación y la reducción dentro de un sistema.
- $(E_{1/2})$ el potencial de media onda.

6.2.1. Propiedades redox del medio de reacción $MeOH/H_2O_{pH=9.0}$

Este estudio se realizó haciendo barridos tanto en sentido anódico como en sentido catódico. Debido a que ambos complejos, *Cumiep* y *Cumimp*, presentan el mismo medio de reacción, estos estudios se llevaron a cabo sólo una vez para ambos complejos.

A continuación, se muestran los voltamperogramas del medio:

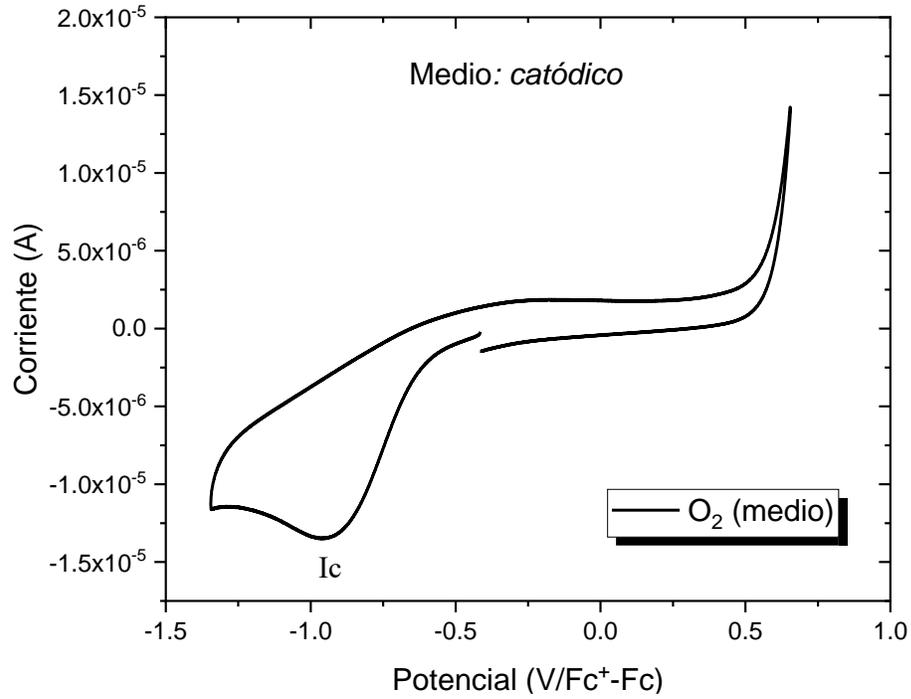


Figura 24. Voltamperograma iniciado en el potencial de circuito abierto (OCP), en sentido catódico para una disolución de electrolito soporte en presencia de O_2 .

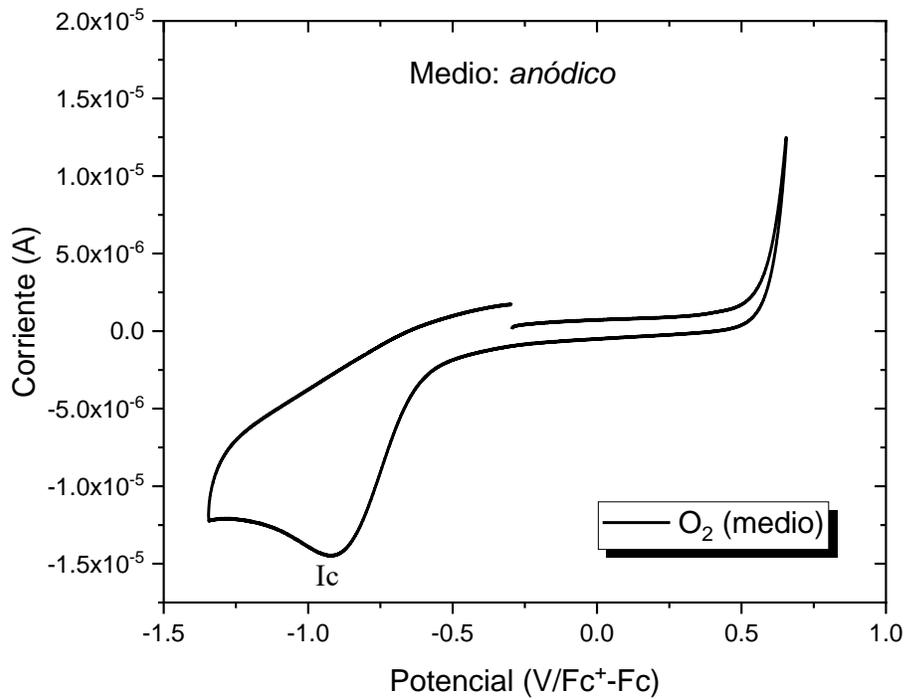
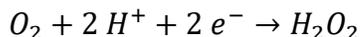


Figura 25. Voltamperograma iniciado en el potencial de circuito abierto (OCP), en sentido anódico para una disolución de electrolito soporte en presencia de O_2 .

En ambos voltamperogramas (figuras 24 y 25) se observa la existencia de una sola señal, I_c , la cual pertenece al proceso de reducción de O_2 :



Por lo que se puede concluir que el medio de reacción no tiene un comportamiento electroquímico que pueda interferir con la caracterización de los complejos de Cu (II).

6.2.2. Propiedades redox de los ligantes derivados del grupo imidazol

Los siguientes estudios realizados son los estudios electroquímicos de los ligantes: *miep* y *mimp*. Se realizaron bajo las mismas condiciones de reacción, un medio metanólico-acuoso con una proporción 1:1, medio el cual se fijó a un pH de 9 y en ausencia de oxígeno. Los voltamperogramas de los ligantes se compararon con los voltamperogramas del medio del estudio anterior, con el fin de observar la presencia de alguna señal o variación importante de la corriente que indique un comportamiento electroquímico en el ligante.

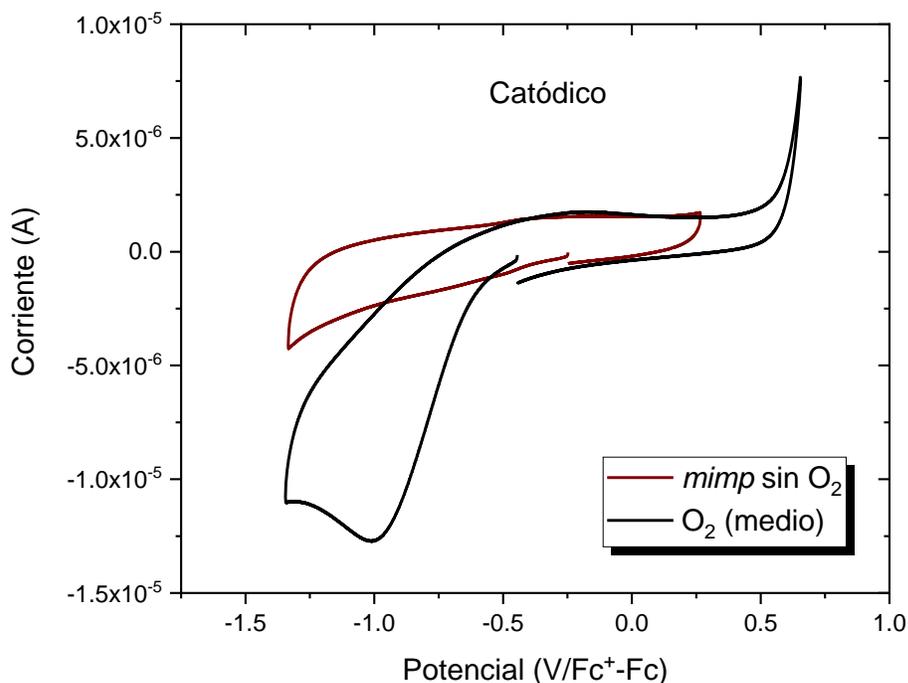


Figura 26. Voltamperograma en sentido catódico para el ligante *mimp* en ausencia de O_2 .

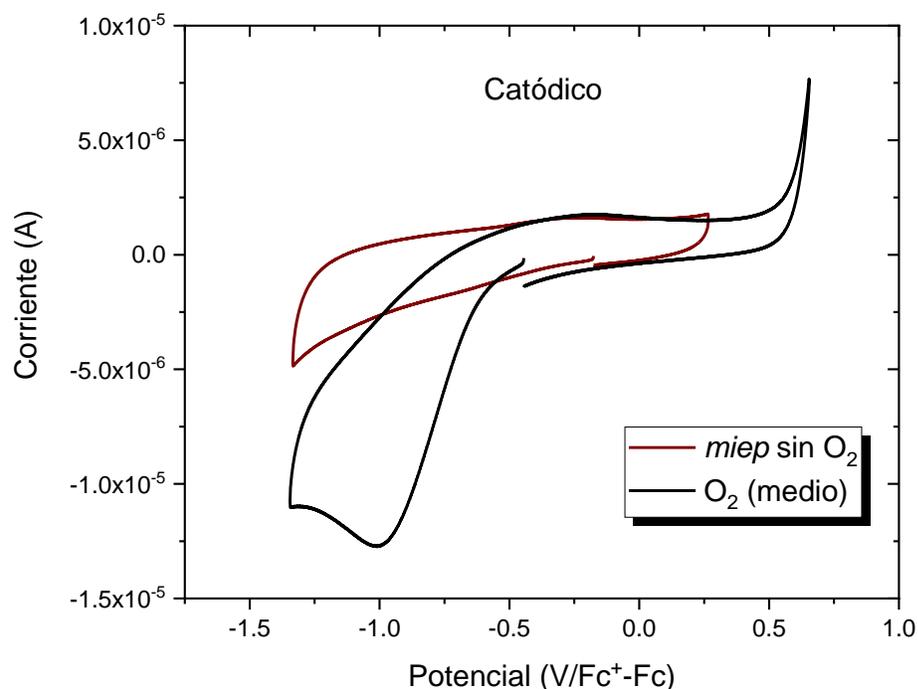


Figura 27. Voltamperograma en sentido catódico para el ligante *miep* en ausencia de O_2 .

Se observa que, en ambas figuras (26 y 27), el voltamperograma del ligante (en café) no presenta alguna señal. Por lo que se puede concluir que los ligantes, *miep* y *mimp*, son dos sistemas no electroactivos y por ende el comportamiento electroquímico del complejo dependerá exclusivamente del centro metálico.

6.2.3. Propiedades redox de la sal de Cu(II) ($CuCl_2$)

El siguiente estudio se llevó a cabo en el mismo medio ya mencionado en los anteriores estudios. Se realizó la caracterización electroquímica de la sal de cobre(II), misma que actúa como electrolito soporte y como fuente del catión Cu^{2+} , a través de un estudio de potenciales de inversión (en sentido catódico). En este estudio, el potencial de inversión en sentido catódico va aumentando barrido tras barrido, para poder definir que señal de oxidación corresponde a que señal de reducción.

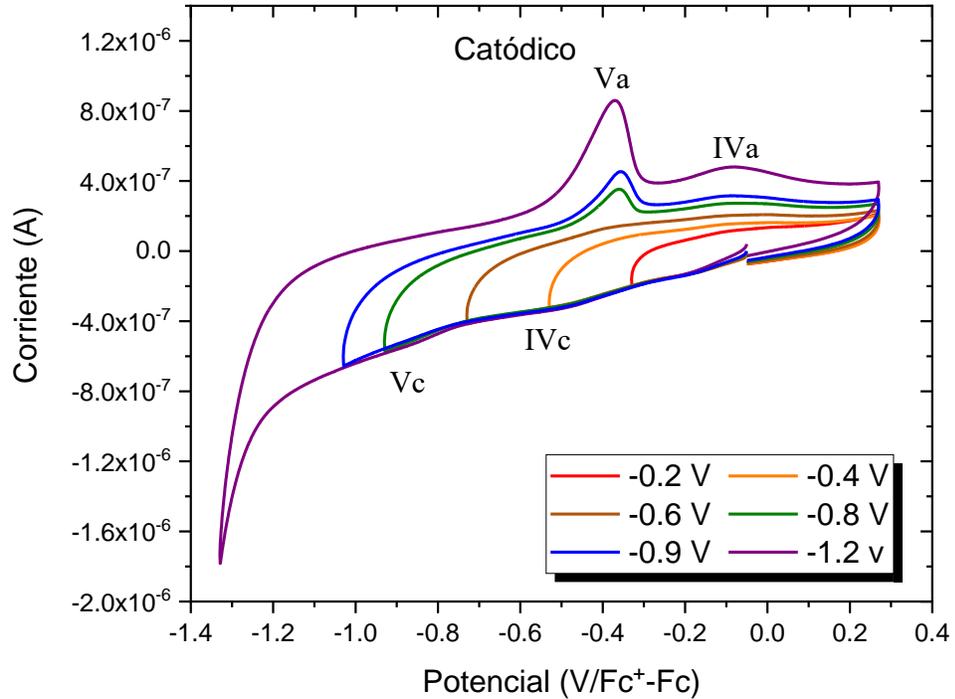


Figura 28. Potenciales de inversión de la sal de cobre (II) (CuCl_2): barrido catódico. pH =9.0

En los potenciales de inversión (figura 28) se pueden observar 4 señales, pertenecientes a dos procesos de un electrón. Las señales IVa y IVc, pertenecen al proceso de reducción y oxidación del par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, respectivamente. Por su parte, al par redox Cu^+/Cu^0 le corresponden la señal de reducción Vc y la señal de oxidación Va.

Tabla 8. Potenciales de pico para la sal de cobre (II).

Señal	Proceso	Potencial de pico (V)	$E_{1/2}$ (V)
IVc	$\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+$	-0.50	-0.30
IVa	$\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{e}^-$	-0.09	
Vc	$\text{Cu}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^0$	-0.36	-0.62
Va	$\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^+ + \text{e}^-$	-0.87	

Potenciales referenciados al par Fc/Fc^+ .

6.2.4. Propiedades redox de los complejos de Cu(II)

Para el estudio ambos complejos, *Cumiep* y *Cumimp*, se realizaron tres estudios: Los dos primeros fueron los realizados al medio de reacción, los siguientes corresponden al estudio electroquímico de los respectivos ligantes; ambos estudios realizados en un medio de reacción (MeOH/H₂O) y en presencia de O₂. Para llevar a cabo el tercer estudio, al medio de reacción se le añadió 0.5 mL (0.01 mmol/L) de complejo. Se añadió otro equivalente de ligante (*miep* o *mimp*) con la finalidad de asegurarse que el cobre esté coordinado completamente al ligante y ver sólo una señal referente a esta especie (Cu²⁺). El estudio se llevó a cabo realizando ambos sentidos: catódico y anódico, y en presencia y ausencia de O₂.

6.2.4.1. Complejo *Cumimp*

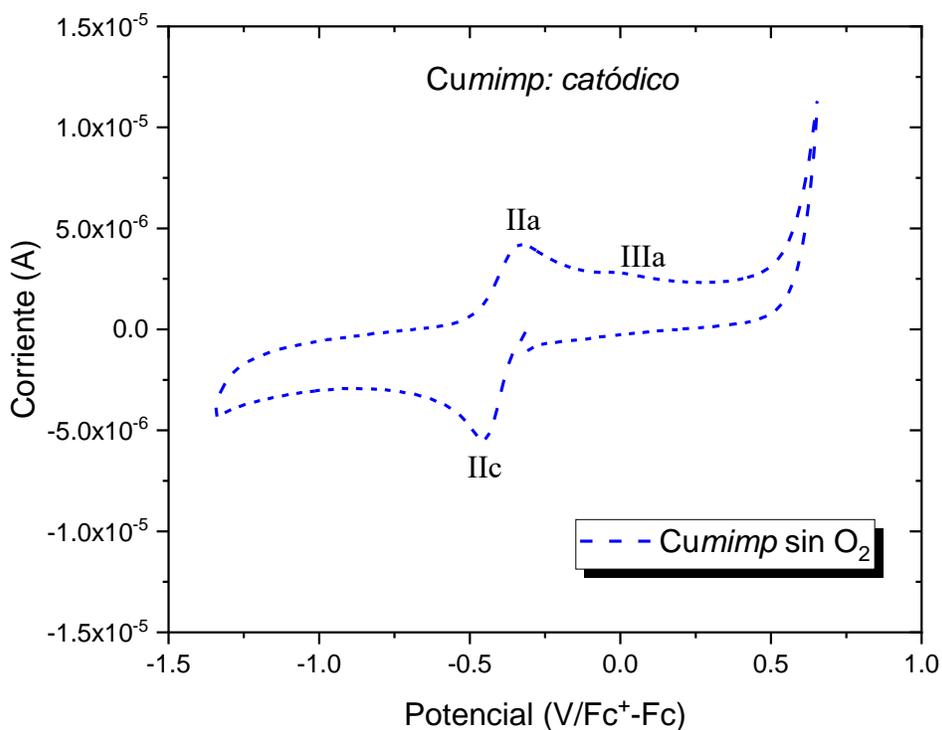


Figura 29. Voltamperograma en sentido catódico para el complejo *Cumimp* en ausencia de O₂.

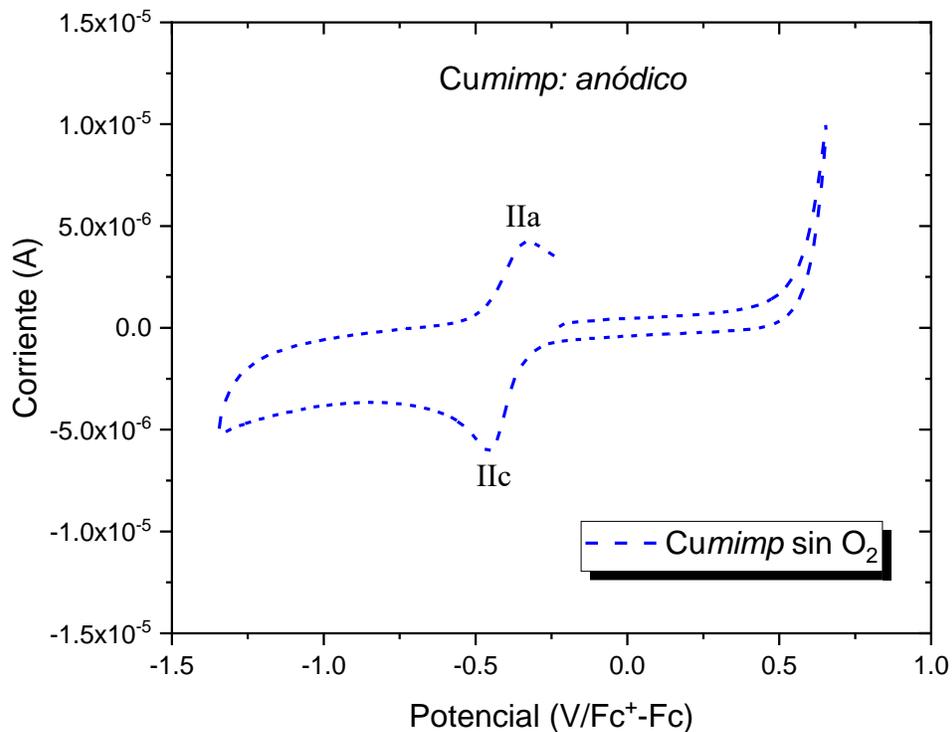


Figura 30. Voltamperograma en sentido anódico para el complejo *Cumimp* en ausencia de O_2 .

En el voltamperograma que se inicia en sentido anódico correspondiente a la disolución de *Cumimp*, figura 29, se pueden observar dos señales que se asocian al proceso de reducción (IIc) y de oxidación (IIa) del par redox Cu^{2+}/Cu^+ dentro del complejo *Cumimp*. Al comparar ambos sentidos de barrido, anódico y catódico (figura 28), se observa que en el último existe una señal de oxidación (IIIa). Esta señal sólo se puede observar en sentido catódico, por lo que pertenece a una especie formada durante el proceso de reducción.

Al comparar el voltamperograma en sentido catódico (figura 29) con el estudio de potenciales de inversión (figura 28), se observa que la señal perteneciente a la oxidación del Cu^+ a Cu^{2+} (IVa) está en un valor de -0.09 V, mientras que la señal IIIa está en un valor de potencial de 0.02 V. Por lo que no se puede atribuir esta señal a la especie de Cu(I) en ese valor de pH (9.0), $[\text{Cu(OH)}_2]^-$, sino a un complejo soluble de cobre(I) con un entorno de coordinación diferente al $\text{Cu}^{\text{I}}\text{mimp}$ (IIa).

Tabla 9. Potenciales e intensidades de pico del *Cumimp*

Señal	Potencial de pico (V)	ΔE_p (mV)	Intensidad de pico (μA)	Ic/IIa
IIa	-0.320	121	4.23	0.832
IIc	-0.441		3.52	

Potenciales referenciados al par Fc/Fc^+ .

$\text{Ic/IIa} = 0.832$; indica que del total de cobre (II) que se reduce a cobre (I) sólo el 83% logra reoxidarse.

$\Delta E_p = 121$ mV; indica que el proceso de transferencia de electrones es lento, ya que el valor es el doble del esperado para un proceso de un electrón (60 mv).

De la semisuma de los potenciales de pico se puede obtener el potencial de media onda ($E_{1/2}$):

$$-0.380 \text{ V vs (Fc/Fc}^+)$$

6.2.4.2. Complejo *Cumiep*

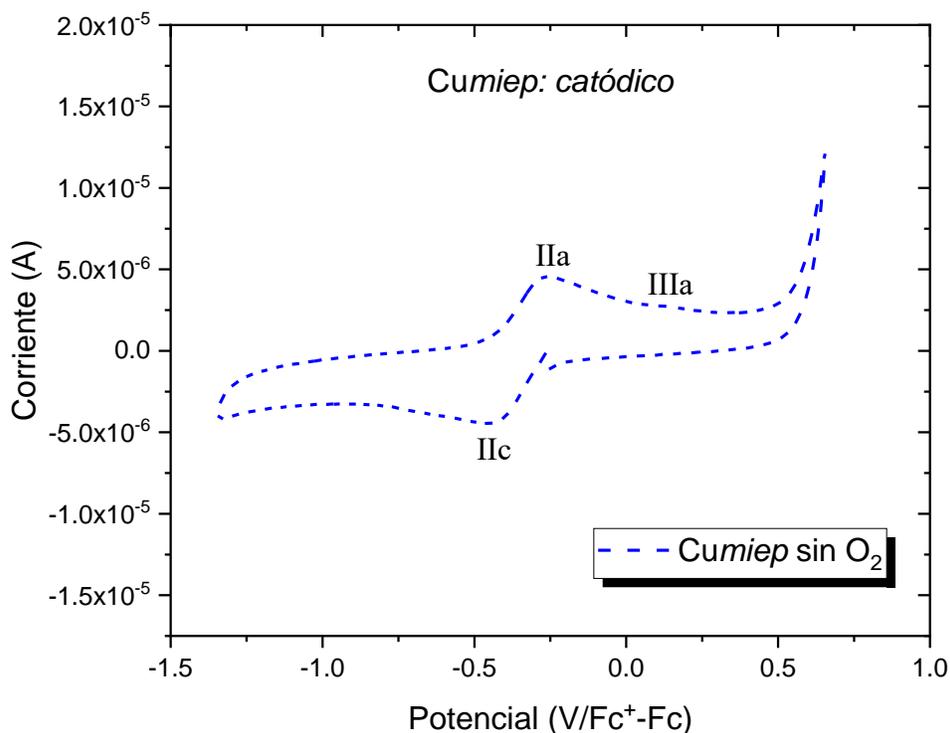


Figura 31. Voltamperograma en sentido catódico para el complejo *Cumiep* en ausencia de O₂.

En el barrido catódico (figura 31) del *Cumiep*, igual que en el caso del *Cumimp*, se observa la aparición de la señal IIIa (0.12 V), que se atribuye a una especie de Cu(I) siendo diferente del [CumiepOH]⁺ y al [Cu(OH)₂]⁻. A diferencia del *Cumimp*, en el *Cumiep* no es tan perceptible la señal IIIa, esto se debe a la mayor estabilidad del Cu(I) dentro del complejo.

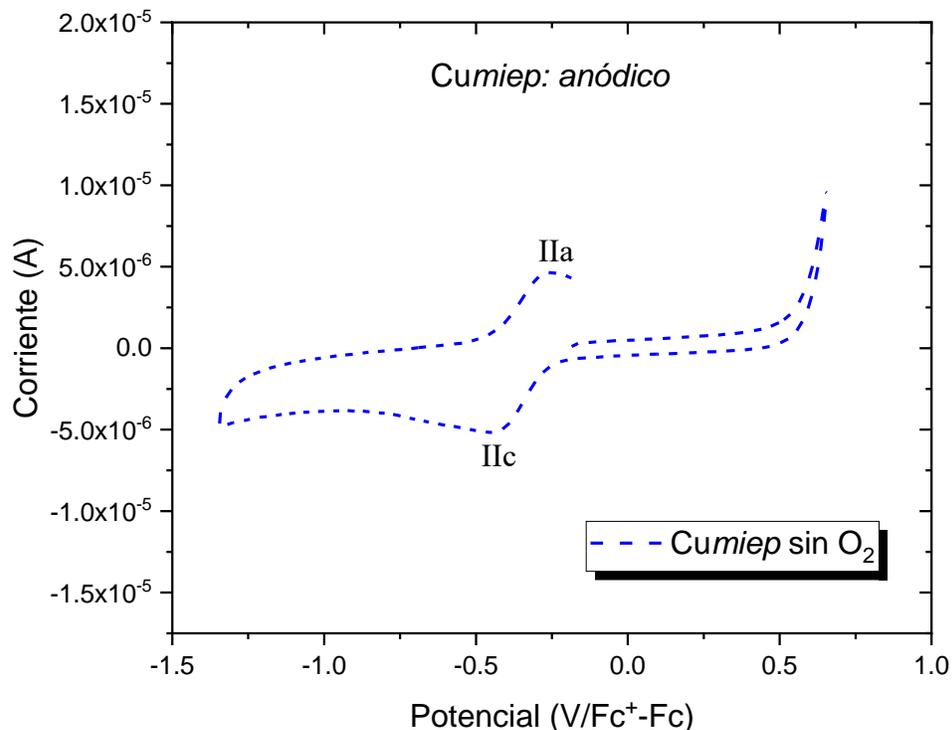


Figura 32. Voltamperograma en sentido anódico para el complejo *Cumiep* en ausencia de O_2 .

En los voltamperogramas correspondientes a la disolución de *Cumiep*, figuras 31 y 32, se observa que en ambos sentidos se puede observar dos señales que se asocian al proceso de reducción (IIc) y al de oxidación (IIa) del par redox Cu^{2+}/Cu^+ dentro del complejo *Cumiep*.

Tabla 10. Potenciales e intensidades de pico del *Cumiep*

Señal	Potencial de pico (V)	ΔE_p (mV)	Intensidad de pico (μA)	IIc/IIa
IIa	-0.272	138	3.80	0.992
IIc	-0.410		3.77	

Potenciales referenciados al par Fc/Fc^+ .

$I_{pc}/I_{pa} = 0.992$; indica que la mayor parte del cobre (II) que se reduce a cobre (I) logra volver a reoxidarse.

$\Delta E_p = 160$ mV; indica que la transferencia de dichos electrones es lenta, ya que el valor es más del doble de grande que el esperado para un proceso de un electrón (60 mV).

De la semisuma de los potenciales de pico se puede obtener el potencial de media onda ($E_{1/2}$):

$$-0.341 \text{ V vs (Fc/Fc}^+)$$

Una vez que se obtuvieron los parámetros de ambos complejos, se puede decir que el proceso de reducción y oxidación es más reversible en el *Cumiep*.

Comparando ambos potenciales de media onda, -0.380 V vs (Fc/Fc⁺) para el *Cumimp* y -0.341 V vs (Fc/Fc⁺) para el *Cumiep*, se observa que el *Cumiep* es mejor oxidante que el *Cumimp*. Dicha información es relevante para proporcionar una explicación ante los resultados derivados de los estudios cinéticos. La transferencia electrónica que ocurre en el Cu(II) en presencia del anillo quelato de 6 miembros (*Cumiep*) favorece la estabilización de la especie de Cu(I).

6.2.5. Efecto electrocatalítico

Como ya se mencionó en el apartado anterior, el último estudio consta en hacer el estudio electroquímico en ambos sentidos: catódico y anódico, en presencia y ausencia de O₂.

A continuación, a fin de comparar el efecto que tiene la presencia de O₂ en ambos catalizadores (complejos), se presentarán los voltamperogramas del primer estudio (medio de reacción) y del anterior estudio (complejos) juntos:

6.2.5.1. Complejo Cumimp

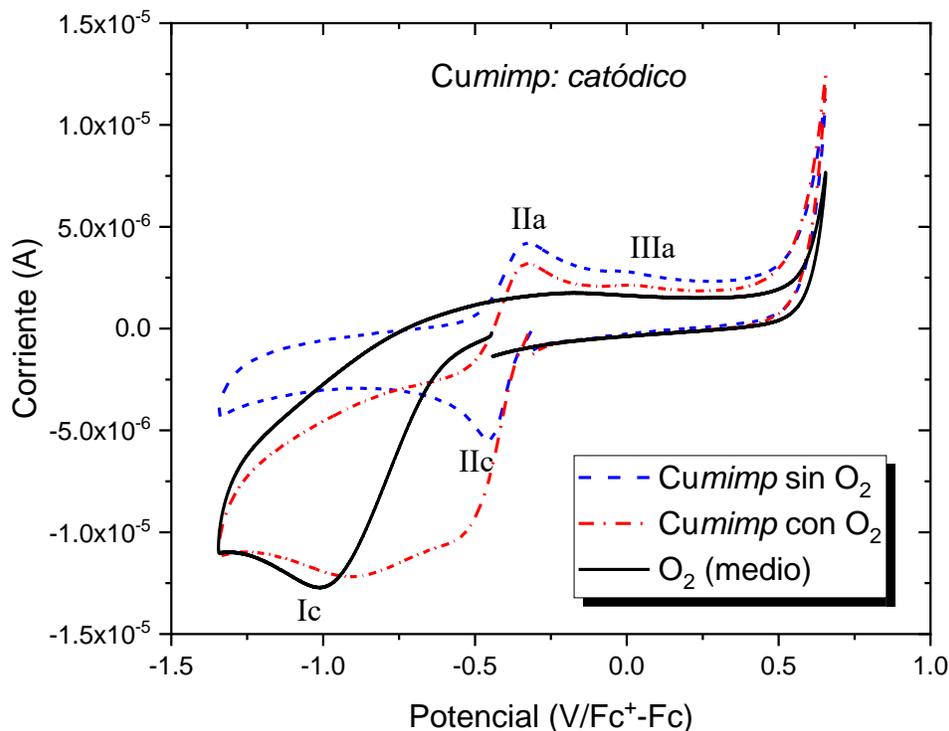
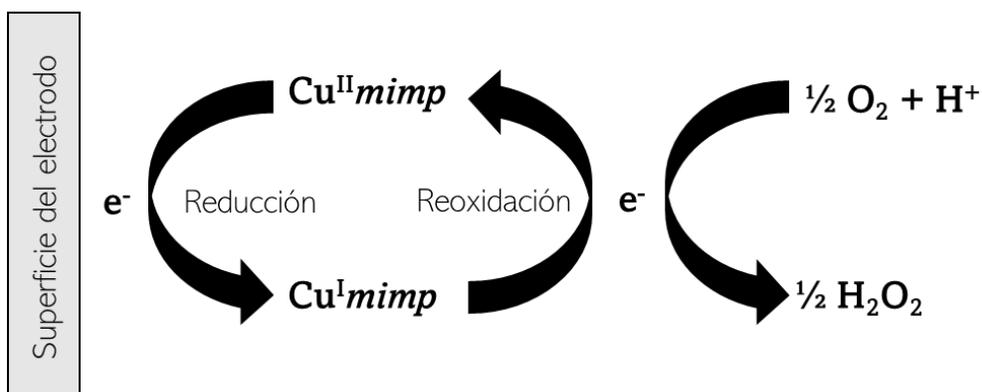


Figura 33. Voltamperogramas en sentido catódico para el medio de reacción y el complejo Cumimp, en ausencia y presencia de O₂.

Al observar el voltamperograma en presencia de O₂ (línea punteada roja) se ve que la señal de reducción (Ic) aumenta en intensidad con un valor de 0.008 mA contrastado con el valor en ausencia de O₂ de 0.004 mA, lo que sugiere que esté ocurriendo un proceso electrocatalítico, ya que en las inmediaciones del electrodo, el cobre (I) que se reduce se reoxida a cobre (II) con ayuda del oxígeno atmosférico presente en la disolución, regenerando la concentración de Cu(II) al electrodo y justificando así el aumento de la intensidad de la señal en presencia de O₂. Se observa también que la intensidad de la señal de reducción de O₂ (Ic) en presencia de complejo (línea punteada roja) es menor que en ausencia del complejo, esto se debe a que el oxígeno en la interfase se consumió en la reacción con Cu(I). Todo se resume en el esquema 5.



Esquema 5. Efecto electrocatalítico del O_2 atmosférico sobre el *Cumimp*.

6.2.5.2. Complejo *Cumiep*

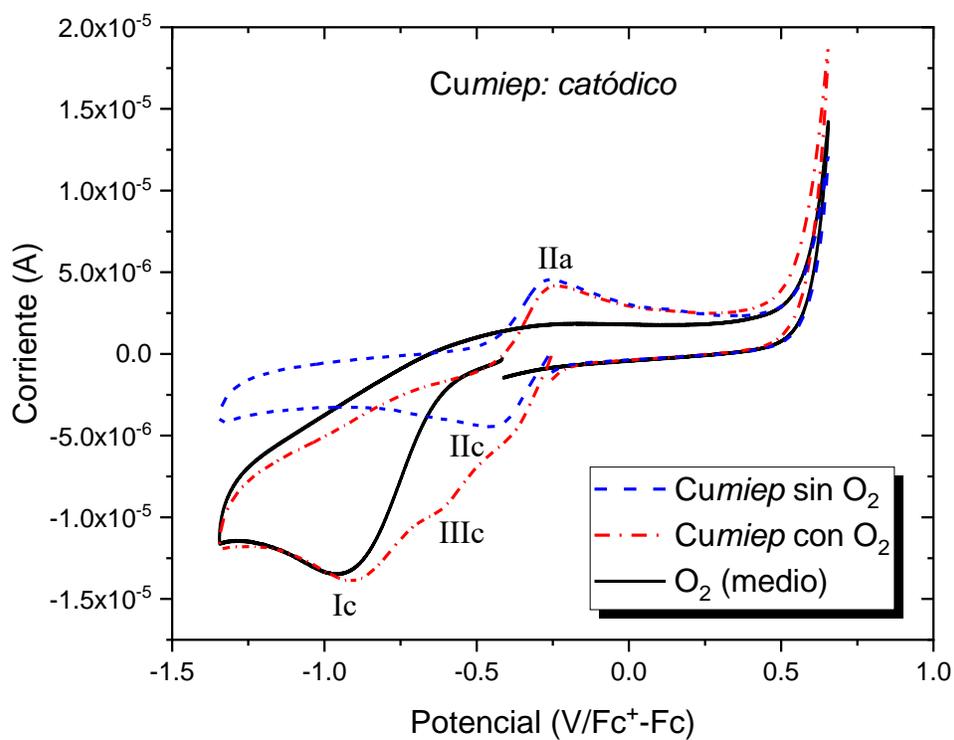


Figura 34. Voltamperogramas en sentido catódico para el medio de reacción y el complejo *Cumiep*, en ausencia y presencia de O_2 .

Se puede observar en la figura 34 que la señal I_{lc} presente un aumento en presencia de oxígeno (línea roja punteada), pero al comparar el efecto electrocatalítico en ambos complejos se puede notar que el efecto electrocatalítico del oxígeno en el *Cumiep* es mucho menor que en el *Cumimp*. Así mismo, se observa que en presencia de oxígeno aparece una nueva señal de reducción (III_c), se sabe que es una señal correspondiente a un proceso irreversible, ya que no cuenta con el proceso inverso de la oxidación. Se atribuye esta señal a la reducción del cobre en el intermediario $[Cu^{II}miep(O_2^{\cdot-})]^+$, este intermediario se forma por el proceso de transferencia de un solo electrón entre el $Cu^I miep$ y el oxígeno atmosférico (O_2), donde el $Cu(I)$ se oxida a $Cu(II)$ y el oxígeno se reduce a ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

6.3. Estudios cinéticos

Con el fin de evaluar la actividad catalítica de los complejos de cobre, *Cumiep* y *Cumimp*, se utiliza la reacción modelo de la catecol oxidasa, que consiste en la oxidación del 3-5-DTBC a 3-5-DTBQ (esquema 2) en el medio MeOH/H₂O. Esta reacción se sigue a través de espectrofotometría de UV-vis a una longitud de onda (λ) de 407 nm, siendo la 3,5-DTBQ la especie que absorbe a dicha longitud de onda.

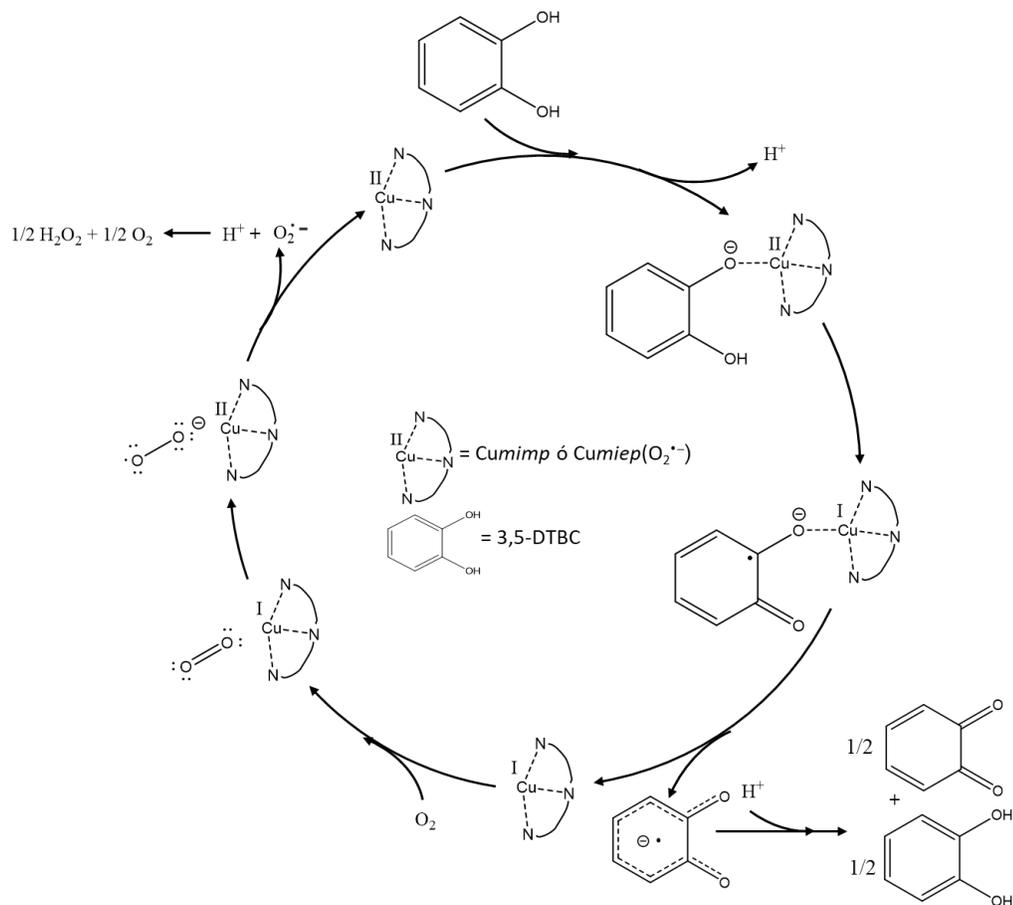


Figura 35. Ciclo catalítico general para complejos mononucleares de cobre (CuL).

Para poder llevar a cabo de una manera más efectiva la reacción de la catecol oxidasa, es necesario evaluar las condiciones en las cuales dicha reacción es más eficiente, como los son el pH del medio, y las concentraciones tanto del catalizador como del sustrato.

Se obtuvieron los distintos parámetros cinéticos: la constante de Michaelis (K_M), la constante del catalizador (k_{cat}) y la eficiencia del catalizador (k_{cat}/K_M) de los catalizadores.

6.3.1. Variación del pH

Este estudio sirve para determinar a qué pH el catalizador tiene una mayor actividad catalítica en comparación con la oxidación del fenol realizada en presencia del medio únicamente, ya que se ha observado que el pH del medio cambia la esfera de coordinación del cobre y por lo tanto sus propiedades reactivas. [33],[34]

El control de pH se hizo mezclando a volúmenes iguales de metanol y de una disolución acuosa de buffer al pH deseado (ver parte experimental). Una vez que se identificó el pH, se puede correlacionar con el diagrama de variación de especies y así se propone nuestra especie activa, que en ambos catalizadores es el hidroxocomplejo, $[\text{CumimpOH}]^+$ y $[\text{CumiepOH}]^+$.

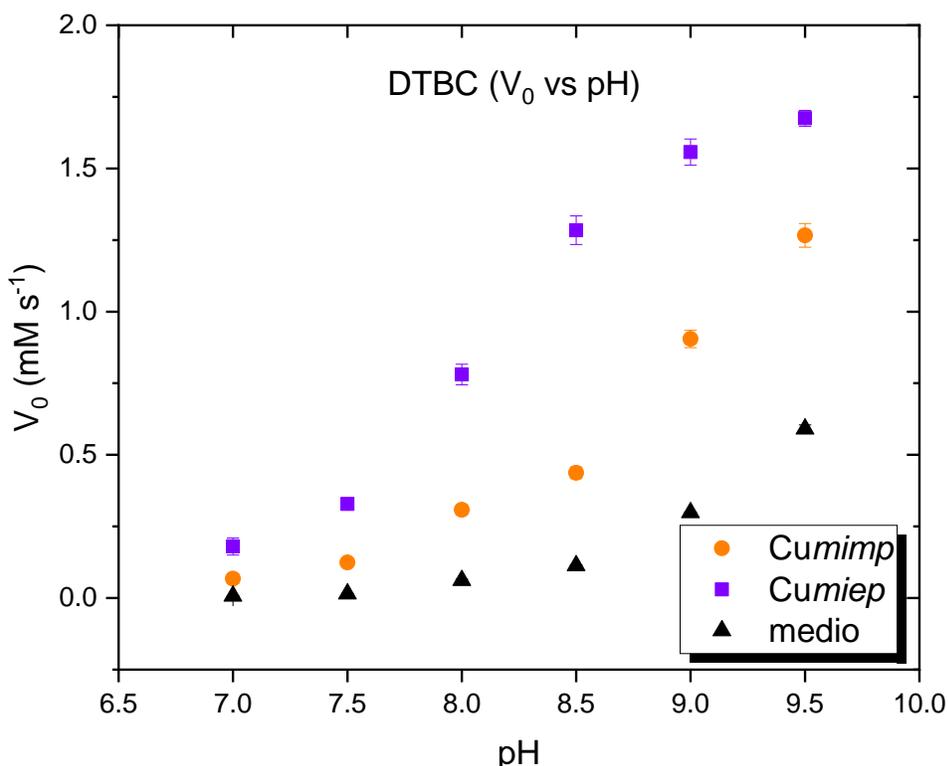


Figura 36. Actividad catecolasa: variación de la velocidad inicial (v_0) en función del pH, con efecto del medio, en una disolución MeOH/H₂O_{pH = 9.0} (1:1).

Se observa, en la figura 36, una dependencia de la velocidad inicial con el pH. También se puede ver que en ausencia de catalizador el propio pH del medio afecta a la velocidad inicial, en este caso la velocidad inicial empieza a aumentar a partir de un valor de pH de 8.5.

Por otro lado, en presencia de los catalizadores al medio de reacción se observa que las velocidades iniciales aumentan significativamente, sobre todo en el caso del *Cumiep*. Para ambos catalizadores, se observa que el pH en el que comienza a afectar de manera significativa el pH, es a partir de un valor de pH de 7.0 a 8.0 debido a la presencia apreciable del hidroxocomplejo.

Una vez conociendo a nivel general la dependencia de la velocidad con respecto al pH en presencia y en ausencia de catalizadores, se realiza una gráfica donde se reste a cada catalizador el efecto del medio en la velocidad inicial, para poder ver de una manera más fácil el efecto que tiene el catalizador cuando se varía el pH. De esta forma se obtiene la siguiente gráfica:

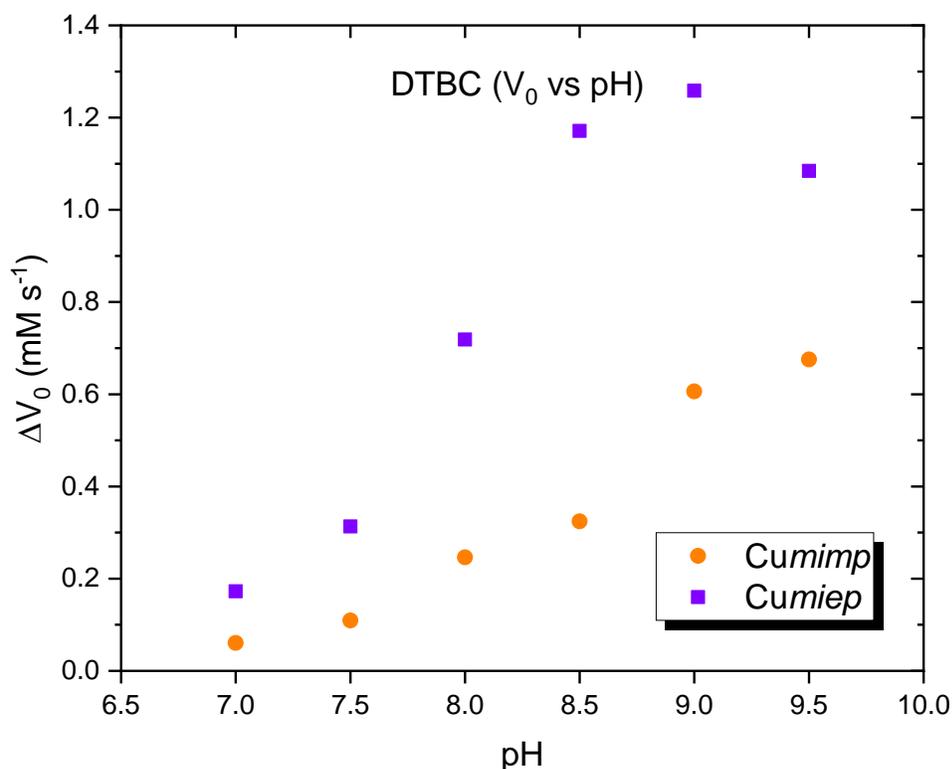


Figura 37. Actividad catecolasa: variación de la velocidad inicial (v_0) en función del pH, sin el efecto del medio, en una disolución MeOH/H₂O_{pH = 9.0} (1:1).

Se observa, en la figura 37, que en el caso del *Cumimp* la mayor actividad se da alrededor de pH 9.0 y 9.5, mientras que para el *Cumiep* en un valor de 9.0 se da un máximo de la velocidad inicial, ya que después de este valor empieza a descender.

Al comparar ambas gráficas (figura 36 y 37) se puede observar que al aumentar el pH la aportación del medio en el valor de la velocidad inicial se va haciendo cada vez más importante (figura 35, ▲).

El pH que se eligió para realizar los siguientes estudios es pH 9.0. Debido a que en este pH el *Cumiep* alcanza un máximo y en el caso del *Cumimp* tiene un valor similar que en pH 9.5. En este pH (9.0) predomina en ambos casos el hidroxocomplejo, [CumimpOH]⁺ y [CumiepOH]⁺ con un porcentaje del 68% y del 85% respectivamente.

6.3.2. Variación de la concentración del catalizador CuL

El modelo de Michaelis-Menten se basa en que el comportamiento del catalizador es de primero orden, por lo que es importante verificar esto, porque de lo contrario no se podrían tratar los resultados de la variación del 3,5-DTBC con un modelo de Michaelis-Menten.

El estudio se realizó bajo la metodología estandarizada (25°C, MeOH:H₂O 1:1) y con una concentración de sustrato ([DTBC]) de 2 mmol/L. Para ambos complejos el pH al que se fijó el medio fue de 9.0, determinado gracias al estudio anterior.

En la siguiente gráfica se muestran los resultados de la variación de la velocidad inicial (v_0) en función de la concentración del catalizador (CuL):

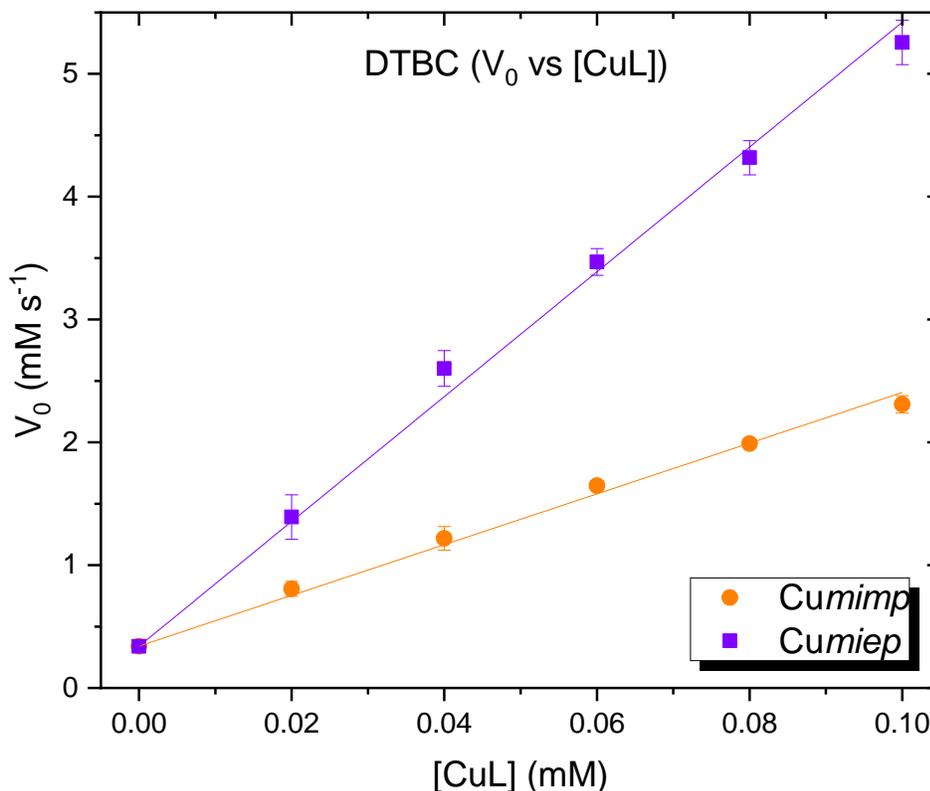


Figura 38. Actividad catecolasa: variación de la velocidad inicial (v_0) en función de la concentración de catalizador ([CuL]), en una disolución MeOH/H₂O_{pH = 9.0} (1:1).

Se encontró que existe una relación lineal entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración de ambos catalizadores $[CuL]$ dentro del intervalo de estudio. Por lo que la reacción es de primer orden con respecto a los complejos de cobre, la ecuación cinética que explica este comportamiento es la siguiente:

$$v_0 = k_{obs}[caf]$$

Donde k_{obs} es la constante de primer orden observada y $[caf]$ la concentración de los catalizadores.

A continuación, se muestran los valores de k_{obs} de los catalizadores dados por la pendiente de la recta, donde se observa que el catalizador con el ligante *miep* tiene una mayor actividad catalítica que el catalizador con el ligante *mimp*.

Tabla 11. Valores de las constantes de primer orden.

Catalizador	$k_{obs}(s^{-1})$	R^2
<i>Cumimp</i>	0.0207	0.999
<i>Cumiep</i>	0.0508	0.998

De acuerdo con los resultados, se confirma que los catalizadores tienen un comportamiento lineal frente a la variación de la concentración inicial del catalizador, ya que el coeficiente de correlación (R^2) es mayor que 0.99. Dicho esto, el modelo de Michaelis-Menten es válido para emplearse en este estudio.

Al comparar la k_{obs} de ambos catalizadores, se observa preliminarmente que el *Cumiep* tiene un valor más alto que la k_{obs} del *Cumimp*, lo que indica que el cambio en la velocidad inicial al variar la concentración inicial de catalizador es más grande en el primer catalizador y haciendo que por ende la oxidación del sustrato sea más rápida en este caso.

6.3.3. Variación de la concentración inicial de 3,5-DTBC

Una vez determinado el orden de reacción con respecto a los catalizadores, se puede evaluar el efecto que tiene la variación de la concentración del sustrato (3,5-DTBC). Este estudio es el que permite obtener los parámetros cinéticos que se necesitan para evaluar y comparar la actividad catalítica de los catalizadores, *Cumimp* y *Cumiep*.

El estudio se realizó nuevamente bajo la metodología estandarizada (25°C, MeOH:H₂O 1:1). Para ambos complejos el pH al que se fijó el medio fue de 9.0.

En la siguiente gráfica se muestran los resultados de la variación de la velocidad inicial (v_0) en función de la concentración de sustrato (DTBC); así mismo ambas presentan su ajuste hiperbólico:

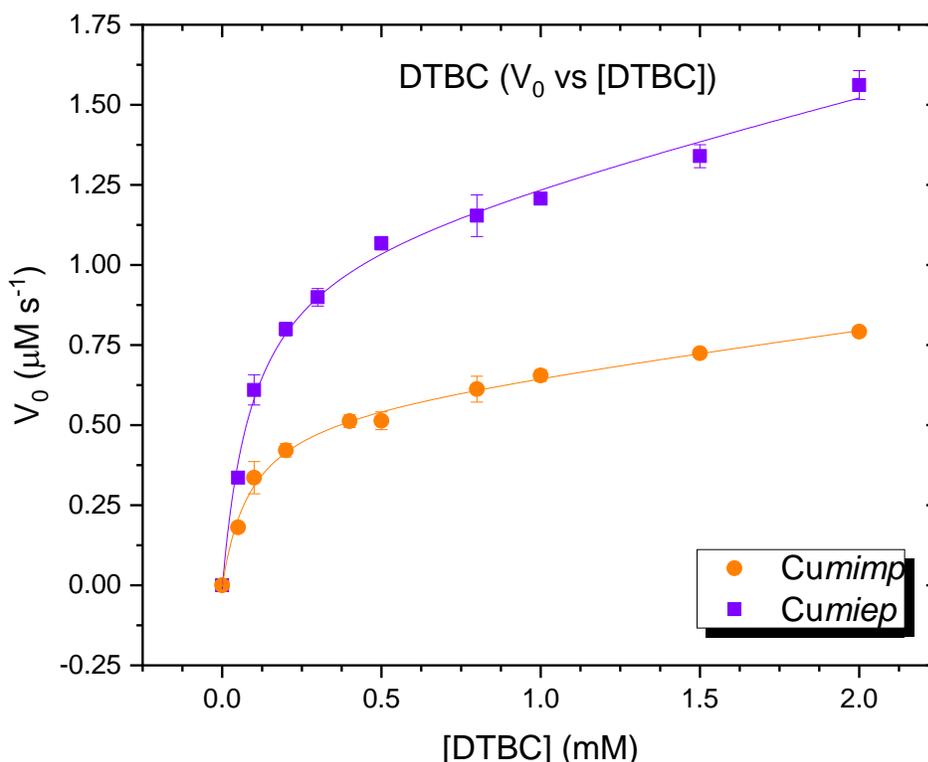


Figura 39. Actividad catecolasa: variación de la velocidad inicial (v_0) en función de la concentración de sustrato ([DTBC]), en una disolución MeOH/H₂O_{pH = 9.0} (1:1).

En la figura 39 se observa que, en el intervalo de concentraciones empleado, ambos catalizadores siguen un comportamiento parecido al modelo de Michaelis-Menten. Es posible apreciar que en la curva que corresponde al *Cumimp* (curva naranja) a concentraciones de sustrato pequeñas la curva se comporta como una hipérbola, pero conforme la concentración va aumentando el comportamiento pasa a ser el de una recta. Del mismo modo en la curva correspondiente al *Cumiep* (curva morada) se observa el mismo comportamiento, en donde a concentraciones bajas la función es una hipérbola y a concentraciones altas se comporta como una recta, en este caso se observa una pendiente más pronunciada que en el anterior.

A concentraciones bajas los catalizadores siguen un comportamiento tipo Michaelis-menten, pero conforme aumenta la concentración de sustrato la relación con la velocidad empieza a ser proporcional, por lo que es posible establecer que los catalizadores siguen un comportamiento hipérbola+recta:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_m} + m[S]$$

Tabla 12. Parámetros cinéticos de los catalizadores *Cumiep* y *Cumimp*.

Catalizador	$K_M(\text{molL}^{-1})$	$v_{m\acute{a}x}(\text{Ms}^{-1})$	$k_{cat}(\text{s}^{-1})$	K_{cat}/K_M	$m(\text{s}^{-1})$
<i>Cumiep</i>	8.74×10^{-5}	1.06×10^{-6}	0.053	606	243
<i>Cumimp</i>	9.46×10^{-5}	0.59×10^{-6}	0.029	312	129

La discusión de los parámetros cinéticos se puede hacer en términos de: la afinidad del catalizador por el sustrato (K_M), la transformación del sustrato a producto (k_{cat}), la velocidad de la reacción ($v_{m\acute{a}x}$) y el cociente (k_{cat}/K_M).

Se observa que la K_M del *Cumiep* es menor a la del *Cumimp*, lo que se traduce en que el complejo catalizador-sustrato es más estable o que el *Cumiep* tiene una mayor afinidad por el sustrato (3,5-DTBC) que el *Cumimp*.

Comparando la k_{cat} , se puede observar que el *Cumiep* tiene una mayor k_{cat} que el *Cumimp*, lo cual puede interpretarse como que el *Cumiep* es más rápido, en la reacción de oxidación del sustrato, de 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ.

Esto puede explicarse con los resultados de los estudios electroquímicos descritos anteriormente en el que una cadena alifática más larga, en el caso del *Cumiep*, facilita la transferencia electrónica del Cu(II) a Cu(I). A nivel estructural, una cadena alifática más larga le proporciona flexibilidad al anillo quelato y por ende el cambio geométrico de Cu (II) a Cu(I) es más favorable, aunado a que esta flexibilidad también proporciona una mayor reversibilidad al sistema de *Cumiep*, lo que resulta ser importante a la hora de la regeneración del complejo de Cu (II) en el ciclo catalítico.

El último parámetro por comparar es el cociente (k_{cat}/K_M). El *Cumiep* posee un cociente más alto que el *Cumimp* debido a que tiene una k_{cat} más grande y una menor K_M , lo que se traduce en que su afinidad por el sustrato es mayor y en que completa más rápido el ciclo catalítico de la oxidación de 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ.

Se compararon los parámetros obtenidos de los catalizadores con los ya reportados en la literatura, y se observó que el *Cumiep* y el *Cumimp* se encuentran dentro de los primeros diez catalizadores con mejor desempeño en lo que respecta a la actividad catecolasa. [35]

Si se comparan los valores de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de los complejos dinucleares (tabla 2) contra los valores de sus análogos mononucleares (tabla 12), se observa que dos equivalentes del complejo mononuclear *Cumimp* presentan una mayor eficiencia catalítica que un equivalente del complejo dinuclear *Cu₂dimp*; mientras que el *Cumiep* y *Cu₂diep* presentan una eficiencia catalítica similar. Esto contrasta con la hipótesis de que la dinuclearidad en los complejos de cobre ayudaba a la obtención de una mejor eficiencia catalítica.

7. Conclusiones

De los estudios potenciométricos se sabe que:

- El complejo que contiene únicamente anillos quelato de 5 miembros (*Cumimp*) es más estable que el complejo que contiene un anillo quelato de 6 miembros (*Cumiep*).
- A pH superiores a 8.5 (*Cumimp*) y 8.0 (*Cumiep*) existe la formación de los hidroxocomplejos que son relevantes para su actividad catecolasa.

De los estudios electroquímicos:

- La transferencia electrónica es más favorable y reversible para el complejo que contiene un anillo quelato de 6 miembros, *Cumiep*.
- El proceso electrocatalítico es más favorable para el complejo que contiene únicamente anillos quelato de 5 miembros, *Cumimp*.

De los estudios cinéticos:

- Los complejos *Cumiep* y *Cumimp* presentan actividad catecolasa importante a pH 9.0.
- El complejo que contiene un anillo quelato de 6 miembros (*Cumiep*) posee una mayor actividad catalítica que el que contiene únicamente anillos quelato de 5 miembros (*Cumimp*).
- Aquel ligante que tiene un poder oxidante mayor, *Cumiep*, es también aquel que tiene una mejor eficiencia catalítica.
- Con respecto a una de las hipótesis iniciales relacionada con el efecto de la nuclearidad, los resultados no fueron los esperados, ya que, en este trabajo, los complejos (*Cumimp*) y (*Cumiep*) resultaron con mejor actividad que sus análogos dinucleares (*Cu₂dimp*) y (*Cu₂diep*).

8. Parte experimental

8.1. Síntesis

Para la síntesis de los ligantes se tomó como referencia la tesis de Jorge Rubalcaba (2020), con unas ligeras modificaciones.

Por efectos de la pandemia, para la síntesis de los ligantes el tiempo estipulado era de 24 horas, pero en algunas ocasiones se dejó reaccionar hasta 5 días.

8.1.1. Síntesis del ligante *miep*

Se disuelven 4.40 g (40 mmol) de 2-etil-4-metilimidazol en 30 mL de MeOH. Posteriormente se agregan 5.7 mL (40 mmol) de 2-[(metilamino)etil]piridina, 6 mL (60 mmol) de formaldehído y 2 mL (14 mmol) de trietilamina. Una vez que se tiene la mezcla de reacción se pone a calentar en un baño de aceite a 60°C. Durante los primeros instantes la disolución se torna de color amarillo-naranja. La mezcla se deja reaccionar durante 24 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtra a través de cromatografía en columna, usando una mezcla de disolventes MeOH/CHCl₃ (1:9). Una vez filtrada la mezcla se obtiene un aceite de color marrón.

8.1.2. Síntesis del ligante *mimp*

Se disuelven 1.10 g (10 mmol) de 2-etil-4-metilimidazol en 30 mL de MeOH. Posteriormente se agregan 1.5 mL (10 mmol) de 2-[(metilamino)metil]piridina, 1.21 mL (15 mmol) de formaldehído y 2 mL (14 mmol) de trietilamina. Una vez que se tiene la mezcla de reacción se pone a calentar en un baño de aceite a 60 °C. Durante los primeros instantes la disolución se torna de color amarillo-naranja. La mezcla se deja reaccionar durante 24 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtra a través de cromatografía en columna, usando una mezcla de disolventes MeOH/CHCl₃ (1:1). Una vez filtrada la mezcla se obtiene un aceite de color marrón.

8.1.3. Síntesis del complejo [Cumimp]

Para los estudios en disolución y los estudios cinéticos, el complejo *Cumiep* se prepara in situ agregando 1 equivalente de *miep* y 1 equivalente de cobre (II).

En el caso de los estudios electroquímicos el ligante se preparó antes del estudio en sí, pero bajo el mismo principio de agregar un equivalente de *miep* y 1 equivalente de cobre (II).

8.1.4. Síntesis del complejo [Cumiep]

Para los estudios en disolución y los estudios cinéticos, el complejo *Cumimp* se prepara in situ agregando 1 equivalente de *miep* y 1 equivalente de cobre (II).

En el caso de los estudios electroquímicos el ligante se preparó antes del estudio en sí, pero bajo el mismo principio de agregar un equivalente de *mimp* y 1 equivalente de cobre (II).

8.2. Estudios en disolución

Para los estudios en disolución se utilizaron cloruros como contraión. Esto debido a la naturaleza del estándar de cobre utilizado, 1000 mg de Cu en 0.1 L (CuCl_2 en H_2O).

La superficie del electrodo se activó sumergiéndolo alternadamente en una disolución de NaOH 0.1 mol/L y HNO_3 0.1 mol/L; durante tres minutos en cada disolución y con agitación constante.

Antes de iniciar cada experimento, el potenciómetro fue calibrado con la ayuda de unos amortiguadores de pH 7, pH 4 y pH 10.

8.2.1. Valoraciones

8.2.1.1. Valoración NaOH

Se prepara una disolución de biftalato de potasio 0.02 mol/L. Para esto se pesan aproximadamente 0.4084 g de biftalato de potasio, los cuales se aforan a 100 mL con una disolución 0.1 mol/L de KNO_3 . Posteriormente, por triplicado, se toma una alícuota de 25 mL, la cual se valora con la disolución de NaOH (0.101 mol/L) que se encuentra en el titulador. La valoración se lleva a cabo bajo agitación constante y a 25 °C.

8.2.1.2. Valoración HCl

Se prepara una disolución de HCl 0.2 mol/L a partir de una disolución del mismo ácido a 1 mol/L. Para esto de la disolución de partida se toma una alícuota de 100 mL y se afora a 500 mL con una disolución de KCl 0.1 mol/L.

Como siguiente paso, se prepara una disolución de HCl 0.01 mol/L. Para esto se toma una alícuota de 5 mL de la disolución de HCl 0.2 mol/L y se afora a 100 mL con la misma disolución de KCl previamente utilizada. Por último, y por triplicado, se toma una alícuota de 25 mL de esta última disolución y se valora con la disolución de NaOH (0.101 mol/L) que se encuentra en el titulador. La valoración se lleva a cabo bajo agitación constante y a 25 °C.

8.2.2. Titulaciones

8.2.2.1. Titulación HCl

A partir de la disolución de HCl 0.2 mol/L, se toman 3 alícuotas de 4 mL, 6 mL y 10 mL, las cuales se aforan en matraces de 100 mL con una disolución de KCl 0.1 mol/L. Cada disolución se titula por triplicado con NaOH (0.101 mol/L) tomando una alícuota de 25 mL. La valoración se lleva a cabo bajo agitación constante y a 25 °C.

8.2.2.2. Titulaciones *miep* y *Cumiep*

Para la titulación del ligante y del complejo, *miep* y *Cumiep* se preparan tres disoluciones de *miep* 2 mmol/L, 3 mmol/L y 5 mmol/L. Para esto se pesan 0.0588 g, 0.0882 g y 0.1470 g los cuales se disuelve en la menor cantidad posible de MeOH, una vez disueltos se vierten en tres matraces, a estos se les añade 4 equivalentes de HCl 0.182 mol/L, finalmente se aforan a 100 mL con una disolución de KCl 0.1 mol/L.

Para la titulación del *miep*, por duplicado se toma una alícuota de 25 mL de cada disolución y se titula con la disolución de NaOH (0.101 mol/L).

Mientras que para la titulación del *Cumiep*, por cada disolución se toma una alícuota de 25 mL y se añade 1 equivalente de estándar de cobre, para posteriormente proceder a la titulación con NaOH (0.101 mol/L).

Todas las titulaciones se llevan a cabo bajo agitación constante y a 25 °C.

8.2.2.3. Titulaciones *mimp* y *Cumimp*

Para la titulación del ligante y del complejo, *mimp* y *Cumimp* se preparan tres disoluciones de *mimp* 2 mmol/L, 3 mmol/L y 5 mmol/L. Para esto se pesan 0.0560 g, 0.0840 g y 0.1400 g los cuales se disuelve en la menor cantidad posible de MeOH, una vez disueltos se vierten en tres matraces, a estos se les añade 4 equivalentes de HCl 0.182 mol/L, finalmente se aforan a 100 mL con una disolución de KCl 0.1 mol/L.

Para la titulación del *mimp*, por duplicado se toma una alícuota de 25 mL de cada disolución y se titula con la disolución de NaOH (0.101 mol/L).

Mientras que para la titulación del *Cumimp*, por cada disolución se toma una alícuota de 25 mL y se añade 1 equivalente de estándar de cobre, para posteriormente proceder a la titulación con NaOH (0.101 mol/L).

Todas las titulaciones se llevan a cabo bajo agitación constante y a 25°C.

8.3. Electroquímica

Todos los estudios electroquímicos de voltamperometría cíclica se hicieron utilizando una celda de tres electrodos. Esta celda consta de:

- Electrodo de trabajo: carbón vítreo
- Electrodo de referencia: Ag°/AgCl(KCl sat.)
- Electrodo auxiliar: Pt°

Para estos experimentos se preparó una disolución amortiguadora de pH 9.0 con una concentración de CHES de 0.3 mol/L. Así mismo se prepararon dos disoluciones de los dos catalizadores estudiados en el presente trabajo, *Cumiep* y *Cumimp*, con una concentración de 0.01 mol/L. Antes de realizar cada estudio se realizó la compensación de la caída óhmica ajustándola al 10%.

8.3.1. Medio

Para poder realizar los estudios electroquímicos de los catalizadores, es necesario hacer un estudio electroquímico del comportamiento del O₂ y el medio (MeOH/H₂O). Para esto se agregan 3.5 mL de disolución amortiguadora CHES, 3.5 mL de MeOH HPLC y 3.0 mL de una mezcla de MeOH/H₂O (1:1). El estudio electroquímico se lleva a cabo con la disolución tal y como se preparó, es decir, sin burbujear N₂ y con el O₂ atmosférico en contacto.

8.3.2. Ligantes

Se prepara la celda como se hizo en el estudio del medio, pero esta vez se le añade celda 1.0 mL de *miep/mimp* 0.01 mol/L. Primero, se realizan barridos tanto catódicos como anódicos en presencia de O₂, para posteriormente burbujear N₂ y volver a realizar barridos catódicos y anódicos.

8.3.3. Cumiep

Una vez que se realizan los estudios del ligante y el medio se le añade a la celda 0.5 mL de *Cumiep* 0.01 mol/L y posteriormente otros 0.5 mL de *miep* 0.01 mol/L. Primero, se realizan barridos tanto catódicos como anódicos en presencia de O₂, para posteriormente burbujear N₂ y volver a realizar barridos catódicos y anódicos.

8.3.4. Cumimp

Una vez que se realizan los estudios del ligante y el medio se le añade a la celda 0.5 mL de *Cumimp* 0.01 mol/L y posteriormente otros 0.5 mL de *mimp* 0.01 mol/L. Primero, se realizan barridos tanto catódicos como anódicos en presencia de O₂, para posteriormente burbujear N₂ y volver a realizar barridos catódicos y anódicos.

8.4. Actividad catecolasa

Todos los experimentos cinéticos se llevaron a cabo de la misma forma; usando una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm, 1 mL de disolución amortiguadora (HEPES o CHES), 1 mL de catalizador (*Cumiep* o *Cumimp*) y 1 mL de sustrato (3,5-DTBC), es importante resaltar que la celda se llenó en el orden ya mencionado. La reacción se siguió durante 1 minuto con mediciones cada 0.5 s y a una longitud de onda de 407 nm; cada experimento se realizó por triplicado.

Todas las disoluciones preparadas en el estudio cinético se realizaron en una mezcla de MeOH/H₂O (1:1) siendo el MeOH grado HPLC.

Las disoluciones empleadas durante la actividad catecolasa se describen a continuación, aunque dentro de los experimentos pueden cambiar las concentraciones de dichas disoluciones y en el caso del amortiguador el pH y el mismo amortiguador:

- Disolución amortiguadora: CHES con una concentración de 0.15 mol/L y un pH de 9.
- Disolución del catalizador: *Cumiep* o *Cumimp* con una concentración de 0.06 mmol/L.
- Disolución de sustrato: 3,5-diterbutilcatecol con una concentración de 6 mmol/L.

8.4.1. *Miep*

8.4.1.1. v_0 vs pH

Se sigue el experimento con las disoluciones y el procedimiento indicados; a excepción de la disolución amortiguadora. Se preparan tres disoluciones de HEPES 0.15 mol/L con pH de 7.0, 7.5 y 8.0. Así mismo se preparan otras tres disoluciones de CHES 0.15 mol/L con pH de 8.5, 9.0 y 9.5.

8.4.1.2. v_0 vs [*Cumiep*]

Se sigue el experimento con las disoluciones y el procedimiento indicados; en este caso lo que se va a ir variando es la concentración del catalizador, para lo que se preparan 5 disoluciones de *Cumiep* con concentración de 0.06 mmol/L, 0.12 mmol/L, 0.18 mmol/L, 0.24 mmol/L y 0.30 mmol/L.

8.4.1.3. v_0 vs [DTBC]

Se sigue el experimento con las disoluciones y el procedimiento indicados; esta vez se va a variar la concentración del sustrato, 3,5-DTBC. Para ello se van a preparar 9 disoluciones de DTBC con concentraciones de 0.15 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.6 mmol/L, 1.2 mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.4 mmol/L, 3.0 mmol/L, 4.5 mmol/L y 6 mmol/L. Todas las concentraciones en la celda se van a la tercera parte.

8.4.2. *Mimp*

8.4.2.1. v_0 vs pH

Se sigue el experimento con las disoluciones y el procedimiento indicados; a excepción de la disolución amortiguadora. Se preparan tres disoluciones de HEPES 0.15 mol/L con pH de 7.0, 7.5 y 8.0. Así mismo se preparan otras tres disoluciones de CHES 0.15 mol/L con pH de 8.5, 9.0 y 9.5.

8.4.2.2. v_0 vs [Cumimp]

Se sigue el experimento con las disoluciones y el procedimiento indicados; en este caso lo que se va a ir variando es la concentración del catalizador, para lo que se preparan 5 disoluciones de *Cumimp* con concentración de 0.06 mmol/L, 0.12 mmol/L, 0.18 mmol/L, 0.24 mmol/L y 0.30 mmol/L.

8.4.2.3. v_0 vs [DTBC]

Se sigue el experimento con las disoluciones y el procedimiento indicados; esta vez se va a variar la concentración del sustrato, 3,5-DTBC. Para ello se van a preparar 9 disoluciones de DTBC con concentraciones de 0.15 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.6 mmol/L, 1.2 mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.4 mmol/L, 3.0 mmol/L, 4.5 mmol/L y 6 mmol/L. Todas las concentraciones en la celda se van a la tercera parte.

Referencias

- [1] Rayner-Canham, G.; Overton, T. Properties of the 3d transition metals. In *Descriptive Inorganic Chemistry*; 5th ed; W. H. Freeman and Company: Nueva York, 2010; pp 548-569.
- [2] Bertini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S. J.; Valentine, J. S. Biological and synthetic dioxygen carriers. In *Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA: California, 1994; pp 204-205.
- [3] Earnshaw, A.; Harrington, T. J. Química de los grupos. In *Química de los elementos de transición; El manual moderno S.A.*: Ciudad de México, 1977; pp 113-114.
- [4] Cotton, F. A.; Wilkinson G. Los elementos de la primera serie de transición. In *Química Inorgánica Avanzada*; John Wiley and Sons: México, 1969; pp 924-928.
- [5] Raithby, P. R., Shields, G. P., Allen, F. H., & Motherwell, W. D. S. (2000). Structure correlation study of four-coordinate copper(I) and (II) complexes. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*, 56(3), 444–454.
- [6] Paulson, A. J., & Kester, D. R. (1980). Copper(II) ion hydrolysis in aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry*, 9(4), 269–277.
- [7] Rorabacher, D. B., & Schroeder, R. R. (2007). Electrochemistry of Copper. *Encyclopedia of Electrochemistry*.
- [8] Rorabacher, D. B. (2004). Electron Transfer by Copper Centers. *Chemical Reviews*, 104(2), 651–698.
- [9] Rote-Malone, R. M. Copper enzymes. In *Bioinorganic Chemistry: a short course*; John Wiley & Sons: Nueva Jersey, 2002; pp 187.
- [10] Crichton, R. Copper-coping with dioxygen. In *Biological Inorganic Chemistry*; 3rd ed; Academy Press: Londres, 2019; pp 405-407,411.
- [11] Lawrance, G. A. A complex life. In *Introduction to Coordination Chemistry*; John Wiley and Sons: Reino Unido, 2010; pp 240-241.
- [12] Koval, I. A., Gamez, P., Belle, C., Selmeczi, K., & Reedijk, J. (2006). Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chemical Society Reviews*, 35(9), 814-840.

- [13] Solomon, E.I.; Heppner, D.E.; Johnston, E.M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. T.; Tian, L. (2012) Copper active sites in biology. *Chemical Reviews*, 114, 3659-3853.
- [14] Dey, S. K., & Mukherjee, A. (2016). Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies. *Coordination Chemistry Reviews*, 310, 80–115.
- [15] Monzani, E., Battaini, G., Perotti, A., Casella, L., Gullotti, M., Santagostini, L., Opromolla, G. (1999). Mechanistic, Structural, and Spectroscopic Studies on the Catecholase Activity of a Dinuclear Copper Complex by Dioxygen. *Inorganic Chemistry*, 38(23), 5359–5369.
- [16] Neves, A., Rossi, L. M., Bortoluzzi, A. J., Szpoganicz, B., Wiezbicki, C., Schwingel, E., Ostrovsky, S. (2002). Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu–OH(phenol) Moieties. *Inorganic Chemistry*, 41(7), 1788–1794.
- [17] Oishi, N., Nishida, Y., Ida, K., & Kida, S. (1980). Reaction between Various Copper(II) Complexes and Ascorbic Acid or 3,5-Di-t-butylcatechol. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 53(10), 2847–2850.
- [18] Mendieta Martínez, A. U. (2018). *Acoplamiento de fenoles sustituidos catalizados por complejos bioinspirados de Cu(II)* [Tesis de maestría, UNAM].
- [19] Zerón Espinosa, P. G. (2010). *Estudio del complejo dinuclear de cobre (II) con un ligante derivado de 2-metilimidazol y etanolamina* [Tesis de licenciatura, UNAM]
- [20] Mendieta Martínez, A. U. (2016). *Acoplamiento oxidativo 2,6-dimetilfenol utilizando compuestos de coordinación dinucleares de Cu(II) como catalizadores* [Tesis de Licenciatura, UNAM]
- [21] González-Sebastián, L., Ugalde-Saldívar, V. M., Mijangos, E., Mendoza-Quijano, M. R., Ortiz-Frade, L., & Gasque, L. (2010). Solvent and pH effects on the redox behavior and catecholase activity of a dicopper complex with distant metal centers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(10), 1112–1118.

- [22] Mendoza-Quijano, M. R., Ferrer-Sueta, G., Flores-Álamo, M., Aliaga-Alcalde, N., Gómez-Vidales, V., Ugalde-Saldívar, V. M., & Gasque, L. (2012). Mechanistic insight on the catecholase activity of dinuclear copper complexes with distant metal centers. *Dalton Transactions*, 41(16), 4985.
- [23] Nelson, D. L.; Cox, M. M. Enzymes. In *Lehninger-Principles of Biochemistry*; 5th ed; W. H. Freeman and Company: Nueva York, 2008; pp 195-200
- [24] Chang, R.; Thoman, J. W. Chemical kinetics. In *Physical Chemistry for the Chemical Sciences*; University Science Books: Canadá, 2014; pp 715-722
- [25] Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264–8269.
- [26] López, S., France, J., Gerrits, W. J., Dhanoa, M. S., Humphries, D. J., & Dijkstra, J. (2000). A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *Journal of Animal Science*, 78(7), 1816.
- [27] Mendoza Quijano, M. R. (2010). *Complejo de cobre(II) con ligantes derivados del imidazol con actividad catecolasa*. [Tesis maestría, UNAM]
- [28] Zerón, P., Westphal, M., Comba, P., Flores-Álamo, M., Stueckl, A. C., Leal-Cervantes, C., Gasque, L. (2017). Dinuclear Copper(II) Complexes with Distant Metal Centers: Weaker Donor Groups Increase Catecholase Activity. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(1), 56-62.
- [29] Ruvalcaba Juárez, J. (2021). *Actividad catalítica de complejos mononucleares de Cu(II) con ligantes tridentados (NNN) conteniendo grupos imidazol*. [Tesis maestría, UNAM]
- [30] Gero, A., & Markham, J. J. (1951). Studies on Pyridines: I. The Basicity of Pyridine Bases. *The Journal of Organic Chemistry*, 16(12), 1835–1838.
- [31] Cantu, M. D., Hillebrand, S., & Carrilho, E. (2005). Determination of the dissociation constants (pKa) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion. *Journal of Chromatography A*, 1068(1), 99–105.
- [32] Oszczapowicz, J. (1984). The pKa, values of the conjugate acid of imidazole in water-ethanol mixtures. *Talanta*, 31(7), 559–560.

- [33] Belle, C., Selmeçzi, K., Torelli, S., & Pierre, J.-L. (2007). Chemical tools for mechanistic studies related to catechol oxidase activity. *Comptes Rendus Chimie*, 10(4-5), 271–283.
- [34] Fernandes, C., Neves, A., Bortoluzzi, A. J., Mangrich, A. S., Rentschler, E., Szpoganicz, B., & Schwingel, E. (2001). A new dinuclear unsymmetric copper(II) complex as model for the active site of catechol oxidase. *Inorganica Chimica Acta*, 320(1-2), 12–21.
- [35] Dey, S. K., & Mukherjee, A. (2016). Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies. *Coordination Chemistry Reviews*, 310, 80–115.
- [36] Martínez, A., Membrillo, I., Ugalde-Saldívar, V. M., & Gasque, L. (2012). Dinuclear Copper Complexes with Imidazole Derivative Ligands: A Theoretical Study Related to Catechol Oxidase Activity. *The Journal of Physical Chemistry*, 116, 8038–8044.