



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

“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y RECTIVIDAD DE COMPLEJOS DE
COBRE CON LIGANTES BENCIMIDAZOLILAMINOTIOÉTER”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. BRENDA NATALY SÁNCHEZ EGUÍA

TUTOR
Dr. IVAN CASTILLO PÉREZ
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2017

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

A **CONACyT** por otorgarme la beca **254496** y la **beca mixta** para realizar el proyecto de doctorado.

Al Proyecto **CONACyT** Ciencia Básica **151837** y **188724** por el financiamiento otorgado.

Al Proyecto **DGAPA-PAPIIT UNAM IN210214** e **IN203317** por el financiamiento otorgado.

Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas** de la UNAM por los apoyos otorgados.

Al **Instituto de Química** de la UNAM, por darme la oportunidad de llevar a cabo el proyecto.

Al **Dr. Ivan Castillo Pérez** por su tutoría en este proyecto y su amistad.

Al **Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar** y la **Dra. Laura Gasque Silva** miembros del comité tutor por sus aportaciones.

Al **Dr. Rafael Moreno Esparza** y el **Dr. Bernardo Frontana Uribe** miembros del comité tutor ampliado.

A los miembros del jurado por sus aportaciones.

A la **Dra. Maylis Orio** del Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille por los cálculos de estructura electrónica de los sistemas sintetizados en este trabajo.

Al **Dr. Ignacio Regla Contreras** por la síntesis del N-Me-2-clorometilbencimidazol indispensable para la realización de éste proyecto.

Al **Dr. Marcos Flores Álamo** y al **M. en C. Simón Ortega Hernández** por la elucidación de estructuras de rayos X.

A la **M. en C. Virginia Gómez Vidales** por la caracterización mediante resonancia paramagnética electrónica.

A la **Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya** por los análisis mediante espectroscopía infrarroja.

Al **Dr. Francisco Javier Pérez Flores**, **I.Q. Luis Velasco Ibarra** y **Dra. María del Carmen García González** por los análisis de espectrometría de masas por los métodos FAB, DART e IE.

A la **M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso**, **Q. Eréndira García Ríos** y **M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz** por el análisis de espectrometría de masas mediante ionización por electrospray ESI-MS.

A la **Q. María de la Paz Orta Pérez** por el análisis elemental mediante combustión.

A la **Dra. Beatriz Quiroz García** y al **Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez** por los análisis mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

A la **M. en I. Maricruz López López** por el manejo y disposición de residuos.

Al **personal académico y administrativo del Instituto de Química** por su labor.

A mis **compañeros** del Laboratorio de Química Bioinorgánica y Supramolecular (4-C) por su amistad y retroalimentación.

To **Dr. Ebbe Nordlander** for let me being part of his research group at Lund University.

To **Prof. Sven Lidn** for the resolution of the crystal structure of $(L_3CuNO_3)OTf$ at Lund University.

To my **labmates** in Chemical Physics department at Lund University for their friendship and sharing.

A mi familia

COMITÉ TUTOR

Dr. Ivan Castillo Pérez

Dra. Laura Gasque Silva

Dr. Víctor Ugalde Saldívar

COMITÉ TUTOR AMPLIADO

Dr. Rafael Moreno Esparza

Dr. Bernardo Frontana Uribe

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente

Dr. Rafael Moreno Esparza

Secretario

Dra. Susana Porcel García

Vocal

Dra. Laura Gasque Silva

Vocal

Dr. Alberto Rojas Hernández

Vocal

Dr. Bernardo Frontana Uribe

DIVULGACIÓN

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- IV LABIC Poster: “O₂ activation by copper complexes: mechanistic insights into copper monooxygenases” celebrado en la ciudad de Chascomús, Buenos Aires, Argentina, Agosto **2014**.
- 5° SILQCOM Charla “Biomimetic approach to PHM monooxygenase active site with triplet cupric-superoxo complexes” celebrado en la ciudad de Angra Dos Reis, Río de Janeiro, Brasil, Octubre **2015**.
- V LABIC Poster Blitz: “Activation of small molecules with complexes inspired by the Cu_M site of copper monooxygenases” celebrado en la ciudad de Querétaro, México, Octubre **2016**.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- Ivan Castillo; **Brenda N. Sánchez-Eguía**; Paulina R. Martínez-Alanis; Víctor M. Ugalde-Saldívar; Marcos Flores-Álamo “Synthesis, spectroscopic, and structural characterization of mixed thioether–benzimidazole copper complexes” *Polyhedron* **2015**, *85*, 824 – 829.
- **B. N. Sánchez-Eguía**; M. Flores-Álamo; M. Orio; I. Castillo “Side-on Cupric-Superoxo triplet complexes as competent agents for H-abstraction relevant to the active site of PHM” *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11134 – 11137.
- Ivan Castillo; Mario Suwalsky; María José Gallardo; Valentina Troncoso; **Brenda N. Sánchez-Eguía**; Edelmiro Santiago-Osorio; Itzen Aguiñiga; Ana K. González-Ugarte “Structural and functional effects of benzimidazole/thioether-copper complexes with antitumor activity on cell membranes and molecular models” *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *156*, 98 – 104.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Bioinorgánica y Supramolecular (4-C) del Instituto de Química de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Ivan Castillo Pérez

Parte de este trabajo se realizó en el departamento de Chemical Physics de la Universidad de Lund en el laboratorio del Dr. Ebbe Nordlander, Lund, Suecia

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A

Å	Angstrom (10^{-10} m)
Ar	Aromático
ASAr	Amina precursora de L ₁
ASPh	Amina precursora de L ₃
ASe	Amina precursora de L _{Se}
AAH	Abstracción de átomo de hidrógeno

C

°C	Grado Celsius o centígrado
Cu _H	Cobre coordinado a 3 His
Cu _M	Cobre coordinado a 2 His y 1 Met

D

DβM	Dopamina β-monooxigenasa
DFT	Density Functional Theory
DART	Direct Analysis in Real Time
DMF	N,N-Dimetilformamida
DHA	9,10-dihidroantraceno
DBT	Dibenzotiofeno

E

E _{1/2}	Potencial de media onda
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
EM	Espectrometría de masas
ESI	Electrospray Ionization
ENH	Electrodo normal de hidrógeno

F

FAB	Fast atom bombardment
FE	Fuerza de enlace

G

GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
-------	---

H

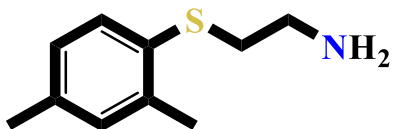
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
h	Hora
His	Histidina

I

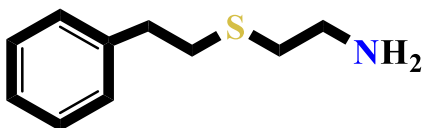
IR	Espectroscopía infrarroja
i	Corriente

J	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	K	Kelvin
L	L_{N3V}	Ligantes inspirados en Cu _M aquí reportados
M	m/z	Relación masa-carga
	mV	Milivoltios
	μA	microamperios (10 ⁻⁶ A)
	Met	Metionina
N	nm	Nanómetros (10 ⁻⁹ m)
P	ppm	Partes por millón
	PHM	Peptidilglicina-α-hidroxilante monooxigenasa
	Ph	Fenilo
R	RMN	Resonancia magnética nuclear
	RPE	Resonancia paramagnética electrónica
	Redox	Óxido-Reducción
S	S_{N2}	Sustitución nucleofílica bimolecular
T	TMS	Tetrametilsilano
	THF	Tetrahidrofurano
	TAO	Transferencia de átomo de oxígeno
	TβM	Tiramina-β-monooxigenasa
	TR	Tiempo de retención
U	UV-vis	Espectroscopía Ultravioleta-visible
V	V	Voltios

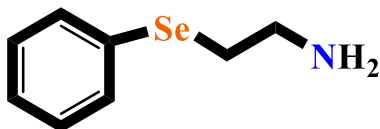
COMPUESTOS SINTETIZADOS



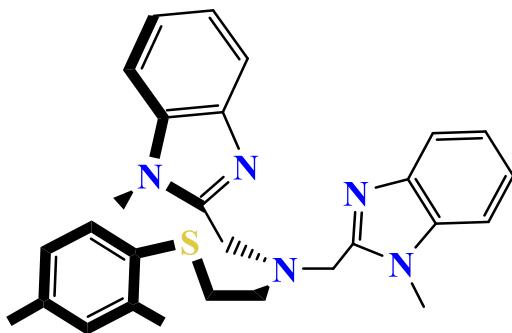
2-(2,4-dimetilfenil)tioetilamina (ASAr)



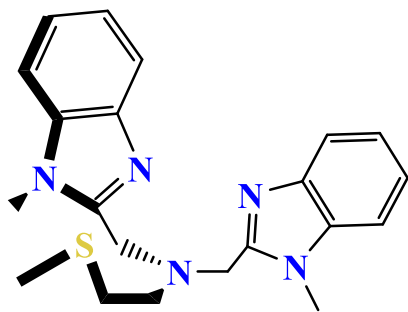
2-feniletioetilamina (ASPh)



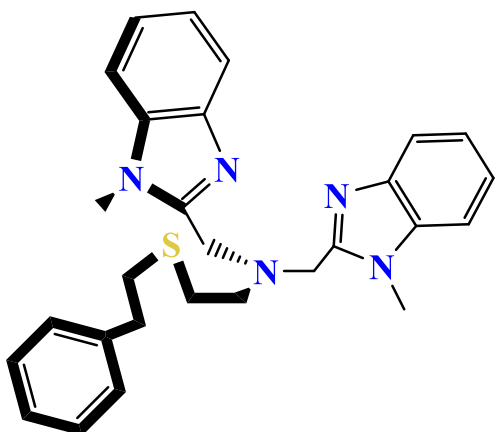
2-fenilselenoetilamina (ASe)



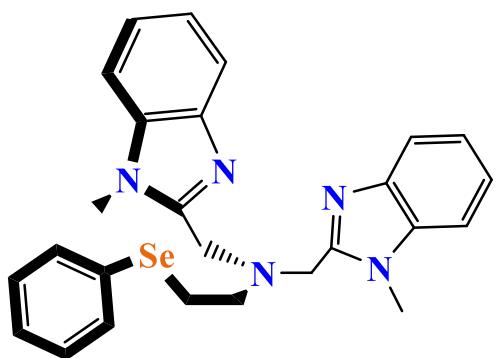
bis(1-metil-2-metilbencimidazolil)(2-(2,4-dimetilfenil)tioetil)amina (L₁)



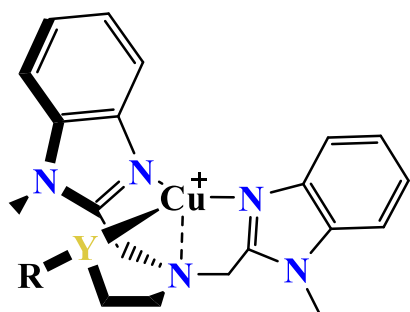
bis(1-metil-2-metilbencimidazolil)(metiltioetil)amina (L₂)



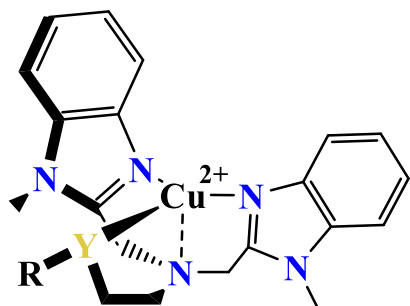
**bis(1-metil-2-metilbencimidazolil)
(feniletioetil)amina (L₃)**



**bis(1-metil-2-metilbencimidazolil)
(feniletioetil)amina (L_{Se})**



Complejos cuprosos con L_{N3Y}



Complejos cúpricos con L_{N3Y}

INDICE

Agradecimientos	II
Dedicatoria	IV
Comité tutor	V
Miembros del Jurado	VI
Divulgación	VII
Lugar donde se realizó el trabajo	VIII
Abreviaturas y símbolos	IX
Compuestos sintetizados	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XIX
Resumen	XX
Abstract	XXI

	Pág.
CAPÍTULO 1. MONOOXIGENASAS DEPENDIENTES DE COBRE	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Monooxigenasas dependientes de Cu.....	1
1.3 Peptidilglicina- α -hidroxilante monooxigenasa (PHM).....	2
1.3.1 Estudios Cinéticos.....	4
1.3.2 Estudios Mutagénicos.....	4
1.4 Dompamina- β -monooxigenasa (D β M).....	5
1.4.1 Estudios Cinéticos.....	5
1.5 Tiramina- β -monooxigenasa (T β M).....	6
1.5.1 Estudios Cinéticos.....	7
1.5.2 Estudios Mutagénicos.....	8
1.6 Mecanismos enzimáticos propuestos para las monooxigenasas dependientes de Cu.....	8
Referencias.....	10
CAPÍTULO 2. SISTEMAS MODELO INSPIRADOS EN EL SITIO ACTIVO DE LAS MONOOXIGENASAS DE Cu	12
2.1 Introducción.....	12
2.2 Sistemas modelo de las monooxigenasas de Cu.....	13
2.3 Sistemas modelo Cu-superoxo.....	14
2.3.1 Sistemas Cu(II)-O ₂ ^{•-} con ligantes tripodales tetradentados N ₄	15
2.3.2 Sistemas Cu(II)-O ₂ ^{•-} con ligantes tetradentados aniónicos N ₃ O ⁻	18
2.3.3 Sistemas Cu(II)-O ₂ ^{•-} con ligantes aniónicos N ₃	18
2.3.3 Sistemas Cu(II)-O ₂ ^{•-} con ligantes neutros N ₃	20

2.3.4 Sistemas Cu(II)-O ₂ ^{•-} con ligantes mixtos N ₂ S y N ₃ S.....	20
2.4 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo.....	22
2.4.1 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo con ligantes tripodales tetradentados N ₄	23
2.4.2 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo con ligantes tridentados N ₃	24
2.4.3 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo con ligantes mixtos N ₃ S.....	24
2.5 Ión Cu(II)-oxilo (cuprilo) Cu(II)-O•.....	25
Referencias.....	25
CAPÍTULO 3. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
3.1 Propuesta de investigación.....	28
3.2 Hipótesis.....	32
3.3 Objetivos.....	33
3.3.1 Objetivo General.....	33
3.3.2 Objetivos Particulares.....	33
Referencias.....	31
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1 Síntesis y caracterización de aminas.....	34
4.2 Síntesis y caracterización de ligantes.....	35
4.3 Síntesis y caracterización de complejos de Cobre.....	37
4.3.1 Caracterización electroquímica de complejos cuprosos.....	38
4.3.2 Síntesis y caracterización de complejos cuprosos.....	39
4.3.3 Síntesis y caracterización de complejos cúpricos.....	41
4.4 Estudios de reactividad.....	44
4.4.1 Reactividad de complejos Cuprosos.....	44
4.4.2 Reactividad de complejos Cúpricos.....	50
Referencias.....	53
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	54
Referencias.....	54
CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS.....	55
CAPÍTULO 7. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	56
7.1 General.....	56
7.2 Equipos.....	56
7.3 Síntesis y caracterización de compuestos.....	58
7.4. Generación y caracterización de especies reactivas.....	61
7.5. Activación de sustratos orgánicos mediada por los sistemas modelo.....	62
Referencias.....	62
ANEXOS.....	64
PUBLICACIONES.....	100

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Sitio activo binuclear no acoplado de monooxigenasas dependientes de Cu.....	2
Figura 1.2. Estructura cristalina de rePHMcc.....	3
Figura 1.3. Estructura cristalina de oxPHMcc/sub.....	4
Figura 1.4. Estructura cristalina de DβM.....	6
Figura 2.1. Ligantes tripodales tetradentados N ₄	16
Figura 2.2. Ligante aniónico tetradentado N ₃ O ⁻ TACN ^{PhO}	18
Figura 2.3. Ligantes tetradentados aniónicos y neutros N ₃	19
Figura 2.4. Ligantes mixtos N _X S, X = 2 y 3.....	21
Figura 2.5. Ligantes tripodales tetradentados N ₄	23
Figura 2.6. Ligantes tridentados N ₃	24
Figura 2.7. Ligante tripodal N ₃ SAr.....	24
Figura 3.1. Orbitales moleculares de grupos donadores que contienen átomos de N ó S hacia iones metálicos.....	29
Figura 3.2. Valores de pK _a y log K _{Cu²⁺} relacionado con la capacidad donadora de N en heterociclos.....	29
Figura 3.3. Ligantes mixtos bencimidazol-calcogenoéter L _{N3Y}	30
Figura 4.1. Estructura de Cu _M en monooxigenasas dependientes de Cu	34
Figura 4.2. ¹ H-RMN de L ₁ en THF- <i>d</i> ₈ a 25°C.....	36
Figura 4.3. ⁷⁷ Se-RMN de L _{Se} y precursores en THF- <i>d</i> ₈ a 25°C.....	37
Figura 4.4. Voltamperograma de L _{Se} y [L _{Se} Cu] ⁺	39
Figura 4.5. Diagrama Mercury de [L ₂ Cu] ₂ OTf ₂ al 50% de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y los aniones OTf ⁻ son omitidos por claridad.....	39
Figura 4.6. Comparación de espectros 2D-DOSY RMN de izq.) L ₁ ; der) [L ₁ Cu]OTf en THF- <i>d</i> ₈ a 25°C, muestran valores de D comprables (disoluciones 3.3 mM).....	41
Figura 4.7. Espectro y simulación RPE de [L _{Se} Cu]OTf ₂ en CH ₃ CN a 77 K.....	41
Figura 4.8. Diagrama Mercury de izq.) [L ₃ CuCl]OTf y der.) [L ₃ CuNO ₃]OTf al 50% de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y los aniones OTf ⁻ son omitidos por claridad.....	42
Figura 4.9. Diagrama Mercury de [L _{Se} CuH ₂ O]OMes ₂ al 50% de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y los aniones OTf ⁻ son omitidos por claridad.....	42
Figura 4.10. Espectro UV-vis del complejo [L ₂ CuO ₂ ⁻] ⁺ en THF a -80°C	45

Figura 4.11. Espectro experimental UV-vis de $[\mathbf{L}_1\text{Cu}]^+$ después de burbujear O_2 en THF a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y espectros simulados en estado electrónico singlete y triplete con el brazo de tioéter descoordinado optimización geométrica superoxo lateral $[\mathbf{L}_1\text{Cu(II)-}\eta^2\text{-O}_2]^+$. Figura insertada: Estructura optimizada del complejo cúprico superoxo triplete $[\mathbf{L}_1\text{Cu(II)-}\eta^2\text{-O}_2]^+$	46
Figura 4.12. izq.) Espectro UV-Vis de $[\mathbf{L}_2\text{Cu(II)-}\eta^2\text{-O}_2]^+$ con 9,10-DHA en THF a $-60\text{ }^\circ\text{C}$. der.) Gráfica de cinética de pseudo-primerorden de la desaparición de la banda de 340 nm del complejo $[\mathbf{L}_2\text{Cu(II)-}\eta^2\text{-O}_2]^+$ con 9,10-DHA en THF a $-60\text{ }^\circ\text{C}$, $R = 0.98$	47
Figura 4.13. Diagrama Mercury de $[\mathbf{L}_1\text{Cu-(}\mu\text{-OH)}]_2^{2+}$ al 50% de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y contraión se omiten por claridad.....	48
Figura 4.14. izq.) Espectro UV-vis de $[\mathbf{L}_3\text{Cu}]^+ + \text{O}_2$ en THF a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, der.) Espectro UV-vis de $[\mathbf{L}_{\text{Se}}\text{Cu}]^+ + \text{O}_2$ en THF a $-80\text{ }^\circ\text{C}$	50
Figura 4.15. izq.) Espectro UV-vis de $[\mathbf{L}_1\text{Cu}]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en THF a t.a., der.) Espectro UV-vis de $[\mathbf{L}_2\text{Cu}]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en THF a t.a.....	51
Figura 4.16. Cromatograma y espectro de masas de los productos de la reacción entre $[\mathbf{L}_1\text{Cu}]\text{OTf}_2$ y DBT.....	52
Figura A1. Diagramas Mercury de complejos con $\mathbf{L}_{\text{N}_3\text{Y}}$ al 50% de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y contraión (es) son omitidos por claridad.....	67
Figura A2. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de ASAr en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	68
Figura A3. Espectro IR-KBr de ASe.....	68
Figura A4. Espectro DART-MS y simulación de ASe.....	69
Figura A5. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de ASe en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	69
Figura A6. Espectro IR-KBr de ASPh.....	70
Figura A7. Espectro DART-MS y simulación de ASPh.....	70
Figura A8. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de ASPh en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	71
Figura A9. Espectro IR-KBr de \mathbf{L}_1	71
Figura A10. Espectro FAB^+ - MS de \mathbf{L}_1	72
Figura A11. Voltamperograma de velocidades de barrido de $\mathbf{L}_1\text{Cu}$ vs Fc^+/Fc	72
Figura A12. Espectro IR-KBr de \mathbf{L}_2	73
Figura A13. Espectro FAB^+ - MS de \mathbf{L}_2	73
Figura A14. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de \mathbf{L}_2 en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	74
Figura A15. Espectro $^{13}\text{C-RMN}$ de \mathbf{L}_2 en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	74
Figura A16. Espectro 2D-DOSY-RMN de izq.) \mathbf{L}_2 y der.) $[\mathbf{L}_2\text{Cu}]^+\text{OTf}$ en THF- d_8 a $25\text{ }^\circ\text{C}$. (3.3 mM).....	75
Figura A17. Voltamperograma de velocidades de barrido de $\mathbf{L}_2\text{Cu}$ vs Fc^+/Fc	75

Figura A18. Espectro DART-MS y simulación de L_3	76
Figura A19. Espectro 1H -RMN de L_3 en $CDCl_3$ a $25\text{ }^\circ C$	76
Figura A20. Voltamperograma de velocidades de barrido de L_3Cu vs Fc^+/Fc	77
Figura A21. Voltamperograma de L_3 y L_3Cu vs Fc^+/Fc	77
Figura A22. Voltamperograma de velocidades de barrido de $L_{Se}Cu$ vs Fc^+/Fc	78
Figura A23. Espectro IR-KBr de L_{Se}	78
Figura A24. Espectro DART-MS y simulación de L_{Se}	79
Figura A25. Espectro 1H -RMN de L_{Se} en $THF-d_8$ a $25\text{ }^\circ C$	79
Figura A26. Espectro ^{13}C -RMN de L_{Se} en $THF-d_8$ a $25\text{ }^\circ C$	80
Figura A27. Espectro 1H -RMN de $[L_1Cu]OTf$ en $THF-d_8$ a $-40\text{ }^\circ C$	80
Figura A28. Espectro 1H -RMN de $[L_2Cu]OTf$ en $THF-d_8$ a $25\text{ }^\circ C$	81
Figura A29. Espectro IR-KBr de $[L_{Se}Cu]OTf$	81
Figura A30. Espectro ESI-MS de $[L_{Se}Cu]OTf$ en CH_3CN	82
Figura A31. Espectro 1H -RMN de $[L_{Se}Cu]OTf$ en $THF-d_8$ a $25\text{ }^\circ C$	82
Figura A32. Espectro IR-KBr de $[L_1Cu]OTf_2$	83
Figura A33. Espectro ESI-MS de $[L_1Cu]OTf_2$ en CH_3CN	83
Figura A34. Espectro UV-vis de $[L_1Cu]OTf_2$ en CH_3CN a t.a.....	84
Figura A35. Espectro y simulación RPE de $[L_1Cu]OTf_2$ en CH_3CN a 77 K	84
Figura A36. Espectro IR-KBr de $[L_3Cu]OTf_2$	85
Figura A37. Espectro ESI-MS y simulación de $[L_3Cu]OTf_2$ en CH_3CN	85
Figura A38. Espectro UV-Vis de $[L_3Cu]OTf_2$ en CH_3CN a t.a.....	86
Figura A39. Espectro IR-KBr de $[L_{Se}Cu]OTf_2$	86
Figura A40. Espectro ESI-MS y simulación de $[L_{Se}Cu]OTf_2$ en CH_3CN	87
Figura A41. Espectro UV-Vis de $[L_{Se}Cu]OTf_2$ en CH_3CN a t.a.....	87
Figura A42. Espectro UV-Vis de $[L_1Cu]^+ + O_2$ en THF a $-80\text{ }^\circ C$	88
Figura A43. Espectro UV-Vis de $[L_2Cu]^+ + O_2$ en THF a $-80\text{ }^\circ C$	88
Figura A44. Estructura optimizada de $[(L_1Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ singlete (peroxo lateral, tioéter decoordinado) con distancias interatómicas.....	89
Figura A45. Estructura optimizada de $[(L_2Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ singlete (peroxo lateral, tioéter decoordinado) con distancias interatómicas.....	89

Figura A46. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter descoordinado singlete $[(L_1Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ (rosa pálido), singlete lateral $[L_1CuO_2]^+$ (amarillo), y triplete lateral $[L_1CuO_2]^+$ (rojo).....	90
Figura A47. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter descoordinado singlete $[(L_2Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ (rosa), singlete lateral $[L_2CuO_2]^+$ (morado), y triplete lateral $[L_2CuO_2]^+$ (azul).....	90
Figura A48. Estructura optimizada de $[L_1CuO_2]^+$ triplete (superoxo lateral, tioéter coordinado) con distancias interatómicas.....	91
Figura A49. Estructura optimizada de $[L_2CuO_2]^+$ triplete (superoxo lateral, tioéter coordinado) con distancias interatómicas.....	91
Figura A50. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter coordinado triplete $[L_1CuO_2]^+$ (rojo) y triplete $[L_2CuO_2]^+$ (azul).....	92
Figura A51. Estructura optimizada de $[L_1CuO_2]^+$ triplete (superoxo lateral, tioéter descoordinado) con distancias interatómicas.....	92
Figura A52. Estructura optimizada de $[L_2CuO_2]^+$ triplete (superoxo lateral, tioéter descoordinado) con distancias interatómicas.....	93
Figura A53. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter descoordinado triplete $[L_1CuO_2]^+$ (rojo) y triplete $[L_2CuO_2]^+$ (azul).....	93
Figura A54. Diagrama orbital-molecular del superoxo triplete lateral $[L_1CuO_2]^+$ con tioéter descoordinado. Código de colores: Cu, Amarillo oscuro; O, rojo; N, azul rey; C, verde; H, blanco.....	94
Figura A55. Diagrama orbital-molecular del superoxo triplete lateral $[L_2CuO_2]^+$ con tioéter descoordinado. Código de colores: Cu, Amarillo oscuro; O, rojo; N, azul rey; C, verde; H, blanco.....	95
Figura A56. izq.) Espectro UV-Vis de $[L_2Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ en THF a $-40\text{ }^\circ\text{C}$. der.) Gráfica de cinética de pseudo-primerorden de la desaparición de la banda de 340 nm del complejo $[L_2Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ con THF a $-40\text{ }^\circ\text{C}$, $R = 0.98$	96
Figura A57. TIC/GC-MS del producto de reacción de $L_1Cu^{II}-OO^-$ con 9,10-DHA. Todos los espectros a la izquierda corresponden al perfil del antraceno y los de la derecha al perfil de la antraquinona.....	96
Figura A58. TIC/GC-MS del producto de reacción de $L_2Cu^{II}-OO^-$ con 9,10-DHA.....	97
Figura A59. Espectro experimental y simulado RPE de $[L_1Cu^{II}-OOH]^+$ (Acetona, 77 K).....	97
Figura A60. Espectro experimental y simulado RPE de $[L_2Cu^{II}-OOH]^+$ (Acetona, 77 K).....	98
Figura A61. Izq. Espectro ^{31}P -RMN de PPh_3 , Der. ^{31}P -RMN de HPPH_2 con los complejos L_2CuOOH (azul), L_3CuOOH (verde) y blanco (rojo) en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	98
Figura A62. ^1H -RMN de tioanisol con 1) sin complejo, 2) L_2CuOOH y 3) L_3CuOOH en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	99
Figura A63. TIC/GC-MS del producto de reacción de izq.) $L_2Cu^{II}-OOH$ y der.) $L_{Se}Cu^{II}-OOH$ con DBT.....	99

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Efecto isotópico cinético primario y secundario de H y O en DβM y PHM	6
Tabla 1.2. Parámetros RPE de proteínas de Cu rTβM y DβM.....	7
Tabla 2.1. Características del ligante superoxo hacia Cu observadas con sistemas modelo.....	15
Tabla 2.2. Potenciales de media onda Cu ^{2+/+} en CH ₃ CN vs Fc ⁺ /Fc.....	16
Tabla 2.3. Características espectrales de complejos modelo cúprico-superoxo.....	21
Tabla 4.1. Potenciales de media onda Cu ^{2+/+} en mV vs Fc ⁺ /Fc.....	36
Tabla 4.2. Coeficiente de difusión (D) y radio hidrodinámico (rH) de L _{N3Y} y complejos cuprosos.....	40
Tabla 4.3. Distancias de enlace y ángulos seleccionados para las estructuras en estado sólido.....	43
Tabla 4.4. Valores de ΔE y ΔG para los sistemas modelo L _{N3Y}	44
Tabla 4.5. Distancias y ángulos de enlace seleccionados de [L ₁ Cu(μ-OH)] ₂ ²⁺	48
Tabla A1. Datos cristalográficos para las estructuras en estado sólido.....	64
Tabla A2. Distancias de enlace y ángulos seleccionados para las estructuras en estado sólido.....	66

RESUMEN

Las monooxigenasas dependientes de Cu son una familia de enzimas que realizan la inserción de uno de los átomos de la molécula de O₂ a sustratos biológicamente importantes como son algunos neurotransmisores; a esta familia pertenecen la peptidilclicina- α -hidroxilante monooxigenasa (PHM), dopamina- β -monooxigenasa (D β M) y tiramina- β -monooxigenasa (T β M). Dichas enzimas presentan en su sitio activo dos átomos de Cu enlazados cada uno a un dominio de la proteína: el llamado Cu_H se encuentra coordinado por 3 residuos de histidina y tiene como función el proceso de transferencia electrónica, mientras que el denominado Cu_M se encuentra coordinado a dos residuos de histidina y un residuo de metionina; éste sitio de cobre presenta la actividad monooxigenasa.

Inspirados en el Cu_M, en este trabajo se reporta la síntesis, caracterización y reactividad de sistemas modelo con ligantes tripodales que incorporan grupos bencimidazoilo y calcogenoéter que asemejan estructuralmente a dicho sitio activo. Los complejos cuprosos con dichos ligantes mostraron que son capaces de activar a la molécula de O₂ selectivamente, dando lugar a un complejo tipo cúprico superoxo coordinado de forma lateral, en estado electrónico triplete. Estos complejos cobre-superoxo son activos hacia la reacción de abstracción de átomo de hidrógeno del 9,10-dihidroantraceno como sustrato modelo, de manera análoga a la reactividad presentada por las monooxigenasas dependientes de Cu. Este trabajo constituye el primer informe de complejos cúprico-superoxo con las características anteriormente mencionadas.

Por otro lado, los sistemas modelo en su forma de complejos cúpricos mostraron que son capaces de llevar a cabo la reacción de transferencia de átomo de oxígeno del peróxido de hidrógeno hacia sustratos orgánicos que contienen heteroátomos. Esta información analizada de manera conjunta revela la importancia del residuo de metionina presente en el sitio Cu_M, e incentiva a seguir explorando su posible participación en el ciclo catalítico.

ABSTRACT

Cu-dependent monooxygenases are a family of enzymes that perform the insertion of one atom of the O₂ molecule into biologically important substrates such as neurotransmitters; to this family belong the peptidylglycine- α -hydroxylating monooxygenase (PHM), dopamine- β -monooxygenase (D β M) and tyramine- β -monooxygenase (T β M). These enzymes have in their active sites two Cu atoms each linked to a protein domain, with the so-called Cu_H coordinated by 3 histidine residues as an electron transfer processing center, while the center with the Cu_M denomination is coordinated to two histidine and one methionine residue; this second copper site is responsible for the monooxygenase activity.

Inspired by the Cu_M site, this work reports the synthesis, characterization, and reactivity of model systems with tripodal ligands incorporating benzimidazolyl and chalcogenoether groups that structurally resemble the active site. The cuprous complexes with such ligands showed that they are capable of activating the O₂ molecule selectively, giving rise to cupric-superoxo complexes coordinated in a side-on fashion and in a triplet ground state. These copper-superoxo complexes are active in hydrogen atom abstraction towards 9,10-dihydroanthracene as model substrate, in an analogous fashion to that reported for Cu-dependent monooxygenases. The work herein represents the first report of cupric-superoxo complexes with the aforementioned characteristics.

In contrast, the model systems in the form of cupric complexes showed that they are capable of carrying out the oxygen atom transfer reactions to heteroatom-containing organic substrates. The overall information obtained reveals the importance of the methionine residue contained in the Cu_M site, and encourages further exploration of their possible participation in the catalytic cycle.

Capítulo 1

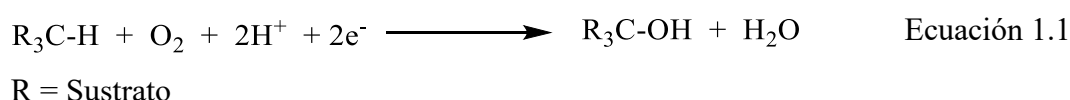
MONOOXIGENASAS DEPENDIENTES DE COBRE

1.1 Introducción

El oxígeno (O₂) es esencial para la vida ya que juega un papel fundamental en el metabolismo de sustancias requeridas para ciertas funciones vitales, tales como aminoácidos, lípidos, azúcares, vitaminas, hormonas, etc.¹ Sin embargo, la reacción de la molécula de O₂ con sustratos orgánicos no se lleva a cabo en condiciones ambientales debido a que las moléculas orgánicas típicas tienen estados fundamentales singlete, mientras que el estado basal del O₂ es triplete, por lo que dichas transformaciones están prohibidas por la regla de selección de spin. La naturaleza ha evolucionado para utilizar cofactores orgánicos y metales de transición con el fin de eludir dicha regla de selección de spin que presentan estas reacciones.¹

El cobre (Cu) es uno de los metales utilizados como cofactor en sistemas biológicos debido a su abundancia natural en la corteza terrestre; existen varias enzimas dependientes de éste metal, dentro sus funciones destacan los procesos de transferencia electrónica; la reducción de NO₂⁻ y N₂O; la activación de sustratos y el enlace, activación y reducción de la molécula de O₂.^{2,3}

Para él último caso encontramos a las oxidasas, las cuales catalizan la reducción con cuatro electrones (\bar{e}) de la molécula de O₂ a agua (H₂O). También encontramos enzimas que dan lugar a la hidroxilación de enlaces C-H para la síntesis de moléculas fisiológicamente importantes. Esta reacción es una oxidación con dos \bar{e} que está acoplada con la reducción de O₂ para generar una molécula de H₂O y la incorporación de un átomo de O₂ en el sustrato (ecuación 1.1); por tanto, estas enzimas se clasifican como monooxigenasas.⁴ Sin monooxigenasas de Cu la hidroxilación de innumerables sustratos orgánicos no ocurriría a velocidades medibles.



1.2 Monooxigenasas dependientes de Cu

Las monooxigenasas que contienen Cu en su sitio activo son una clase relativamente pequeña de enzimas redox, homólogas, eucariotas, dependientes de Cu, ascorbato (Asc) y O₂. Presentan un sitio activo binuclear, no acoplado magnéticamente es decir, dos átomos de Cu por subunidad, dichos centros metálicos presentan diferentes ambientes de coordinación.¹

En el sitio activo de éstas enzimas los átomos de Cu se encuentran separados por 11 y 14 Å (PHM y D β M respectivamente)^{5,6} enlazados al mismo grupo de aminoácidos 5 histidinas y 1 metionina (Figura 1.1). Los centros de Cu tienen funciones distintas, el Cu_H coordinado por 3 residuos de histidina (His107, His108 e His172) cuya función es la de reservorio de \bar{e} , el cual suministra el segundo \bar{e} necesario para la hidroxilación del enlace C-H mediante una transferencia intramolecular de \bar{e} de Cu_H a Cu_M. El centro denominado Cu_M coordinado por 2 residuos de histidina y 1 residuo de metionina

(His242, His244 y Met314), tiene como función la coordinación y activación de la molécula de O₂ e hidroxilación del sustrato; éste centro es el que presenta la actividad monooxigenasa.¹

Tres enzimas pertenecen a esta clase: dopamina-β-monooxigenasa (DβM), peptidilglicina α hidroxilante (PHM) y tiramina-β-monooxigenasa (TβM).⁷ La primera cataliza la transformación de dopamina a norepinefrina, dos neurotransmisores; la segunda cataliza la hidroxilación de péptidos terminales de glicina indispensable para la síntesis de hormonas; la última cataliza la reacción análoga a la DβM transformando la tiramina en octopamina, dos neurotransmisores en invertebrados.¹ La comparación de la secuencia primaria de PHM y DβM indica que tienen un núcleo central de aproximadamente 300 aminoácidos de los cuales 27 % son idénticos y 40 % homólogos.⁸ Mientras que la secuencia de TβM es 39 % idéntica y 40 % homóloga a su equivalente en mamíferos DβM.⁹

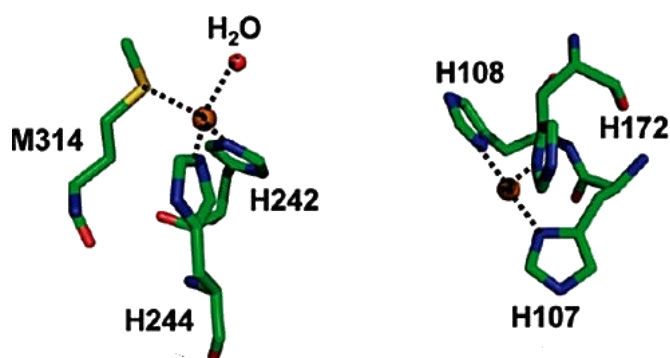
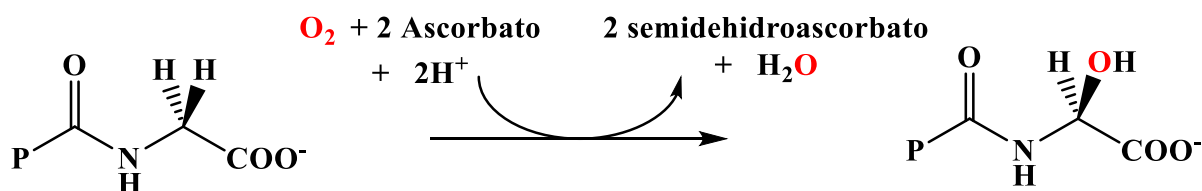


Figura 1.1. Sitio activo binuclear no acoplado de monooxigenasas dependientes de Cu¹⁰

1.3 Peptidilglicina-α-hidroxilante (PHM)

La PHM se localiza en las vesículas secretoras de la glándula pituitaria y se conoce de forma soluble y enlazada a la membrana.⁸ PHM junto con PAL (peptidilamidoglicolato liasa) conforman los dos dominios de PAM (peptidilglicina-α-amidante) la cual cataliza la α-amidación de péptidos terminales de glicina para dar lugar al precursor de la síntesis de hormonas (prohormona); este proceso es crucial en la activación de las mismas dado que más de la mitad de todos los péptidos responsables de la síntesis de hormonas tienen que ser α-amidados para ser bioactivos.¹¹ El dominio monooxigenasa PHM cataliza la hidroxilación del C_α del C-terminal en péptidos terminales de glicina (Esquema 1.1) mientras que el dominio PAL liasa regula la ruptura del peptidilamidoglicolato para dar lugar al péptido terminal amidado y el glioxilato como productos finales.¹²



P = péptido

Esquema 1.1. Reacción catalizada por PHM

La estructura cristalina de la enzima fue obtenida utilizando N- α -acetil-3,5-diyodotirosilglicina un sustrato dipéptido de la PHMcc (cc: catalytic core = sitio activo), tres formas de la enzima fueron cristalizadas y sus estructuras fueron determinadas por cristalografía de rayos X; 1) oxidada oxPHMcc, 2) reducida rePHMcc y 3) oxidada enlazada al sustrato oxPHMcc/sub. En todas las formas la proteína adopta la misma estructura con pequeñas diferencias en las conformaciones de algunas cadenas laterales del sitio activo y en la geometría de coordinación de los centros de Cu. La estructura consiste en dos Cu enlazados a los dominios de la proteína, cada uno con alrededor de 150 residuos de longitud que están conformados principalmente por lazos β . Los dos dominios conectados por tres residuos forman un elipsoide aplanado con dimensiones aproximadas de 55, 45 y 45 Å.¹¹ La estructura cristalina revela que el sitio activo está expuesto al disolvente y que los centros de Cu están separados por una distancia de ~ 11 Å (Figura 1.2).⁵

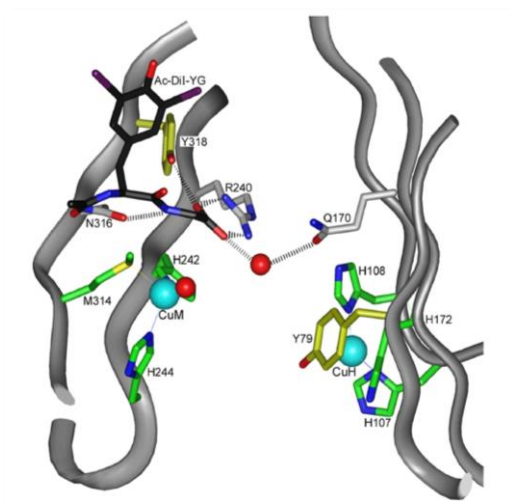


Figura 1.2. Estructura cristalina de rePHMcc⁸

Para la determinación de la estructura cristalina de la enzima en presencia de sustrato, ascorbato y O₂ fue necesario que la colección de datos cristalográficos fuera realizada bajo condiciones catalíticas; para lograr esto Amzel y colaboradores estabilizaron este complejo utilizando péptidos denominados sustratos lentos, dichos péptidos contienen D-aminoácidos C-terminales. Durante la reacción, el hidrógeno *pro-S* en el C- α del residuo terminal de glicina se abstrae, generando el radical glicilo; por lo tanto, los péptidos con L-aminoácidos en la posición terminal no son sustratos para PHM, mientras que los D-aminoácidos pueden ser hidroxilados por la enzima.¹³ En la estructura oxidada enlazada al sustrato diyodotirosil-D-treonina (IYT) el cuarto ligante en el Cu_M es el disolvente (H₂O u OH) mientras que en el complejo precatalítico está ocupada por una densidad electrónica que ajusta perfectamente a un átomo de O₂. El O₂ se encontró coordinado al Cu_M con una geometría terminal η^1 , el ángulo Cu_M-O-O es de 110° y la distancia encontrada para el enlace O-O fue de 1.23 Å, esta geometría es compatible con un superóxido enlazado al Cu. La distancia del Cu_M al O enlazado encontrada es de 2.11 Å, mientras que hacia el no enlazado es de 2.78 Å. Los dos átomos de oxígeno se encontraron a 4.13 y 4.73 Å de distancia hacia el C- α del sustrato (Figura 1.3).¹³ Las estructuras de las formas oxidada, reducida y enlazada al sustrato de PHMcc mostraron ligeras diferencias que dan evidencia del posible ciclo catalítico en PHM.¹¹

Existe evidencia genética que sugiere que la PHM es requerida para la α -amidación de péptidos en la etapa embrional y de desarrollo de la larva de *Drosophila*.¹⁴ En humanos PAM es el blanco para el diseño de fármacos contra enfermedades que van desde artritis reumatoide hasta el cáncer.¹⁵

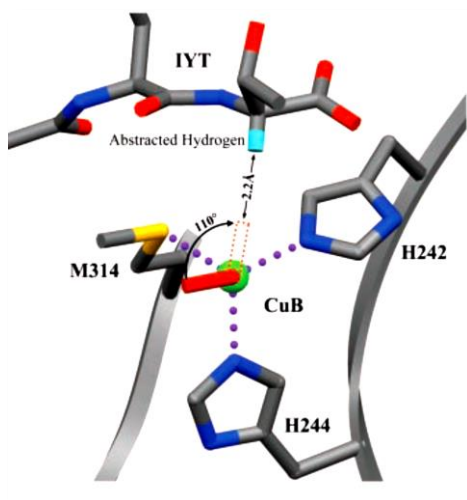


Figura 1.3. Estructura cristalina de oxPHMcc/sub¹³

1.3.1 Estudios Cinéticos

El ácido hipúrico [N-benzoilglicina, fuerza de enlace (FE) C-H 87 kcal mol⁻¹] ha sido utilizado como sustrato análogo para la enzima PAM. Klinman y colaboradores utilizaron este sustrato protonado y deuterado; los patrones iniciales de velocidad de la reacción así como las gráficas del doble recíproco (diagrama de Lineweaver-Burk)¹⁶ de la velocidad, indicaron un mecanismo en el cual el O₂ se enlaza después del ácido hipúrico a la enzima reducida PHM.¹²

Otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación demostró la relación entre la reacción de abstracción de átomo de hidrógeno (AAH) y la activación de O₂ midiendo el efecto isotópico cinético (EIC) utilizando oxígeno marcado, mediante el uso de espectrometría de masas se cuantificó el EIC del oxígeno que puede relacionarse con la estructura del oxígeno activado en Cu_M.¹⁷ Estos estudios condujeron a la discriminación de diversos mecanismos propuestos para dichas enzimas (ver sección 1.6). Los datos obtenidos por los experimentos descritos anteriormente se muestran en la Tabla 1.1, donde se aprecia que el mecanismo se conserva en el caso de PHM y DβM.

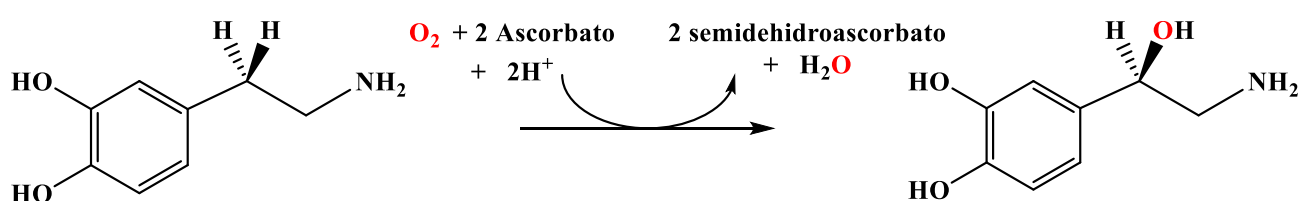
1.3.2 Estudios Mutagénicos

Al investigar la adición del sustrato en el centro catalítico, se realizó un estudio mutagénico que reemplazó importantes residuos de aminoácidos que anclan al sustrato en posición para el proceso catalítico mediante enlaces de hidrógeno. Si este fuera el caso y el enlace de hidrógeno fuera importante, entonces la reacción no se llevaría a cabo. Lo que se encontró en el estudio fue que la sustitución de varios residuos importantes necesarios en el enlace de hidrógeno mostró valores de K_M (constante Michaelis-Menten)¹⁸ disminuidos que indican la pérdida de afinidad del catalizador por el sustrato. El reemplazo de Y318 por fenilalanina incrementó los valores de K_M siete veces, lo que indica una menor afinidad. La sustitución de M314 conduce a la pérdida de la actividad catalítica. Estas

observaciones confirman la necesidad de dicha unión del tipo enlace de hidrógeno para que la reacción proceda.^{5,13}

1.4 Dopamina- β monooxigenasa (D β M)

La D β M es una glicoproteína encontrada en mamíferos en vesículas neurosecretoras de la glándula adrenal, lleva a cabo la conversión catalítica de la dopamina a norepinefrina dentro de la ruta biosintética de la catecolamina. La reacción catalizada por esta enzima es la transformación de dopamina en norepinefrina, mediante la hidroxilación regio- y enantioselectiva del carbono bencílico de la etilamina en la estructura de la dopamina (Esquema 1.2), motivo por el cual la actividad de la D β M es fisiológicamente crítica para la regulación de dopamina y epinefrina.



Esquema 1.2. Reacción catalizada por D β M

Vendelboe *et al.*⁶ reportaron la estructura cristalina de la enzima D β M en su forma dimérica, la cual muestra una conformación abierta de manera similar a la encontrada en PHM, en la cual se observa una distancia de ~ 14 Å de separación entre los átomos de Cu y además presenta una conformación cerrada con un núcleo conectado (distancia Cu – Cu ~ 5 Å, Figura 1.4). Esto sugiere que los dominios que contienen Cu_H y Cu_M presentan cierta flexibilidad conformacional, se desconoce si esto es relevante para la actividad de la enzima. La deficiencia genética de D β M en humanos resulta en pacientes que son incapaces de sintetizar norepinefrina y epinefrina resultando en hipotensión. Estudios con ratones donde se inhibe el gen que codifica la D β M resultó en muerte fetal en el útero, verificando que la D β M es esencial para el desarrollo embrional.¹⁹ Adicionalmente, la norepinefrina se relaciona con procesos fisiológicos y de comportamiento, así como enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo Alzheimer.²⁰

1.4.1 Estudios cinéticos

Aproximadamente hace 4 décadas se propuso que la enzima D β M seguía un mecanismo en el cual el O₂ se enlazaba al sitio catalítico antes que el sustrato, esto indicaba que la velocidad de enlace del sustrato al sitio catalítico era independiente de la concentración de O₂.²¹ Sin embargo, en un estudio realizado por Klinman utilizando sustratos marcados con tritio se encontró que el consumo del sustrato por la enzima era dependiente de la concentración de O₂, evidencia de un mecanismo cinético aleatorio para ésta enzima.²² La reacción de D β M con dopamina (FE C-H = 85 kcal mol⁻¹) utilizando EIC dio un valor de 10.9 ± 1.9 (Tabla 1.1);²³ este valor fue utilizado posteriormente con una serie de feniletilaminas *para*-sustituídas en un estudio de estructura-reactividad para calcular la constante de velocidad en el rompimiento del enlace C-H en la reacción catalizada por esta enzima, observándose

un incremento en la velocidad de la reacción cuando el anillo contiene grupos electrodonadores; esto fue interpretado inicialmente como resultado de un estado de transición deficiente en electrones.

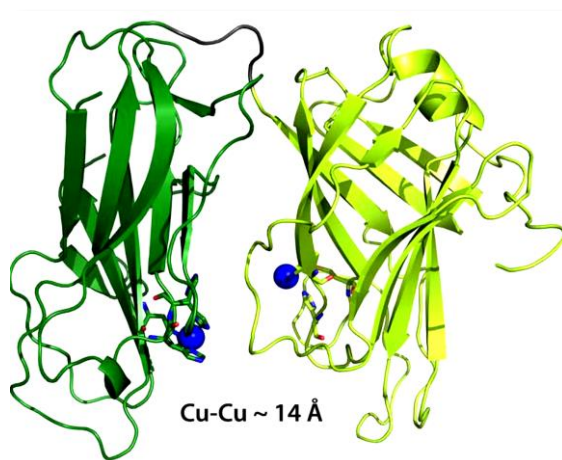


Figura 1.4. Estructura cristalina de DβM⁶

Sin embargo, si se considera el efecto túnel del átomo de hidrógeno utilizando el modelo de Marcus modificado, los autores concluyeron que la correlación estructura-reactividad reportada es un reflejo del cambio en la energía de activación (ΔG°) de la reacción con los diferentes sustratos.^{17,24} A pesar de correlacionar el efecto túnel con ΔG° , actualmente no existen datos computacionales o experimentales del valor de ΔG° que represente el equilibrio entre los sustratos feniletilamina y el radical libre que se forma en el sustrato cuando ocurre la AAH.

Tabla 1.1. Efecto isotópico cinético primario y secundario de hidrógeno y oxígeno en DβM y PHM

Enzima	Intrínseco		Observado	
	k_H/k_D para enlace C-H		k_{16}/k_{18} para enlace O-O	
	1°	2°	C-H	C-D
DβM	10.9 (1.9)	1.19 (0.06)	1.0197 (0.0003)	1.0256 (0.0003)
PHM	10.6 (0.8)	1.2 (0.03)	1.0167 (0.0032)	1.0216 (0.0014)

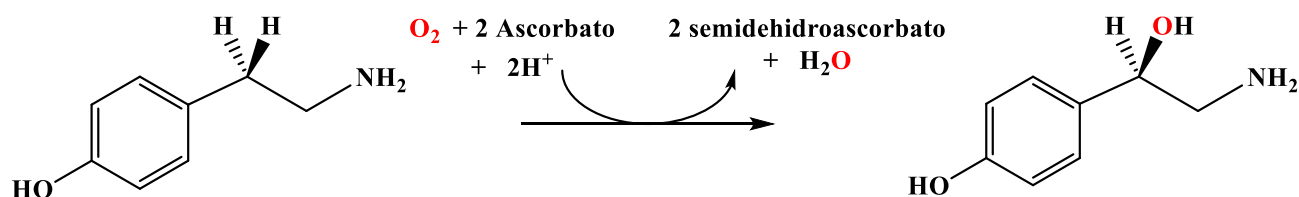
Datos tomados de las referencias 11, 14 y 20

Los datos reportados en la Tabla 1.1 demuestran una alta conservación en el mecanismo de las enzimas PHM y DβM.

1.5 Tiramina-β monooxigenasa (TβM)

El neuromodulador octopamina desempeña un papel crucial en el comportamiento de insectos, se ha demostrado que está involucrado en diversas funciones centrales y periféricas, incluidas el control de las contracciones musculares y del corazón, biosíntesis de feromonas y percepción, regulación y liberación de hormonas. Este neurotransmisor es sintetizado en el sistema nervioso de los insectos

mediante la hidroxilación de tiramina (Esquema 1.3), proceso llevado a cabo por la enzima T β M análoga de la enzima encontrada en mamíferos D β M, *vide supra*.⁹



Esquema 1.3. Reacción catalizada por T β M

La T β M se comporta como monómero bajo condiciones fisiológicas, sin embargo a valores altos de pH/baja fuerza iónica la forma dimérica predomina. Estudios demuestran que la enzima se encuentra en las neuronas octopaminérgicas. Una comparación de los parámetros obtenidos por resonancia paramagnética electrónica (RPE) para rT β M y D β M (Tabla 1.2) muestra valores similares para ambas enzimas, lo cual es congruente para dos centros de Cu tipo 2 con valores $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.00$ y $A_{\parallel} \geq 120$ G.⁹

Tabla 1.2. Parámetros RPE de proteínas de Cu rT β M y D β M

Proteína	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel} (G)
T β M	2.271	2.005	157
D β M	2.277	2.051	155

1.5.1 Estudios Cinéticos

Gray *et al.* estudiaron la cinética de la enzima T β M en su forma recombinante utilizando como sustratos la tiramina (4-hidroxifeniletilamina), la dopamina y la feniletilamina (sustrato no hidroxilado ni fisiológico), encontrando que la tiramina y la dopamina presentaron valores K_M similares de 0.16 y 0.18 mM respectivamente; la velocidad de transformación de sustrato k_{cat} para la tiramina resultó 10 veces más rápida que para la transformación de la dopamina y para el caso de la feniletilamina el valor encontrado fue intermedio, sin embargo se observó que para dicho sustrato la cantidad necesaria para alcanzar el 50 % de la velocidad máxima (comportamiento Michaelis-Menten) fue aproximadamente 100 veces mayor que en el caso de los sustratos hidroxilados.⁹ Esto se puede explicar de acuerdo a lo reportado por Prigge y colaboradores que sugiere que el residuo Glu369 en D β M (Glu330 en T β M) forma un enlace de hidrógeno con el grupo *p*-OH de los sustratos;¹¹ esto explica el valor de K_M encontrado con la feniletilamina.

De forma similar, la caracterización cinética de T β M se completó usando tiramina protonada y dideuterada. Semejante a D β M, los datos cinéticos apoyan un mecanismo al azar en el que tanto la tiramina como el O₂ pueden unirse primero a T β M reducida. La diferencia más notable entre el mecanismo cinético de D β M y T β M es la inhibición de sustrato observada para la reacción de T β M con tiramina. El patrón de inhibición del sustrato indica que la tiramina puede interactuar con la T β M

oxidada para formar un complejo inhibitor, la inhibición observada y el perfil cinético de T β M sugieren una regulación más estricta de los niveles de neurotransmisores en los insectos.²⁵

1.5.2 Estudios Mutagénicos

Kilnman *et al.* se valieron de estudios mutagénicos para probar la relevancia del residuo de metionina que se une al Cu_M. Las proteínas mutantes T β M se desarrollaron en células *Drosophila S2* en las que el residuo Met471 se reemplazó por residuos Asp, Cys e His. Los resultados de este trabajo indicaron que no hay actividad enzimática cuando Met se sustituye por His y Asp. Sin embargo, se observó reactividad con la proteína Met471Cys, lo que sugiere la importancia del residuo Met en la catálisis. Por lo tanto, los residuos de azufre en la unión del Cu_M son integrales en el mecanismo de las monooxigenasas y debe estudiarse más a fondo en el desarrollo del mecanismo de esta familia de proteínas. Otra conclusión importante de este estudio es la capacidad catalítica de Met471Cys en comparación con T β M normal. El número de ciclos catalíticos fue mucho menor para Met471Cys que para Met471 normal. Esto se debe a la posibilidad del daño oxidativo que puede ocurrir en el grupo tiolato de la Cys, lo cual fue observado durante la reacción.²⁶

1.6 Mecanismos enzimáticos propuestos para las monooxigenasas dependientes de Cu

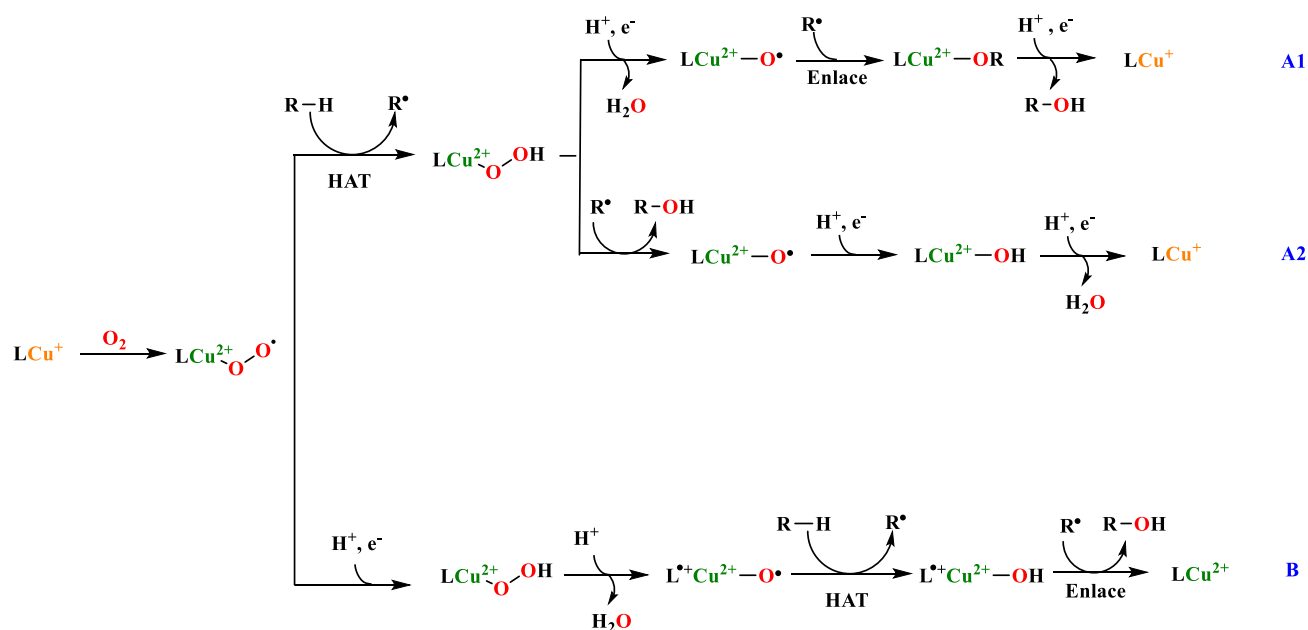
La determinación del mecanismo de reacción por el cual estas enzimas operan es uno de los aspectos más importantes a elucidar, diversos estudios basados en cálculos de estructura electrónica y marcaje isotópico de sustratos y enzimas han permitido obtener información valiosa del (los) posible(s) intermediario(s) reactivo(s), así como un posible mecanismo de reacción. Uno de los pasos clave en las reacciones que esta familia de enzimas cataliza es la abstracción de átomo de hidrógeno que dará lugar al producto hidroxilado y el intermediario reactivo Cu-O₂ que lleva a cabo esta reacción ha sido tema de debate en los últimos años, razón por lo cual se han propuesto al menos tres posibles mecanismos para la activación de O₂ por PHM, D β M y T β M: I) Cu_M(II)-OOH (hidroperoxo); II) Cu_M(II)-O• (cuprilo, formado a partir de la especie hidroperoxo por ruptura homolítica del enlace O-O mediante 1 \bar{e}), y III) Cu_M(II)-O₂⁻ (superoxo).²⁷

Un estudio con D β M usando sustratos que mostraron tres órdenes de magnitud de diferencia en eficiencia catalítica, indicó que la oxidación del sustrato y el consumo de O₂ están estrechamente ligados;²⁸ esto mostró que la misma cantidad de O₂ es consumida con respecto al sustrato hidroxilado, sin importar las diferencias en los sustratos. El mismo comportamiento fue observado con una variante de PHM, la H172A PHM.²⁹ El empleo de marcaje isotópico en O₂ y en los sustratos permitió concluir que la activación de oxígeno y la formación del producto se llevan a cabo de forma acoplada; esto significa que el enlace C-H debe romperse antes de que el enlace O-O se rompa.^{12,30}

Toda esta evidencia apoya la formación del intermediario III. El grupo de Solomon^{31,32} realizó cálculos de estructura electrónica modelando el Cu_M; los autores calcularon los perfiles energéticos para la activación del enlace C-H vía AAH de los complejos Cu_M(II)-OOH, Cu_M(II)-O₂⁻ este último coordinado de forma terminal (η^1) y lateral (η^2) utilizando como sustrato modelo formilglicina (FmG). Los resultados mostraron que el rompimiento homolítico del enlace O-O para formar el intermediario Cu_M(II)-O• a partir del Cu_M(II)-OOH era desfavorable energéticamente, además los cálculos mostraron que la reacción de AAH llevada a cabo por Cu_M(II)-OOH no ocurría. Sin embargo, los dos complejos estudiados tipo Cu_M(II)-O₂⁻ mostraron perfiles energéticos favorables para llevar a cabo AAH desde FmG. El intermediario II ha sido propuesto mediante cálculos computacionales para las enzimas PHM

y D β M,^{33,34} sin embargo esta especie no ha sido observada experimentalmente. Todo lo expuesto anteriormente, así como la estructura cristalina del complejo precatalítico en PHM (sección 1.3, *vide supra*) apunta a la participación de un intermediario Cu-superóxido en las reacciones catalizadas por estas enzimas.

Lo que ocurre después de la formación del intermediario reactivo III también es tema de debate (Esquema 1.4). El mecanismo A1 muestra que una vez formado este, reacciona con el sustrato mediante una reacción de AAH generando el Cu_M(II)-OOH, el cual mediante una reducción por 1e⁻ proveniente del Cu_H y un protón proveniente del medio generaría el intermediario II, liberando una molécula de H₂O; posteriormente el radical orgánico formado se enlaza a este intermediario el cual con H⁺ y un e⁻ del ascorbato da lugar al producto hidroxilado y al sitio activo reducido. La evidencia que apoya la formación del producto después del rompimiento del enlace O-O del intermediario I fue obtenida a través del estudio realizado por Klinman *et al.* donde encontraron que el complejo enzima-sustrato se disocia más rápido cuando el sustrato está sustituido con grupos electroattractores, sugiriendo que el sustrato se enlaza al ión Cu después del enlace del radical formado al intermediario II.⁸ La diferencia entre el mecanismo A1 y A2 (Esquema 1.4) es en el paso de enlace del radical formado, en el mecanismo A2 ocurre después de la formación del intermediario I; esto fue propuesto de acuerdo a los cálculos desarrollados por Chen *et al.*, donde se encontró que el enlace del radical al complejo hidroperoxo es un proceso favorable energéticamente.³¹



Esquema 1.4. Mecanismos de reacción propuestos para las enzimas PHM, D β M y T β M

El mecanismo B fue propuesto con base en el estudio del grupo de Amzel,³³ en el cual reportaron cálculos QM-MM realizados en un modelo de PHM; en este estudio examinaron múltiples especies Cu-O₂ que llevaran a cabo AAH, las especies Cu-superóxido ($\text{Cu}_M(\text{II})\text{-O}_2^{\cdot-}$ y $\text{Cu}_M(\text{I})\text{-O}_2^{\cdot-}$) fueron descartadas debido a que se obtuvieron altos parámetros de activación ($\uparrow 25 \text{ kcal mol}^{-1}$). El $\text{Cu}_M(\text{II})\text{-OOH}$ también se descartó por la misma razón ($\sim 42.8 \text{ kcal mol}^{-1}$). Otras dos especies también se tomaron en cuenta en este estudio $[\text{CuO}]^{2+}$ formada de la protonación y rompimiento heterolítico del enlace O-O, liberando H₂O desde el $\text{Cu}_M(\text{II})\text{-OOH}$ sin la participación de un e⁻ externo y la especie

$[\text{CuO}]^+$. Se encontró que la especie $[\text{CuO}]^{2+}$ fue capaz de llevar a cabo la reacción AAH de forma espontánea ($0.15 \text{ kcal mol}^{-1}$) formando el producto sin la formación del hidroxocomplejo; para el caso de la segunda especie propuesta la energía obtenida fue de $4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Con lo encontrado, los autores sugieren que $[\text{CuO}]^{2+}$ es el intermediario reactivo en las monooxigenasas de Cu. Los autores calcularon que existe una densidad de spin localizada en los ligantes coordinados al Cu, por lo tanto la especie debe considerarse como $[\text{L}^+\text{Cu(II)O}^+]^{2+}$. De esa manera proponen que en el ambiente proteico el radical sobre el ligante podría ser un radical sobre la proteína (quizá un radical tirosilo) en analogía al descrito para citocromo P450 con Fe(IV)-oxo radical catión- π porfirinato.³⁵ Evidencia de la formación del intermediario Cu-superoxo con modelos biomiméticos se discutirá en el capítulo 2.

En conclusión, datos experimentales y de estructura electrónica obtenidos para esta familia de enzimas apoyan la participación de un intermediario tipo Cu-superoxo, o alternativamente un Cu-oxilo. Sin embargo, no se conoce con certeza el mecanismo de reacción por el cual estas enzimas actúan, ni el papel del grupo tioéter (metionina) en la modulación de la reactividad de las enzimas y en sistemas modelo. Por estas razones, existe actualmente un esfuerzo por aportar mayores detalles sobre los grupos tioéter como donadores en esta área de la química, referente a las metaloenzimas monooxigenasas y a sistemas modelo.

Referencias

- (1) Karlin, K. D.; Itoh, S. *Copper-Oxygen Chemistry*, First Ed.; WILEY: New Jersey, **2011**.
- (2) Mirica, L. M.; Ottenwaelder, X.; Stack, T. D. P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1013.
- (3) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563.
- (4) Klinman, J. P. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2541.
- (5) Prigge, S. T.; Kolhekar, A. S.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Amzel, L. M. *Science*, **1997**, *278*, 1300.
- (6) Vendelboe, T. V.; Harris, P.; Zhao, Y.; Walter, T. S.; Harlos, K.; El Omari, K.; Christensen, H. E. M. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, 1.
- (7) Torres Pazmiño, D. E.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M. W. *J. Biotechnol.* **2010**, *146*, 9.
- (8) Klinman, J. P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3013.
- (9) Gray, E. E.; Small, S. N.; McGuirl, M. A. *Protein Expr. Purif.* **2006**, *47*, 162.
- (10) Chufán, E. E.; Prigge, S. T.; Siebert, X.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Amzel, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15565.
- (11) Prigge, S. T.; Mains, R. E.; Eipper, B. A.; Amzel, L. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1236.
- (12) Francisco, W. A.; Merkler, D. J.; Blackburn, N. J.; Klinman, J. P. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8244.
- (13) Prigge, S. T.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Amzel, L. M. *Science* **2004**, *304*, 864.
- (14) Jiang, N.; Kolhekar, A. S.; Jacobs, P. S.; Mains, R. E.; Eipper, B. A.; Taghert, P. H. *Dev. Biol.* **2000**, *226*, 118.
- (15) Owen, T. C.; Merkler, D. J. *Med. Hypotheses* **2004**, *62*, 392.
- (16) Lineweaver, H.; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658.
- (17) Francisco, W. A.; Knapp, M. J.; Blackburn, N. J.; Klinman, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8194.
- (18) Johnson, K. A.; Goody, R. S. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8264.
- (19) 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. G.; Tian, L. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659.
- (20) Zabetian, J. F.; Cubells, C. P. *Psychopharmacology* **2004**, *174*, 463.
- (21) Friedman, S.; Kaufman, S. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 4763.
- (22) Klinman, J. P.; Humphries, H.; Voet, J. G. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 11648.
- (23) Miller, S. M.; Klinman, J. P. *Biochemistry* **1983**, *22*, 3091.

- (24) Miller, S. M.; Klinman, J. P. *Biochemistry* **1985**, *24*, 2114.
- (25) Hess, C. R.; Mcguirl, M. M.; Klinman, J. P. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 3042.
- (26) Hess, C. R.; Wu, Z.; Ng, A.; Gray, E. E.; McGuirl, M. A.; Klinman, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11939.
- (27) Bell, J.; Meskini, R. El; Damato, D.; Mains, R. E.; Eipper, B. A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 7133.
- (28) Evans, J. P.; Ahn, K.; Klinman, J. P. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49691.
- (29) Evans, J. P.; Blackburn, N. J.; Klinman, J. P. *Biochemistry* **2006**, *45*, 15419.
- (30) Tian, G.; Berry, J. A.; Klinman, J. P. *Biochemistry* **1994**, *33*, 226.
- (31) Chen, P.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4991.
- (32) Solomon, E. I.; Ginsbach, J. W.; Heppner, D. E.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Smeets, P. J.; Tian, L.; Woertink, J. S. *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 11.
- (33) Crespo, A.; Martí, M. A.; Roitberg, A. E.; Amzel, L. M.; Estrin, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12817.
- (34) Yoshizawa, K.; Kihara, N.; Kamachi, T.; Shiota, Y. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 3034.
- (35) McQuarters, A. B.; Wolf, M. W.; Hunt, A. P.; Lehnert, N. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 4750.

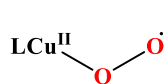
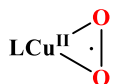
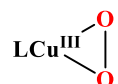
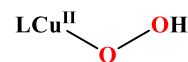
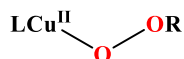
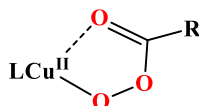
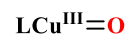
Capítulo 2

SISTEMAS MODELO INSPIRADOS EN EL SITIO ACTIVO DE LAS MONOOXIGENASAS DE COBRE

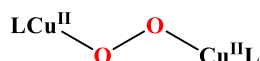
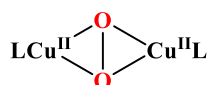
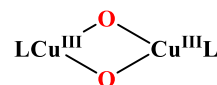
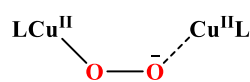
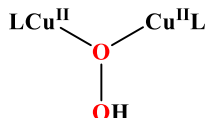
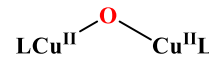
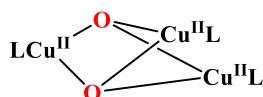
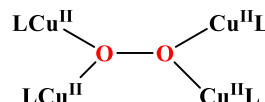
2.1 Introducción

Debido al tamaño y complejidad de la mayoría de las biomoléculas y de los procesos que éstas llevan a cabo, el uso de sistemas modelo con los cuales se pueden llevar a cabo experimentos controlados y probar hipótesis resulta ventajoso. La química bioinorgánica¹ ha sido un área fructífera en el uso de modelos biomiméticos, particularmente cuando participan metales de transición. Desde luego no es posible encontrar o desarrollar modelos adecuados en todos los casos, y esto puede llevar a obtener información cuestionable. En las mejores circunstancias un modelo puede dar solo un panorama parcial de cómo trabajan los sistemas reales. Si estas limitaciones se tienen en cuenta, el sistema modelo puede proveer información valiosa hacia el estudio de sistemas reales. En este sentido, el conocimiento de la química de coordinación de sistemas modelo ha permitido entender la función de los centros metálicos en sistemas biológicos.² Los principios fundamentales y generales acerca del comportamiento de complejos de coordinación, son válidos cuando el metal está coordinado por ligantes sintéticos o por una proteína, donde los grupos alrededor del centro metálico son átomos de oxígeno (O) de grupos carboxilato, átomos de azufre (S) de tioles o tioéteres, o átomos de nitrógeno (N) de aminas y heterociclos nitrogenados.² Además, el uso de herramientas de caracterización como espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis), resonancia paramagnética electrónica (RPE), momento magnético, etc. para obtener información de los iones metálicos presentes en sistemas biológicos son igualmente poderosos cuando se aplican en sistemas más simples.

Debido a la naturaleza efímera de los intermediarios formados en sistemas enzimáticos, los modelos sintéticos han sido utilizados para investigar las especies Cu-O₂ (Esquema 2.1) que son potencialmente responsables de la química observada en las monooxigenasas de Cu. El uso de modelos inorgánicos permite un control preciso y una subsecuente deducción de factores electrónicos y geométricos que gobiernan la estabilidad del aducto Cu-O₂ y su reactividad. La elección cuidadosa del sistema modelo y las condiciones de reacción pueden permitir la generación y caracterización física y química de los intermediarios propuestos.³ La información obtenida de estos experimentos pudiera implicar un intermediario en particular como parte de un ciclo catalítico enzimático o generar información novedosa para procesos conocidos, dicha información no se obtendría de estudios con proteínas en su ambiente natural (condiciones fisiológicas).³

Mononuclearesterminal Cu^{Superoxo}lateral Cu^{Superoxo}lateral Cu^{Peroxo}terminal Cu^{Hidroperoxo}terminal Cu^{Alquilperoxo}lateral Cu^{Acilperoxo}

Cuprilo

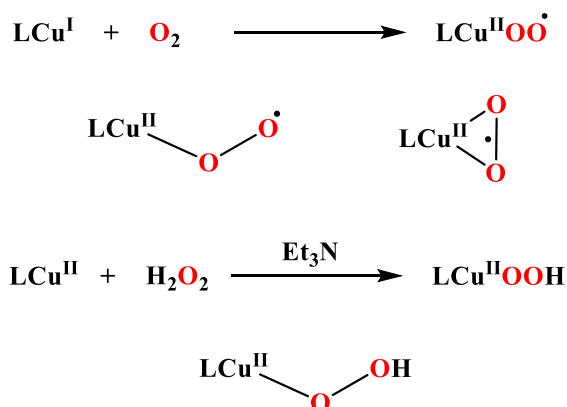
Dinuclearestrans-μ-1,2-peroxo Cu₂μ-η²η² peroxo Cu₂bis-μ-oxo Cu₂cis-μ-1,2-peroxo Cu₂μ-η¹η¹ hidroperoxo Cu₂oxo Cu₂*Multinucleares*Cu₃O₂peroxo Cu₄Esquema 2.1. Complejos Cu-O₂ obtenidos con sistemas biomiméticos

2.2 Sistemas modelo de las monooxigenasas de Cu

Una de las metas primarias en el estudio de las metaloenzimas de Cu es entender el efecto de los átomos donadores presentes en los sitios activos sobre su reactividad, los intermediarios que se forman y los detalles mecanísticos en la activación de O₂ y reacciones de hidroxilación.⁴ En este contexto, uno de los primeros pasos propuestos en la activación de O₂ es la formación de un aducto Cu-O₂, cuya factibilidad es dependiente de factores termodinámicos y cinéticos.⁵ El ambiente de coordinación alrededor del Cu es determinante para la estabilidad del aducto formado, los factores para conferir estabilidad son: la identidad de los átomos donadores, la geometría de coordinación, y los efectos estéricos y electrónicos de los sustituyentes. La disponibilidad de un sitio de coordinación para enlazar O₂, aunado a un impedimento estérico en los grupos sustituyentes del ligante, es igualmente importante, ya que tiene un notable efecto cinético sobre la velocidad de coordinación del O₂ hacia el Cu. El papel que desempeña el disolvente es significativo, dado que la disponibilidad de un sitio de

coordinación sobre el metal es dependiente de la capacidad donadora del disolvente; la estabilidad del aducto es influenciada por su interacción con el disolvente. Los elementos que ofrecen protección al aducto para evitar su descomposición o inhibir un ataque de un ión de Cu secundarios o algunos otros componentes que ocasionan una fácil descomposición del aducto Cu-O₂.⁵ La combinación de estos factores, además del potencial redox, determinan si la reacción entre un complejo de Cu y O₂ es factible y si el aducto Cu-O₂ es lo suficientemente estable como para caracterizarlo espectroscópicamente o incluso aislarlo.

De acuerdo a lo anterior, en años recientes se han diseñado modelos inorgánicos que permiten estudiar las propiedades espectroscópicas y electrónicas de aductos Cu-O₂.⁶ Esta estrategia ha generado conocimiento acerca de la química de las especies Cu-O₂ y su función en sistemas biológicos, lo cual reditúa en la síntesis de complejos biomiméticos y el diseño de experimentos que proporcionan información de las especies reactivas de O₂ que participan en reacciones de oxidación selectivas. Actualmente existe particular interés en el estudio de las enzimas dopamina-β-monooxigenasa (DβM), peptidilglicina-α-hidroxilante (PHM) y tiramina-β monooxigenasa (TβM),⁷ debido a la presencia de donadores tioéter que normalmente se consideran sensibles a la oxidación. Las metodologías empleadas para estabilizar y caracterizar especies formadas a partir de la oxigenación de complejos de Cu⁺ incluyen: bajas temperaturas (-80 °C), disolventes apróticos (THF, acetona) y aniones débilmente coordinantes como triflato (CF₃SO₃⁻ = OTf) y perclorato (ClO₄⁻). Las bajas temperaturas aumentan el tiempo de vida de las especies inicialmente formadas reduciendo el costo entrópico de formación y atenuando subsecuentes reacciones.⁸⁻¹⁰ Esta estrategia ha dado lugar a la caracterización de especies termosensibles con estequiometrias de reacción Cu-O₂ de 1:1, 2:1 y 3:1 Esquema 2.1.¹¹ Para el caso particular de este trabajo se discutirá la obtención y caracterización de complejos de Cu activantes de O₂ con estequiometría 1:1, específicamente los complejos tipo superoxo e hidroperoxo y se discutirá la especie “cuprilo” debido a que se ha propuesto como posible intermediario en el mecanismo de reacción de estas enzimas (Capítulo 1). Las reacciones utilizadas para la obtención de estos complejos se muestran en el Esquema 2.2.



Esquema 2.2. Reacciones para obtener aductos Cu-O₂

2.3 Sistemas modelo Cu-superoxo

Estudios experimentales y computacionales llevados a cabo en sistemas modelo y/o en enzimas apuntan a la participación de un intermediario tipo Cu-superoxo. El ligante superóxido a su vez puede presentar dos modos de enlace, a través de un átomo de oxígeno (terminal, η¹) o a través de los dos (lateral, η²); se han reportado sistemas modelo tipo Cu(II)-O₂⁻ con ambos modos de coordinación

(Tabla 2.1).³ Aunado a esto, el estudio de cristalografía del complejo precatalítico en PHM reveló que el O₂ estaba enlazado como superóxido terminal al Cu_M; las distancias de enlace obtenidas a partir de la estructura cristalina sugieren que el complejo Cu-superóxido podría formarse durante el ciclo catalítico.¹² Los resultados obtenidos hasta antes de este trabajo (ver Capítulo 4) con sistemas modelo indicaban que los complejos tipo superóxido enlazados de forma lateral presentan estado basal singlete y no son reactivos hacia activación de enlaces C-H, mientras que los coordinados de forma terminal se encuentran en estado electrónico triplete; éstos complejos han sido reportados como agentes de AAH electrofílica con sustratos con enlaces débiles C-H (70.7 – 73.7 kcal mol⁻¹) y O-H (69.4 – 82.3 kcal mol⁻¹).¹³ En la Tabla 2.1 se presentan las características reportadas del ligante superóxido coordinado a Cu hasta antes de lo informado en este trabajo, *vide infra*.

Tabla 2.1. Características del ligante superóxido coordinado a Cu observadas con sistemas modelo

Modo de coordinación	Estado electrónico	Reactividad
Terminal (η^1)	Triplete	Electrófilo (AAH)
		Nucleófilo (Base)
Lateral (η^2)	Singlete	No Reactivo

La generación de complejos Cu(II)-O₂^{•-} estables requiere de un cuidadoso equilibrio en las propiedades termodinámicas y cinéticas del sistema en cuanto al enlace y liberación de O₂ y obtención de complejos dinucleares tipo μ -peroxo y bis- μ -oxo. Los primeros sistemas modelo con los cuales se probaron reacciones de complejos de Cu(I) frente a O₂ dieron lugar a la formación de complejos dinucleares,¹⁴ mientras que modificaciones posteriores permitieron la modulación de las propiedades electrónicas para dar lugar a la formación y caracterización de complejos mononucleares tipo superóxido Cu(II)-O₂^{•-}.

2.3.1 Sistemas Cu(II)-O₂^{•-} con ligantes tripodales tetradentados N₄

Los primeros intentos de modelar a las monooxigenasas dependientes de Cu condujeron a la síntesis de ligantes tripodales tetradentados que incluyen en su estructura grupos donadores de N como amina, piridilo, imidazoilo y pirazoilo, de manera análoga a las histidinas presentes en el Cu_M.⁶ Los ligantes que cumplen estas características (Figura 2.1) dan lugar a la formación de complejos Cu-O₂ dinucleares tipo peroxo y bis- μ -oxo, así como algunos mononucleares η^1 Cu(II)-O₂^{•-}.

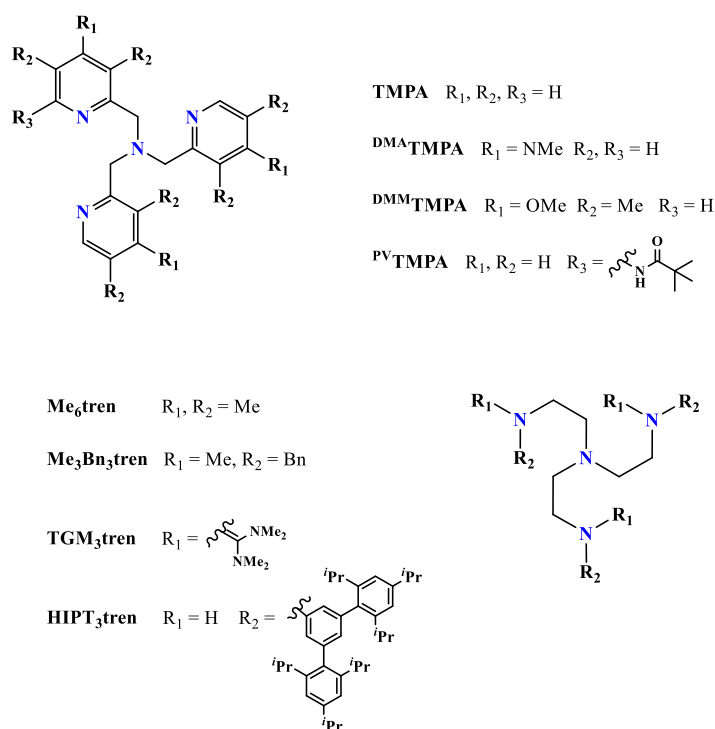


Figura 2.1. Ligantes tripodales tetadentados N₄

El grupo de Karlin exploró la reactividad de complejos de Cu(I) frente a O₂ con el ligante TMPA (tris-[2-piridilmetil]amina), encontrando la formación de complejos dinucleares tipo trans-μ-1,2-peroxo Cu₂ debido a la estabilidad termodinámica de aductos Cu-O₂ con estequiometría 2:1.¹⁵ Debido a esto los autores sintetizaron derivados del ligante TMPA modulando las propiedades electrónicas mediante la variación de los sustituyentes en el anillo de piridina en las posiciones 3, 4 y 5. El derivado DMA-TMPA¹⁶ incluye grupos dimetilamino en la posición 4 del anillo de piridina, el estudio de voltamperometría cíclica (Tabla 2.2) reveló que este ligante modula el potencial de media onda ($E_{1/2}$) del par redox Cu^{2+/+} a valores casi 400 mV más negativos que el ligante TMPA (-700 y -420 mV vs Fc⁺/Fc respectivamente), lo que indica que es más donador de electrones que TMPA y por esta razón estabiliza mejor al Cu(II) que es el estado de oxidación en complejos tipo Cu(II)-O₂⁻. Al explorar la reactividad de complejos de Cu(I) frente a O₂ (Esquema 2.2), los autores emplearon el complejo de Cu(I) aislado con una molécula de CO de fórmula [Cu^I(DMA-TMPA)(CO)]⁺: a una disolución de THF de dicho complejo se le burbujeo O₂ a -85 °C, lo que dio lugar a una disolución verde. La especie no mostró señal en RPE, mientras que la espectroscopía Raman resonante (rR) confirmó el intermediario como [Cu^{II}(DMA-TMPA)(O₂⁻)]⁺ coordinado de forma terminal (las características espectrales de varios sistemas modelo tipo superoxo se muestran en la Tabla 2.3). La adición de diferentes sustratos orgánicos a -85 °C así como experimentos empleando marcaje isotópico (¹⁸O) revelaron la oxidación de 2,6-diterbutilfenol (2,6-DTF), cuyos productos fueron identificados como 2,6-ditertbutil-1,4-benzoquinona (2,6-DT-1,4-BQ) y 2-hidroxiperoxil-4-OMe-6-tertbutilfenol mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) la cual también concluyó que el oxígeno insertado proviene de la molécula de O₂.¹⁶

El ligante DMM-TMPA¹⁷ que posee grupos metilo en posición 3 y 5 y un grupo metoxilo en la posición 4 del anillo de piridina, se espera que al poseer estos sustituyentes una menor donación hacia el anillo de piridina que el DMA-TMPA, lo cual es congruente con el valor de $E_{1/2}$ Cu^{2+/+} = -570 mV. Los autores

probaron la reactividad del complejo de Cu(I) frente a O₂ utilizando la misma metodología que con el derivado ^{DMA}TMPA, aislando el complejo con CO coordinado a -90 °C. Encontraron evidencia de la formación de una especie Cu(II)-O₂^{·-} superoxo terminal, con tiempo de vida media t_{1/2} = 3 h, y se probó la capacidad de activación de enlaces C-H utilizando los mismos sustratos (*p*-X-2,6-DTF; X =OCH₃, ^tBu), encontrando la formación del radical fenoxilo con una banda de transferencia de carga cerca de 400 nm y una señal en RPE con valor g ~ 2. Los productos finales de las reacciones a baja temperatura fueron analizados utilizando GC-MS, en todos los casos el producto mayoritario fue la 2,6-DT-1,4-BQ); los experimentos de EIC utilizando *p*-OCD₃ y *p*-CD₃ 2,6-DTF revelaron un mecanismo de AAH.

Tabla 2.2. Potenciales de media onda Cu^{2+/+} en CH₃CN vs Fc^{+/0}

Ligante	^{DMA} TMPA	^{DMM} TMPA	^{PV} TMPA	TMPA
<i>E</i> _{1/2} (mV)	-700	-570	-520	-420

Otro derivado del ligante TMPA el ^{PV}TMPA,¹⁸ inspirado en un ligante desarrollado por Masuda y colaboradores con el cual los autores lograron la caracterización en estado sólido de un complejo mononuclear tipo hidroperoxo, incorpora en su estructura un grupo capaz de estabilizar intermediario de oxígeno formado mediante un enlace de hidrógeno (PV = pivalamida). La oxigenación de una disolución en 2-MeTHF del complejo de Cu(I) con dicho ligante a -125 °C reveló la formación de un complejo tipo superoxo terminal, la caracterización por rR mostró valores de ν O-O = 1130 cm⁻¹ y ν Cu-O = 482 cm⁻¹; cálculos de estructura electrónica para este sistema revelaron que el grupo NH en el sustituyente pivalamido forma un enlace de hidrógeno intramolecular con cualquiera de los átomos de O₂. Estos resultados revelaron también un incremento en la energía de vibración de enlace relativo a uno que no presente el enlace de hidrógeno, además se esperaba que cuando el enlace de hidrógeno del grupo NH se encuentre apuntando a el átomo de oxígeno más alejado se observa el mayor incremento. El complejo [Cu^{II}(^{PV}TMPA)(O₂^{·-})]⁺ no reaccionó frente a diferentes sustratos (dihidroantraceno = DHA; xanteno, acridina = AcrH₂), mientras que la adición de 1-bencil-1,4-dihidronicotinamida (BNAH) hizo desaparecer la banda de transferencia de carga del complejo superoxo y dio lugar a las señales asociadas a la formación de un complejo *trans*-μ-1,2-peroxo Cu₂.

Schindler y colaboradores reportaron la síntesis del ligante tripodal tetradentado alifático triaminetilenamina (tren), modificado con diferentes sustituyentes (Figura 2.1). La oxigenación del complejo de Cu(I) con el ligante TMG₃tren¹⁹ (sustituido con grupos tetrametilguanidina) a -70 °C en acetona dio lugar a la formación de la especie [Cu^{II}(TMG₃tren)(O₂^{·-})]⁺ en disolución de coloración verde intenso, la cual mostró un comportamiento reversible; dicha formulación fue comprobada mediante espectroscopía rR y mediante la determinación de la estructura cristalina por difracción de rayos X. Cálculos de estructura electrónica (DFT), dicroísmo circular magnético a temperatura y campo variable (TVHV-DCM) y resonancia magnética nuclear a temperatura variable (VT-RMN) concluyeron que el complejo [Cu^{II}(TMG₃tren)(O₂^{·-})]⁺ presenta un estado electrónico triplete, S = 1.²⁰ El estudio de reactividad frente a sustratos orgánicos reveló la formación de los mismos productos que los obtenidos con el ligante TMPA y sus derivados.²¹ El mismo grupo de investigación reportó la obtención y caracterización de un complejo tipo superoxo terminal con el ligante Me₆tren, encontrando que la oxigenación a -60 °C en propionitrilo (EtCN) generaba la especie dinuclear tipo peroxo.²² Al disminuir la temperatura a -90 °C la especie generada fue el complejo [Cu^{II}(Me₆tren)(O₂^{·-})]⁺, comprobado por rR. Llama la atención que el mismo experimento en acetona como disolvente da lugar

al intermediario superoxo más rápido y estable, lo que los autores atribuyen a una disminución en la competencia del disolvente frente a O_2 como ligantes frente a $Cu(I)$.²³

Suzuki *et al.* utilizaron un ligante base tren con modificaciones en los grupos amino: el derivado Me_3Bn_3tren ²⁴ (Figura 2.1) evidenció la formación de un complejo tipo superoxo terminal en acetona a $-90\text{ }^\circ\text{C}$. Dicha especie se transforma en una especie tipo peroxo al burbujear Ar, como se verificó por rR. Por otro lado el diseño del ligante $HIPT_3tren$ fue reportado por Itoh y colaboradores;⁸ la incorporación de los grupos $HIPT = \text{hexaisopropilterfenilo}$ impide la formación de aductos dinucleares $Cu-O_2$. El complejo de $Cu(I)$ se oxigenó a $-90\text{ }^\circ\text{C}$ en acetona, generando una disolución de coloración verde intenso asignada como $[Cu^I(HIPT_3tren)(O_2^{\cdot-})]^+$ mediante rR; el estudio de las propiedades magnéticas de este especie reveló un estado electrónico triplete.²⁵

2.3.2 Sistemas $Cu(II)-O_2^{\cdot-}$ con ligantes tetradentados aniónicos N_3O^-

El grupo de investigación de Tolman reportó el primer complejo cúprico-superoxo utilizando un ligante tetradentado aniónico con un sustituyente fenolato (Figura 2.2) que mimetiza el sitio activo de la enzima galactosa oxidasa.²⁶ El complejo superóxido $[Cu^{II}(TACN^{PhO})(O_2^{\cdot-})]^+$ resultó de la oxigenación del complejo de $Cu(I)$ en THF a $-50\text{ }^\circ\text{C}$, esta especie fue caracterizada por espectroscopía UV-vis, rR y RPE, mientras que el marcaje isotópico con $^{18}O_2$ y cálculos DFT revelaron que el modo de coordinación del superóxido es lateral, siendo el primer ejemplo de un complejo η^2 cúprico-superoxo.²⁷

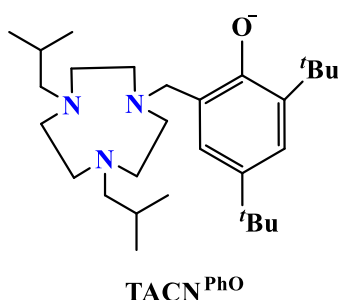


Figura 2.2. Ligante aniónico tetradentado N_3O^- TACN^{PhO}

2.3.3 Sistemas $Cu(II)-O_2^{\cdot-}$ con ligantes aniónicos N_3

La primera estructura en estado sólido obtenida para un complejo tipo cúprico-superoxo fue reportada por Kitajima y colaboradores en 1994 utilizando el ligante voluminoso hidro(trispirazoil)borato $HB(3-tBu-5-tPrpz)_3$ (Figura 2.3) con grupos tertbutilo que previenen la formación de complejos $Cu-O_2$ dinucleares.²⁸ La especie $[Cu^{II}(HB(3-tBu-5-tPrpz)_3)(O_2^{\cdot-})]^+$ fue obtenida al burbujear O_2 en una disolución del complejo de $Cu(I)$ en CH_2Cl_2 a $-50\text{ }^\circ\text{C}$. La especie fue caracterizada mediante espectroscopía 1H -RMN a $-40\text{ }^\circ\text{C}$, evidenciando un estado diamagnético. El estudio de susceptibilidad magnética mediante un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID por sus siglas en inglés) reveló un estado electrónico singlete para el complejo, *i.e.* $S = 0$. La estructura cristalina de este intermediario mostró al ligante superóxido coordinado de forma lateral hacia el Cu , $\eta^2-O_2^{\cdot-}$ con distancias de enlace $Cu-O$ de 1.84 \AA y $O-O$ de 1.22 \AA .

Una década después Fujisawa *et al.* reportaron la síntesis y caracterización de un complejo que contenía en su estructura un ligante derivado del reportado por Kitajima, el HB(3-Ad-5-*i*Prpz)₃ con grupos adamantilo reemplazando a los grupos tertbutilo. La caracterización mediante UV-vis del complejo cúprico-superoxo no mostró las bandas de absorción intensa que mostró el complejo reportado por Kitajima. En este estudio la estructura electrónica del complejo [Cu^{II}(HB(3-*i*Bu-5-*i*Prpz)₃)(O₂⁻)]⁺, así como su caracterización espectroscópica fue detallada, los resultados mostraron que el ion Cu y el ligante superoxo presentan una fuerte interacción covalente debido al acoplamiento magnético de los spines desapareados en el Cu(II) y en el radical anión superoxo.²⁹

El grupo de investigación de Tolman¹³ reportó la síntesis de un complejo cúprico-superoxo obtenido a partir de la adición de supéroxido de potasio a un complejo de Cu(II) con el ligante aniónico N,N-bis(2,6-diisopropilfenil)-2,6-piridindicarboxiamida (PDCA Figura 2.3), el complejo [Cu^{II}(PDCA)(O₂⁻)]⁺ se observó en una mezcla 1:1 DMF:THF a -80 °C, descomponiéndose a -60 °C. El complejo fue caracterizado mediante espectroscopías UV-vis, rR, RPE y ¹H-RMN, lo que confirmó una especie con el superoxo enlazado de forma terminal en estado triplete, lo cual se corroboró mediante cálculos DFT. Curiosamente el complejo [Cu^{II}(PDCA)(O₂⁻)]⁺ no mostró una reactividad electrófila frente a fenoles de manera análoga a otros complejos superoxo previamente reportados (*vide supra*), al contrario, los autores reportaron que dicho complejo podría reaccionar como una base y responsabilizan de este tipo de reactividad a la naturaleza del ligante. En un estudio reciente McDonald y colaboradores³⁰ probaron la reactividad nucleofílica del complejo cúprico-superoxo, encontrando que el complejo reacciona con cloruros de acilo para formar el correspondiente ácido carboxílico y con algunos aldehídos mediante deformilación. Los mecanismos propuestos para esta reactividad involucran la participación de un intermediario tipo Cu(III)OOR. Este es el primer ejemplo de un complejo cúprico-superoxo que actúa como nucleófilo.

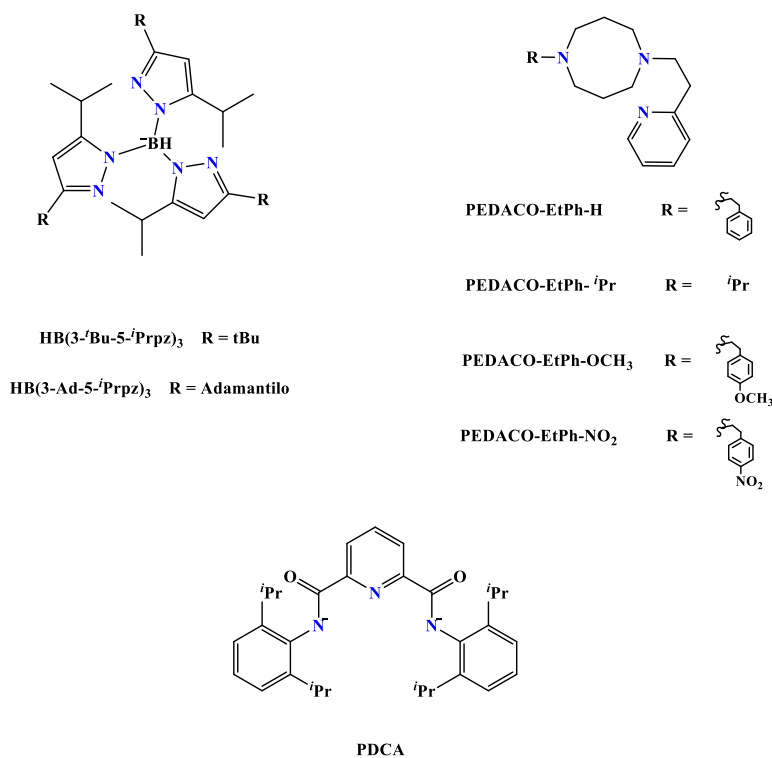
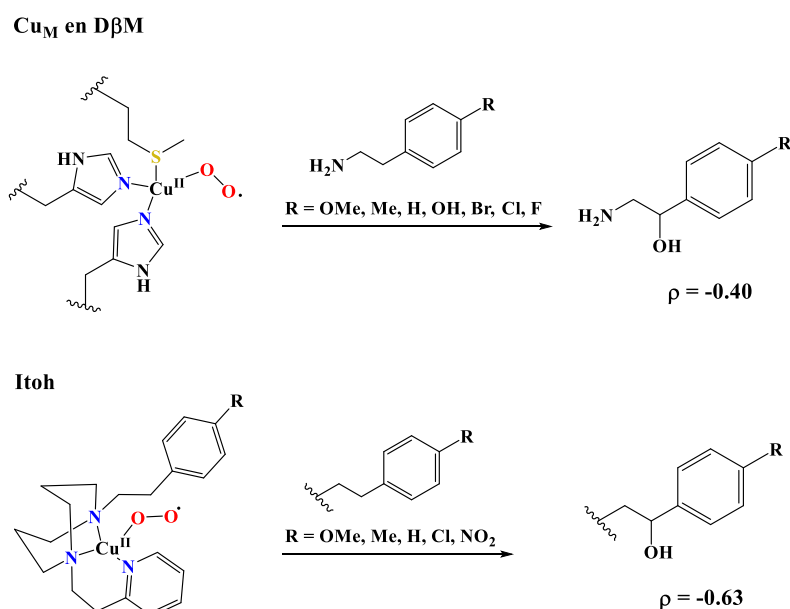


Figura 2.3. Ligantes tridentados aniónicos y neutros N₃

2.3.3 Sistemas Cu(II)-O₂⁻ con ligantes neutros N₃

Itoh *et al.* reportaron una serie de ligantes neutros tridentados N₃ con los cuales obtuvieron complejos cúpricos-superoxo caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas para comprobar dicha formulación; los autores proponen una geometría tetracoordinada (sin la participación del disolvente) y dichos complejos mostraron hidroxilación intramolecular alifática (FE C-H etilbenceno = 85.4 kcal mol⁻¹), con valores de parámetro de Hammett ρ muy similares a los reportados para la D β M (Esquema 2.3).^{6,31,32} A diferencia de otros ligantes empleados anteriormente para estabilizar complejos Cu(II)-O₂⁻, los ligantes PEDACO-EtPh (2-piridil-2-etil-1,5-diazaciclooctano) no contienen en su estructura grupos funcionales electrodonadores, grupos voluminosos (impedimento estérico) ni grupos que provean enlaces de hidrógeno (*vide supra*); la relevancia de la diamina contenida en el ciclo de ocho miembros en la estabilización y reactividad de los complejos superoxo formados radica en la configuración geométrica precisa del ligante macrocíclico. Al cambiar el tamaño o composición del anillo que contiene la diamina, aumentarlo o cambiar un átomo de N por uno de S, da lugar a la formación de complejos de Cu(I) que presentaron una reactividad completamente distinta frente a O₂, o incluso que no reaccionan.^{33,34}



Esquema 2.3. Comparación de los estudios de reactividad de la enzima D β M y los sistemas modelo Cu-superoxo con el ligante PEDACO-EtPh-R

2.3.4 Sistemas Cu(II)-O₂⁻ con ligantes mixtos N₂S y N₃S

Modelar complejos mononucleares de Cu que incorporen en el ligante átomos donadores mixtos que se asemejen al sitio activo 2-His-1-Met de las monooxigenasas PHM, D β M y T β M es de gran interés debido a la similitud estructural con estos sistemas biológicos, aunado a la información que se puede obtener sobre la función del grupo tioéter en Cu_M.

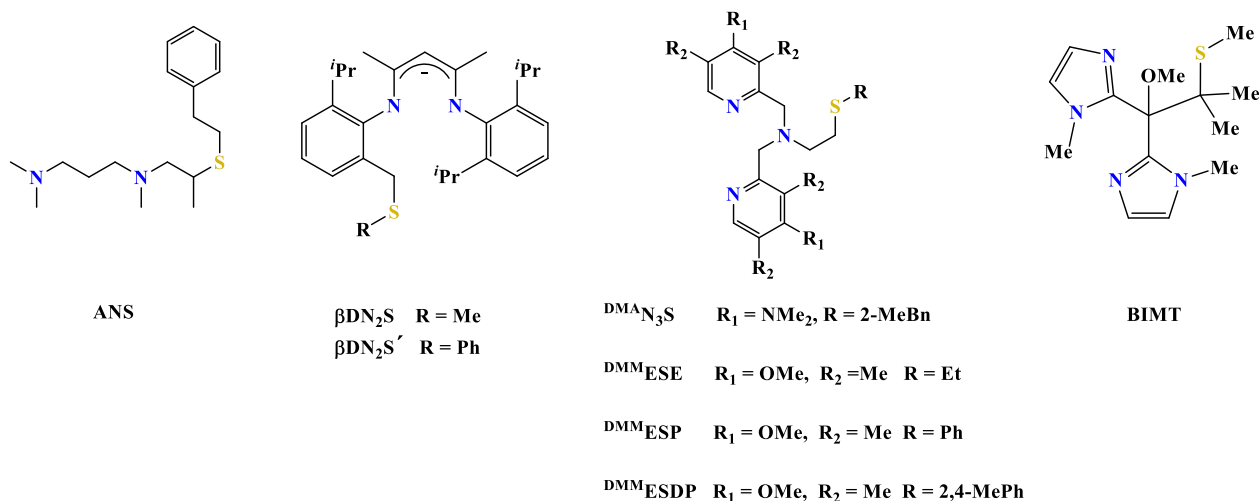


Figura 2.4. Ligantes mixtos N_XS, X = 2 y 3

Los sistemas modelo reportados con donadores N₂S (Figura 2.4) incluyen los sistemas con ligantes β-dicetoiminato (β-DN₂S) desarrollados por Tolman³⁵ y el ligante ANS reportado por Karlin *et al.*³⁶ La reactividad frente a O₂ que se encontró cuando se hacía reaccionar con los correspondientes complejos de Cu(I) fue la formación de especies tipo bis-μ-oxo y μ-η²,η²-peroxo respectivamente. Otro ligante que se inspiró en el sitio activo de las monooxigenasas dependientes de Cu fue el sintetizado por el grupo de Nicholas denominado BIMT,³⁷ que es similar a la estructura del Cu_M encontrado en las enzimas, incorpora 2 grupos imidazoles y un grupo tioéter. Sin embargo, cuando se exploró la reactividad de el complejo de Cu(I) frente a O₂ se encontró la formación de un complejo dinuclear de Cu donde los ligantes actuaban como puentes y el sustituyente tioéter se oxidaba.

En 2014 el grupo de Karlin³⁸ reportó una serie de ligantes inspirados en el Cu_M de las enzimas PHM, DβM y TβM. Dichos ligantes tripodales se derivan de TMPA reemplazando uno de los brazos de piridina por un grupo tioéter (N₃S); los sistemas ^{DMM}N₃S dieron lugar a la formación de aductos de Cu-O₂ dinucleares, trans-μ-1,2-peroxo y bis-μ-oxo. Sin embargo, al incorporar grupos electrodonadores en los anillos de piridina, el ligante ^{DMA}N₃S, con el cual los autores reportaron la formación de un complejo [Cu^{II}(^{DMA}N₃S)(O₂⁻)]⁺ obtenido en 2-MeTHF a -135 °C, el cual se convertía rápidamente a [Cu^{II}(^{DMA}N₃S)(O₂²⁻)]²⁺; los autores reportaron que en una mezcla 4:1 trifluoroetanol (TFE):2-MeTHF el complejo cúprico-superoxo es estable. Al probar la reactividad del complejo formado después de la oxigenación frente a *p*-OMe-2,4-DTF y AcrH₂ formó los productos benzoquinona y acridona;³⁹ cabe resaltar que este último trabajo fue reportado simultáneamente con lo informado en esta tesis doctoral.

Tabla 2.3. Características espectrales de complejos modelo cúprico-superoxo

Ligante	Modo de coordinación	UV-vis: λ , nm (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)	rR: $\nu(\text{O-O})$, cm ⁻¹ ($\Delta(^{18}\text{O})$)	rR: $\nu(\text{Cu-O})$, cm ⁻¹ ($\Delta(^{18}\text{O})$)
TMPA	η^1	410 (4000), 747 (1000)	N.R.	N.R.
^{DMA} TMPA	η^1	418 (4300), 615 (1100), 767 (840)	1121 (-63)	472 (-20)
^{DMM} TMPA	η^1	409 (4250), 587 (1100), 743 (1030)	1121 (-63)	474 (-18)
^{PV} TMPA	η^1	410 (3700), 585 (900), 741 (1150)	1130 (-63)	482 (-20)
TMG ₃ tren	η^1	448 (3400), 676, 795	1120 (-63)	435 (-20)
Me ₆ tren	η^1	412 (4800)	1122	N.R.
Me ₃ Bn ₃ tren	η^1	416 (5400), 591 (1640), 737 (2340)	1120 (-61)	474 (-20)
HIPT ₃ tren	η^1	434 (3850), 549 (1350), 675 (1910), 790 (3520)	1096 (-67)	459 (-17)
HB(3- ^t Bu- 5- ⁱ Prpz) ₃	η^2	352 (2330), 510 (230), 660	1112 (-52)	554 (-20)
HB(3-Ad- 5- ⁱ Prpz) ₃	η^2	383, 452, 699, 980	1043 (-59)	N. R.
TACN ^{PhO}	η^2	416 (4600), 654 (1800)	1120 (-62)	450 (-8), 422 (-5)
PDCA	η^1	627 (1700)	1104 (-60)	N. R.
PEDACO- EtPh-OCH ₃	η^1	397 (4550), 570 (865), 705 (1250)	N.R.	N.R.
PEDACO- EtPh-H	η^1	397 (4200), 570 (850), 705 (1150)	1033 (-65)	457 (-15)
PEDACO- EtPh-NO ₂	η^1	397 (4150), 570 (790), 705 (1025)	N.R.	N.R.
PEDACO- EtPh- ⁱ Pr	η^1	395 (5810), 585 (980), 723 (1240)	N.R.	N.R.
^{DMA} N ₃ S	η^1	418, 605, 743	1117 (-61)	472 (-20)

Es importante mencionar que los complejos cúprico-superoxido reportados hasta el momento dejan preguntas abiertas, comenzando por la modulación electrónica del grupo tioéter tanto en las enzimas como en sistemas modelos. También falta por establecerse completamente la importancia de grupos que forman enlaces de hidrógeno para estabilizar sistemas Cu(II)-O₂⁻ en la segunda esfera de coordinación. Finalmente, hace falta información para corroborar la conjetura de que los complejos con potencial redox alto (más positivo) dan lugar a la formación de complejos cúprico-superoxido más reactivos (AAH electrofílica).³ Las respuestas a lo anterior es tema de investigación para conocer y entender la química fundamental del Cu-O₂ y su papel en sistemas biológicos.

2.4 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo

El intermediario Cu(II)-OOH ha sido propuesto como la especie responsable de la reacción de hidroxilación en las monooxigenasas de Cu, durante las primeras investigaciones acerca del

mecanismo de acción llevado a cabo por esta familia de enzimas.⁷ Por ello, la síntesis y reactividad de complejos de este tipo fue estudiada utilizando complejos modelo. Sin embargo, estudios experimentales en conjunto con datos computacionales señalan que la especie Cu(II)-OOH no es el intermediario reactivo en estas enzimas.⁴⁰ La obtención de complejos mononucleares tipo Cu(II)-OOH se logra a partir de complejos de Cu(I) y O₂, donde inicialmente se forma el intermediario Cu(II)-O₂⁻ el cual lleva a cabo la reacción de AAH desde sustratos externos; sin embargo, en la mayoría de los casos la reacción de transferencia electrónica (TE) seguida de la protonación (H⁺) o la transferencia formal de átomos de hidrógeno (H^{*}) desde sustratos externos en complejos cúpricos-superoxo es difícil de controlar. Una alternativa es la reacción de complejos de Cu(II) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de una amina pobremente coordinante como base para abstraer el protón de H₂O₂ (Esquema 2.2).¹¹

2.4.1 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo con ligantes tripodales tetradentados N₄

Karlin *et al.* reportaron una serie de ligantes derivados del ligante TPA con grupos sustituyentes que funcionan como sustratos internos para examinar la reactividad de la especie activa de oxígeno generada en la reacción de complejos de Cu(II) y H₂O₂ (Figura 2.5). En el caso del ligante ^tBP TPA ('BP = 4-*t*Bufenilo), se hizo reaccionar el complejo de Cu(II) con 5 equivalentes (eqv.) de H₂O₂ en presencia de Et₃N a -80 °C en acetona, lo que dio lugar a una banda de absorción detectada por UV-vis en λ = 380 nm (ε = 1500 M⁻¹ cm⁻¹). La caracterización de esta especie por RPE es congruente con un centro paramagnético de Cu en geometría axial con valores g_{||} = 2.245, g_⊥ = 2.042 y A_{||} = 180 G. Adicionalmente la especie se caracterizó por espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI-MS) y utilizando ¹⁸O sugieren la formación del complejo tipo [Cu(II)(^tBP TPA)OOH], aunque no se cuenta con datos de espectroscopía rR. En la mezcla de reacción se encontró el ligante aromático hidroxilado en la posición orto del grupo ^tBP en un 20 % como producto.⁴¹

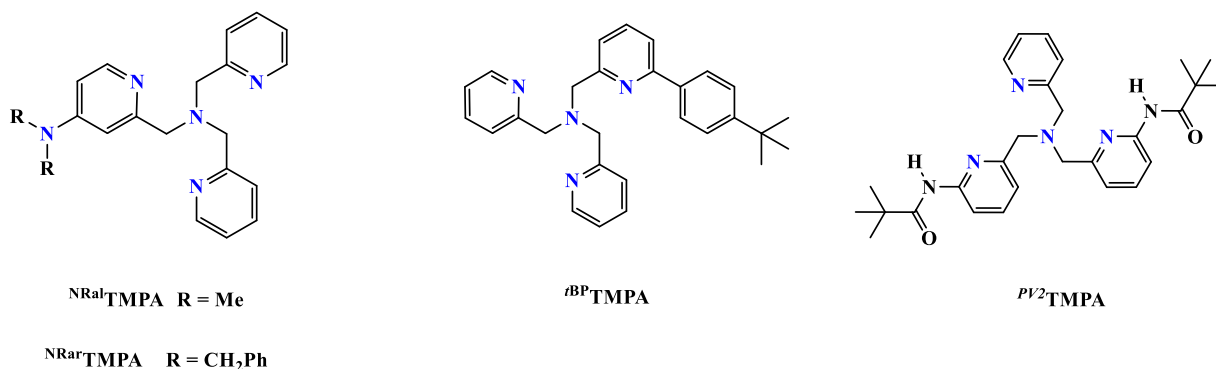


Figura 2.5. Ligantes tripodales tetradentados N₄

La reacción de los complejos de Cu(II) con los ligantes NR^xTPMA^{42,43} (Figura 2.5) y H₂O₂ generó intermediarios tipo Cu(II)-hidroperoxo de acuerdo a la caracterización por UV-vis (λ = ~ 380 nm, ε = 1400 M⁻¹ cm⁻¹); en estos casos los productos de N-dealquilación oxidativa fueron recuperados en un 50 %.

En 1998 Masuda y colaboradores⁴⁴ aislaron un complejo cúprico-hidroperoxo que contiene un ligante que estabilizaba esta estructura por una interacción tipo enlace de hidrógeno (^{PV2}TPMA); este fue el

primer reporte de una estructura en estado sólido de un complejo mononuclear tipo hidroperoxo. Las distancias de enlace encontradas en la estructura fueron O-O = 1.46 Å y Cu-O = 1.88 Å.

2.4.2 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo con ligantes tridentados N₃

El grupo de Masuda⁴⁵ reportó la obtención de un complejo cúprico-hidroperoxo con el ligante bis(picolil-tertbutil) amina (BP'BuN, Figura 2.6), el cual fue obtenido a partir de la reacción del complejo de Cu(II) con MeOH completando la esfera de coordinación frente a H₂O₂/Et₃N. Los autores reportaron la oxidación de sulfuros a sulfonas con el complejo [Cu(II)(BP'BuN)MeOH]²⁺, aunque no presentaron evidencia directa de la transferencia de átomo de oxígeno (TAO) a partir del complejo hidroperoxo.

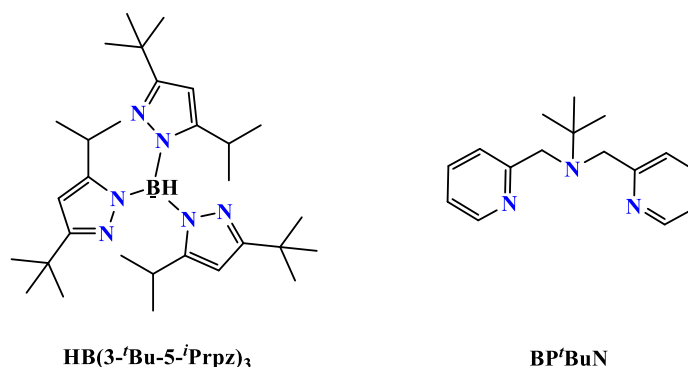


Figura 2.6. Ligantes tridentados N₃

Chen *et al.*⁴⁶ reportaron la obtención de un complejo cúprico hidroperoxo con el ligante desarrollado por Kitajima (HB(3-^tBu-5-ⁱPrpz)₃); los autores obtuvieron este complejo haciendo reaccionar el complejo de Cu(II) a -50 °C en ^tBu-benceno con H₂O₂. Dicho complejo presentó los parámetros característicos de un centro de Cu en geometrías axial, y la caracterización mediante espectroscopía rR evidenció la ν O-O (¹⁸O) = 843 (44) cm⁻¹ y ν Cu-O = 624 (17) cm⁻¹.

2.4.3 Sistemas modelo Cu-hidroperoxo con ligantes mixtos N₃S

Kodera *et al.* utilizaron el ligante N₃SAr⁴⁷ (Figura 2.7) para la obtención de un complejo cúprico-hidroperoxo, demostrando que el enlace de tioéter al centro metálico estabiliza la interacción con el ligante hidroperoxo. Sin embargo, la reactividad de este complejo frente a sustratos externos no fue explorada.

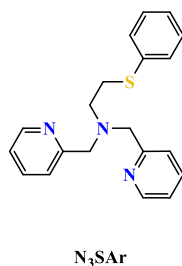


Figura 2.7. Ligante tripodal N₃SAr

La reacción de complejos de Cu(II) frente a H₂O₂ en presencia de una base inicialmente da lugar a la formación de complejos Cu(II)-OOH; en algunos casos la reducción de Cu(II) a Cu(I) por H₂O₂ ocurre cuando el ligante puede estabilizar el bajo estado de oxidación del cobre.

2.5 Ión Cu(II)-oxilo (cuprilo) Cu(II)-O•

Una especie mononuclear cuprilo ha sido propuesta mediante cálculos DFT como la responsable de la reacción de hidroxilación en las enzimas PHM, DβM y TβM.^{48,49} Sin embargo, dicha especie no ha sido caracterizada experimentalmente. Se sugiere que este intermediario reactivo se forma a partir del rompimiento homolítico del enlace O-O en el complejo cúprico-hidroperoxo (ver Capítulo 1). En este sentido, Itoh y colaboradores⁵⁰ reportaron la obtención de un complejo alquilperoxo el cual sufre un rompimiento homolítico del enlace O-O al calentarse. Los autores utilizaron la trampa de radicales 5,5-dimetil-1-pirrolidina N-óxido (DMPO) y así la especie Cu(II)-oxilo propuesta fue detectada por RPE y ESI-MS; sin trampa de radicales los autores reportaron la oxidación de sustratos externos. En un trabajo más reciente los mismos autores reportaron los cálculos DFT⁵¹ del complejo Cu(II)-OOR, encontrando que el átomo de oxígeno enlazado directamente al Cu es el responsable de la reacción de AAH del sustrato, evidenciando que el alquilperoxo es responsable de las oxidaciones observadas en los sustratos externos. Aun así, no existe evidencia directa e inequívoca de la especie cobre-oxilo.

Los sistemas modelo inspirados en el sitio activo Cu_M de la familia de enzimas monooxigenasas PHM, DβM y TβM han aportado información muy valiosa a cerca de posible intermediario reactivo responsable de la reacción de hidroxilación que estas enzimas llevan a cabo, así como de otras especies Cu-O₂ e información acerca del mecanismo de reacción que dichas enzimas pudieran seguir. Aún queda mucho por entender y descubrir en este sentido, y se ha confirmado que los modelos bioinorgánicos son una herramienta indispensable en el desarrollo de esta área de la química.

Referencias

- (1) Kaim, W.; Rall, J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1996**, *35*, 43.
- (2) Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. in *Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity*, Fourth Ed.; Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L., Ed.; Harper Collins College Publishers: New York, **1993**.
- (3) Liu, J. J.; Diaz, D. E.; Quist, D. A.; Karlin, K. D. *Isr. J. Chem.* **2016**, *56*, 738.
- (4) Nam, W. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 465.
- (5) Kitajima, N.; Moro-oka, Y. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 737.
- (6) Kunishita, A.; Ertem, M. Z.; Okubo, Y.; Tano, T.; Sugimoto, H.; Ohkubo, K.; Fujieda, N.; Fukuzumi, S.; Cramer, C. J.; Itoh, S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 9465.
- (7) Klinman, J. P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3013.
- (8) Kobayashi, Y.; Ohkubo, K.; Nomura, T.; Kubo, M.; Fujieda, N.; Sugimoto, H.; Fukuzumi, S.; Goto, K.; Ogura, T.; Itoh, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *29*, 4574.
- (9) Lee, Y.; Lee, D.-H.; Park, G. Y.; Lucas, H. R.; Narducci Sarjeant, A.; Kieber-Emmons, M. T.; Vance, M.; Milligan, A. E.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 8873.
- (10) Solomon, E. I.; Ginsbach, J. W.; Heppner, D. E.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Smeets, P. J.; Tian, L.; Woertink, J. S. *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 11.
- (11) Karlin, K. D.; Itoh, S. in *Copper-Oxygen Chemistry*, First Ed.; Karlin, K. D. and Itoh, S., Ed.; WILEY: New Jersey, **2011**.
- (12) Prigge, S. T.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Amzel, L. M. *Science* **2004**, *304*, 864.
- (13) Donoghue, P. J.; Gupta, A. K.; Boyce, D. W.; Cramer, C. J.; Tolman, W. B. *J. Am. Chem. Soc.*

- 2010**, *132*, 15869.
- (14) Jacobson, R. R.; Tyeklar, Z.; Farooq, A.; Karlin, K. D.; Liu, S.; Zubieta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3690.
- (15) Karlin, K. D.; Wei, N.; Jung, B.; Kaderli, S.; Zuberbuhler, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5868.
- (16) Maiti, D.; Fry, H. C.; Woertink, J. S.; Vance, M. A.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 264.
- (17) Lee, J. Y.; Peterson, R. L.; Ohkubo, K.; Garcia-Bosch, I.; Himes, R. A.; Woertink, J.; Moore, C. D.; Solomon, E. I.; Fukuzumi, S.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9925.
- (18) Peterson, R. L.; Himes, R. A.; Kotani, H.; Suenobu, T.; Tian, L.; Siegler, M. A.; Solomon, E. I.; Fukuzumi, S.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1702.
- (19) Schatz, M.; Raab, V.; Foxon, S. P.; Brehm, G.; Schneider, S.; Reiher, M.; Holthausen, M. C.; Sundermeyer, J.; Schindler, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4360.
- (20) Woertink, J. S.; Tian, L.; Maiti, D.; Lucas, H. R.; Himes, R.; Karlin, K. D.; Neese, F.; Würtele, C.; Holthausen, M. C.; Bill, E.; Sundermeyer, J.; Schindler, S.; Solomon, E. I. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 9450.
- (21) Maiti, D.; Lee, D. H.; Gaoutchenova, K.; Würtele, C.; Holthausen, M. C.; Narducci Sarjeant, A. A.; Sundermeyer, J.; Schindler, S.; Karlin, K. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 82.
- (22) Becker, M.; Heinemann, F. W.; Schindler, S. *Chem. - A Eur. J.* **1999**, *5*, 3124.
- (23) Weitzer, M.; Schindler, S.; Brehm, G.; Schneider, S.; Hörmann, E.; Jung, B.; Kaderli, S.; Zuberbühler, A. D. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 1800.
- (24) Komiyama, K.; Furutachi, H.; Nagatomo, S.; Hashimoto, A.; Hayashi, H.; Fujinami, S.; Suzuki, M.; Kitagawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 59.
- (25) Ginsbach, J. W.; Peterson, R. L.; Cowley, R. E.; Karlin, K. D.; Solomon, E. I. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12872.
- (26) Jazdzewski, B. A.; Reynolds, A. M.; Holland, P. L.; Young, V. G.; Kaderli, S.; Zuberbühler, A. D.; Tolman, W. B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 381.
- (27) Kinsinger, C. R.; Gherman, B. F.; Gagliardi, L.; Cramer, C. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 778.
- (28) Fujisawa, K.; Tanaka, M.; Moro-oka, Y.; Kitajima, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12079.
- (29) Chen, P.; Root, D. E.; Campochiaro, C.; Fujisawa, K.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 466.
- (30) Pirovano, P.; Magherusan, A. M.; McGlynn, C.; Ure, A.; Lynes, A.; McDonald, A. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5946.
- (31) Kunishita, A.; Kubo, M.; Sugimoto, H.; Ogura, T.; Sato, K.; Takui, T.; Itoh, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2788.
- (32) Itoh, S. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2066.
- (33) Tano, T.; Mieda, K.; Sugimoto, H.; Ogura, T.; Itoh, S. *Dalt. Trans.* **2014**, *43*, 4871.
- (34) Abe, T.; Morimoto, Y.; Tano, T.; Mieda, K.; Sugimoto, H.; Fujieda, N.; Ogura, T.; Itoh, S. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 8786.
- (35) Aboelella, N. W.; Gherman, B. F.; Hill, L. M. R.; York, J. T.; Holm, N.; Young, V. G.; Cramer, C. J.; Tolman, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3445.
- (36) Park, G. Y.; Lee, Y.; Lee, D.-H.; Woertink, J. S.; Narducci Sarjeant, A. A.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 91.
- (37) Zhou, L.; Powell, D.; Nicholas, K. M. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 3840.
- (38) Kim, S.; Ginsbach, J. W.; Billah, A. I.; Siegler, M. A.; Moore, C. D.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8063.
- (39) Kim, S.; Lee, J. Y.; Cowley, R. E.; Ginsbach, J. W.; Siegler, M. A.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2796.
- (40) Chen, P.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4991.

- (41) Maiti, D.; Lucas, H. R.; Narducci Sarjeant, A. A.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6998.
- (42) Maiti, D.; Sarjeant, A. A. N.; Karlin, K. D. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8736.
- (43) Maiti, D.; Sarjeant, A. A. N.; Karlin, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6720.
- (44) Wada, A.; Harata, M.; Hasegawa, K.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Mukai, M.; Kitagawa, T.; Einaga, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 798.
- (45) Fujii, T.; Naito, A.; Yamaguchi, S.; Wada, A.; Funahashi, Y.; Jitsukawa, K.; Nagatomo, S.; Kitagawa, T.; Masuda, H. *Chem. Commun.* **2003**, *1*, 2700.
- (46) Chen, P.; Fujisawa, K.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10177.
- (47) Kodera, M.; Kita, T.; Miura, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7715.
- (48) Yoshizawa, K.; Kihara, N.; Kamachi, T.; Shiota, Y. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 3034.
- (49) Crespo, A.; Martí, M. A.; Roitberg, A. E.; Amzel, L. M.; Estrin, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12817.
- (50) Kunishita, A.; Ishimaru, H.; Nakashima, S.; Ogura, T.; Itoh, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4244.
- (51) Tano, T.; Ertem, M. Z.; Yamaguchi, S.; Kunishita, A.; Sugimoto, H.; Fujieda, N.; Ogura, T.; Cramer, C.; Itoh, S. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 10326.

Capítulo 3

PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Propuesta de investigación

Como ya se mencionó en el capítulo 1, en el sitio activo en las monooxigenasas dependientes de Cu, PHM, D β M y T β M, el ión metálico se coordina a nitrógeno (N) de residuos de histidina (imidazol) y azufre (S) de residuo metionina (tioéter).¹ Este sitio activo sirve de inspiración para el diseño de los ligantes aquí reportados, puesto que trabajos anteriores han estudiado sólo ligantes que contienen en su esqueleto nitrógeno o azufre por separado, y los que presentan donadores mixtos son escasos (capítulo 2).² Los modelos inorgánicos reportados incorporan en sus ligantes átomos donadores de N (amina, piridina, quinolina, imidazol, bencimidazol y pirazol), O (carboxilato, hidróxido, alcohol) y en algunos casos S (tiolato, tioéter). Para fines de este trabajo, analizaremos las propiedades de coordinación del N y S a continuación.³

Según la teoría de ácidos y bases duros y blandos de Pearson,⁴ el S es un donador blando, y por ello se enlaza preferentemente a metales blandos; el S puede actuar como ligante monodentado o como ligante puente entre dos centros metálicos, principalmente cuando se encuentra como donador aniónico. Como donador neutro, las propiedades de coordinación de los grupos tioéter radican en su capacidad para coordinarse como donador σ . En general, la coordinación del S al centro metálico le confiere propiedades específicas a las enzimas de cobre, las cuales lo incorporan como tiolato (cisteína) o tioéter (metionina). Cuando encontramos al S como ligante tioéter, el metal se enlaza frecuentemente formando un ángulo de 40° con la normal del plano C–S–C. Los orbitales de este enlace son los dos orbitales de valencia del átomo de S, que se encuentran de manera perpendicular (π) o dentro del plano (σ) C–S–C, y en gran medida en el plano del ligante.³

Por otra parte, el N se encuentra en las enzimas de Cu proveniente de residuos de imidazol de histidina, y se ha modelado en sistemas inorgánicos con distintos grupos funcionales tales como piridinas, aminas e iminas. Cuando el nitrógeno se encuentra como grupo amino, se coordina al metal a través del par de electrones libres en el átomo de N generando una interacción fuerte tipo σ . Analizando el ligante imidazol, este se enlaza al metal también a través del par de electrones libre en el N, generando una interacción con el orbital σ , el cual es más débil que el señalado con el grupo amino. El imidazol también puede presentar interacciones del tipo π , sin embargo, estas interacciones son de menor magnitud (basándose en la integral de traslape calculada) que la interacción σ mencionada anteriormente (Figura 3.1).³

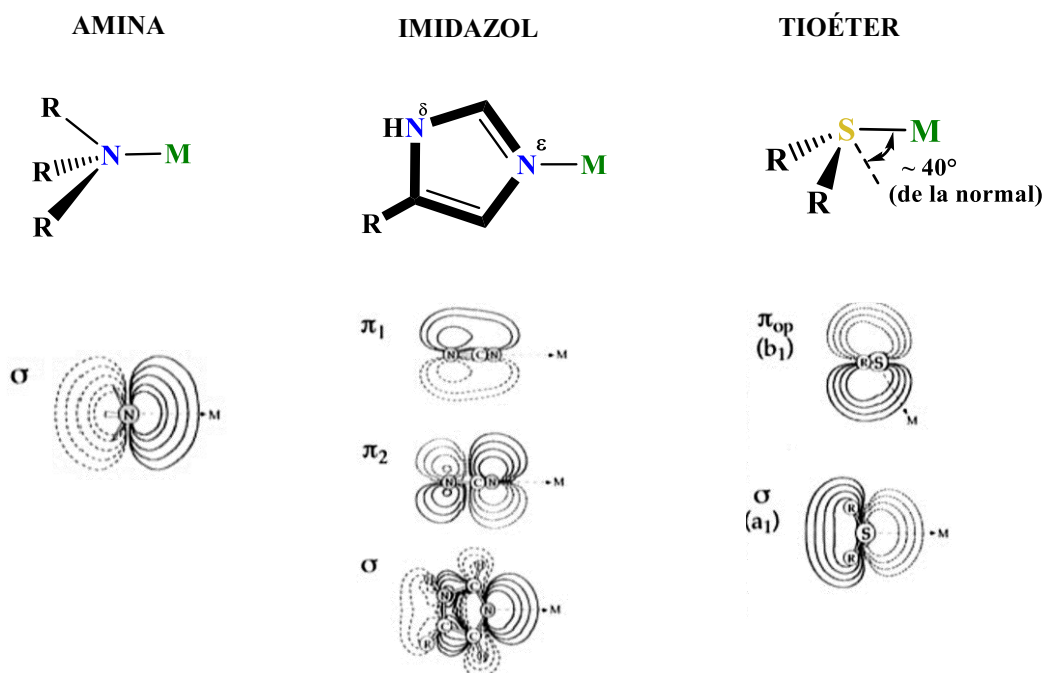


Figura 3.1. Orbitales moleculares de grupos donadores que contienen átomos de N ó S hacia iones metálicos³

Adicionalmente, otra manera de juzgar la capacidad donadora de los diferentes grupos funcionales que contienen N puede establecerse tomando en cuenta el valor del pK_a de los ácidos conjugados. La Figura 3.2 muestra los valores correspondientes para diferentes heterociclos, así como las constantes de asociación con Cu^{2+} ; la histidina se usa como donador de referencia en las proteínas, la cual presenta un valor de pK_a de 6.17. El 2-metilbencimidazol y la 2-metilpiridina presentan un valor de pK_a muy cercano al de la histidina, sin embargo, la 2-metilpiridina tiene el inconveniente de que el valor del logaritmo de $K_{Cu^{2+}}$ (constante de formación de complejos cúpricos) es más bajo que el del 2-metilbencimidazol, lo que pone al descubierto una menor afinidad del cobre hacia la 2-metilpiridina, y al 2-metilbencimidazol como un buen candidato para estudios de complejos con este tipo de grupos donadores.⁵

	Pirazol	Piridina	Bencimidazol	2-metilpiridina	2-metilbencimidazol	Imidazol	4-metilimidazol	Histidina
pK_a	2.48	5.25	5.53	5.94	6.19	6.95	7.45	6.17
$\log K_{Cu^{2+}}$	2.34	2.60	3.34	1.69	4.43	3.76	4.13	10.60

Figura 3.2. Valores de pK_a y $\log K_{Cu^{2+}}$ relacionado con la capacidad donadora N en heterociclos

En este trabajo se reporta la síntesis de ligantes mixtos bencimidazol-calcogenoéter (Figura 3.3). El grupo bencimidazol al ser voluminoso provee protección a los complejos formados, evitando la formación de dímeros o ataques de otros agentes químicos que llevan a la descomposición del aducto;⁶ además dicho impedimento estérico permite la coordinación únicamente de moléculas pequeñas como O₂. Los grupos tioéter contenidos en la estructura de los ligantes, además de emular el ambiente proporcionado por la metionina en el sitio activo, incluyen diferentes sustituyentes en L₁, L₂ y L₃, mismos que modulan las propiedades redox y electrónicas del sistema. El ligante L₃ presenta un CH₂ bencílico con la finalidad de probar la posible hidroxilación intramolecular de dicho enlace por los complejos de Cu activantes de O₂; esta estrategia se ha probado de forma eficiente dando como resultado la hidroxilación alifática del ligante.^{7,8}

El ligante L_{Se} incorpora en su estructura un átomo de selenio (Se), el cual es un núcleo activo en RMN (⁷⁷Se)⁹ que puede considerarse como un análogo del S presente en el residuo de metionina. De hecho, el átomo de Se está presente en la denominada selenocisteína, llamado el "aminoácido esencial número 21".¹⁰ L_{Se} permite el estudio adicional a través del espectroscopía de ⁷⁷Se-RMN, el acoplamiento de Se (S = 1/2) con el núcleo de Cu²⁺ puede ser observado con espectroscopía RPE; además permite comparar el comportamiento de reactividad entre L_{Se} y sus análogos tioéter.

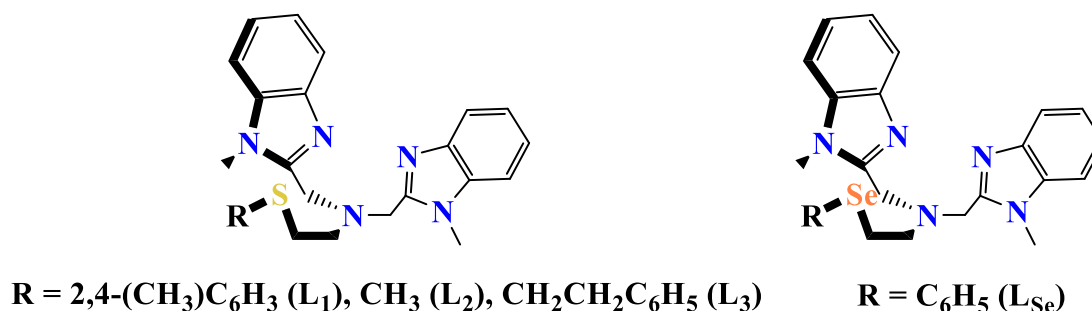


Figura 3.3. Ligantes mixtos bencimidazol-calcogenoéter L_{N3Y}

Referencias

- (1) Liu, J. J.; Diaz, D. E.; Quist, D. A.; Karlin, K. D. *Isr. J. Chem.* **2016**, *56*, 738.
- (2) Karlin, K. D.; Itoh, S. *Copper-Oxygen Chemistry*, First Ed.; Karlin, K. D. and Itoh, S., Ed.; WILEY: New Jersey, **2011**.
- (3) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2239.
- (4) Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.
- (5) Katritzky, A., R.; Pozharskii, A. F. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Second Ed.; Elsevier Science: Oxford, UK, **2000**.
- (6) Kitajima, N.; Moro-oka, Y. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 737.
- (7) Itoh, S. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2066.
- (8) Kunishita, A.; Kubo, M.; Sugimoto, H.; Ogura, T.; Sato, K.; Takui, T.; Itoh, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2788.
- (9) Schneiderberg, H. D. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1995**, *27*, 1.
- (10) Bock, A.; Forchhammer, K.; Heider, J.; Leinfelder, W.; Sawers, G.; Veprek, B.; Zinoni, F. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 515.

3.2 Hipótesis

Los ligantes mixtos bencimidazol-calcogenoéter L_{N3Y} permitirán obtener complejos de Cu estables en sus dos estados de oxidación más comunes. Estos ligantes modularán las propiedades redox y electrónicas de los complejos obtenidos, activando O_2 para la abstracción de hidrógeno de sustratos orgánicos de manera análoga a los sitios activos de las monooxigenasas de cobre; la reactividad podrá ser verificada mediante la caracterización de los productos de oxidación. Los resultados obtenidos de éstos experimentos permitirán aportar elementos para esclarecer el mecanismo de acción de las monooxigenasas dependientes de Cu que hidroxilan selectivamente enlaces C-H no activados en sus sustratos naturales.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

Estudiar la reactividad de complejos de Cu frente a O_2 y H_2O_2 con ligantes tripodales L_{N_3Y} que contienen donadores nitrogenados bencimidazólicos, así como donadores de calcógenos como tio/selenoéter, inspirados en los sitios activos de las metaloenzimas D β M, T β M y PHM.

3.3.2 Objetivos Particulares

- * Diseñar, sintetizar y caracterizar ligantes que contengan en su esqueleto átomos donadores N, S y Se provenientes de bencimidazoles y tio/selenoéteres.
- * Sintetizar y caracterizar los correspondientes complejos de Cu en sus dos estados de oxidación más comunes (1+, 2+).
- * Estudiar el efecto de los átomos donadores contenidos en los ligantes sobre el potencial de media onda del par Cu^{2+}/Cu^+ .
- * Estudiar el efecto de los átomos donadores contenidos en el ligante en la reactividad de los complejos de Cu frente a O_2 y H_2O_2 mediante técnicas espectroscópicas a temperatura variable en los casos en que sea necesario.
- * Estudiar la reactividad de los intermediarios activos generados con los complejos de Cu frente a sustratos orgánicos mediante técnicas espectroscópicas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se estableció en el capítulo 3 los ligantes reportados en este trabajo están diseñados para ser sistemas modelo de las enzimas PHM, D β M y T β M. Éstas enzimas presentan un sitio activo mononuclear responsable de la actividad monooxigenasa denominado Cu_M (Figura 4.1). El centro catalítico de Cu se encuentra coordinado por dos histidinas como ligantes N ϵ , un residuo de metionina (His242, His244 y Met314); y una molécula de disolvente (probablemente agua) completando una esfera de coordinación aproximadamente tetraédrica. Las distancias de enlace del Cu_M-N ϵ para His242 e His244 se encuentra en un intervalo de 2.0-2.2 Å mientras que la distancia Cu_M-S δ Met314 es considerablemente más larga y va de 2.4 a 2.6 Å.¹ De manera análoga al Cu_M los ligantes tripodales incorporan dos grupos bencimidazol (emulando las histidinas) y un grupo tioéter (emulando la metionina) unidos por una amina central. La selección de los grupos funcionales se discutió previamente (capítulo 3).

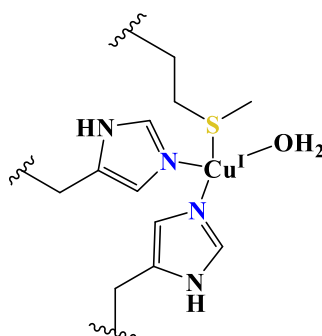


Figura 4.1. Estructura de Cu_M en las monooxigenasas dependientes de Cu

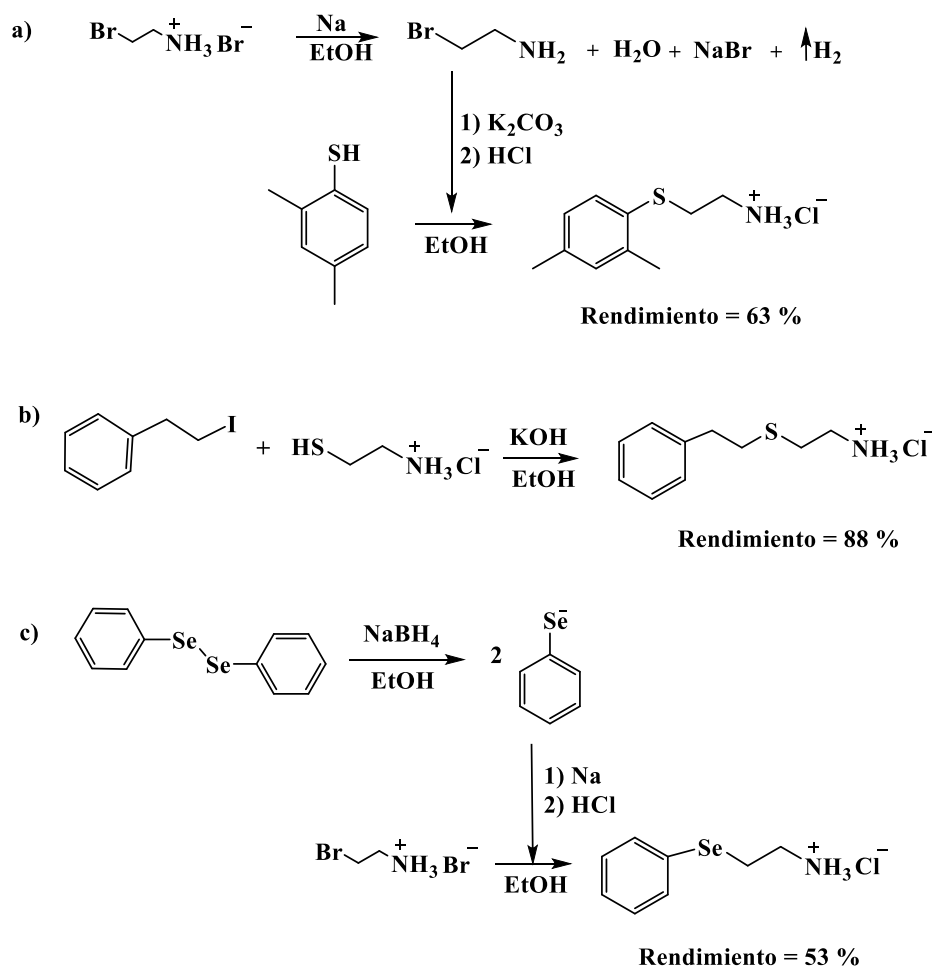
4.1 Síntesis y caracterización de aminas

Para la obtención de ligantes tripodales con átomos donadores mixtos, se sintetizaron las aminas correspondientes (excepto **L**₂, 2-metiltioetilamina porque es comercial), para la posterior incorporación de los grupos bencimidazoilo. Las aminas precursoras de los ligantes (**L**₁ = bis[NMe-bencimidazolil-(2,4-dimetilfeniltioetil)amina], **L**₃ = bis[NMe-bencimidazolil-(2-feniletiltioetil)amina] y **L**_{se} = bis[NMe-bencimidazolil-(2-fenilselenoetil)amina]) se sintetizaron a partir de una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2).

La 2,4-dimetilfeniltioetilamina (*ASAr*) precursor de **L**₁ se sintetizó a partir de la reacción equimolar entre bromhidrato de bromoetilamina y Na en EtOH;² una vez neutralizada la amina, se hizo reaccionar con un equivalente de 2,4-dimetilbencenotiol, obteniéndose la tioéter-amina con un rendimiento del 63 %. Para **L**₃ se sintetizó la 2-feniletiltioetilamina (*ASP_h*)³ mediante la reacción S_N2 entre el clorhidrato de cisteamina y el yodoetilbenceno, el producto de esta reacción se aisló con un rendimiento del 88 %. De manera análoga a la 2,4-dimetilfeniltioetilamina se sintetizó la 2-

fenilselenoetilamina (ASe)² con 53 % de rendimiento, a partir del difenildiselenuro reducido con borohidruro de sodio (Esquema 4.1).

Las aminas obtenidas se caracterizaron por técnicas de análisis convencionales (Figura A2 – Figura A8), espectroscopía infrarroja (IR), espectrometría de masas mediante análisis directo en tiempo real (DART-MS), resonancia magnética nuclear de protón y de selenio (¹H-RMN y ⁷⁷Se-RMN); una vez confirmada la identidad de las aminas se procedió a la síntesis de los ligantes.



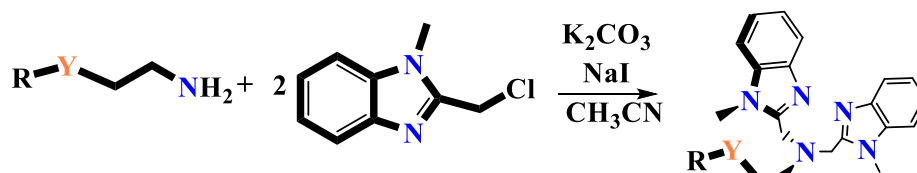
Esquema 4.1. Síntesis de aminas, a) $ASAr$, b) $ASPh$ y c) ASe

4.2 Síntesis y caracterización de ligantes

Los ligantes tripodales inspirados en el sitio activo de las monooxigenasas dependientes de Cu se sintetizaron mediante una reacción S_N2 entre dos equivalentes de 2-clorometil-N-metil-bencimidazol y un equivalente de la amina correspondiente, empleando 10 % mol de NaI como catalizador, intercambiando el cloruro por yoduro puesto que este último es un mejor grupo saliente. Como base se usó K_2CO_3 para capturar los protones de la amina y utilizando acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente (Esquema 4.2). Los ligantes se caracterizaron por técnicas analíticas convencionales, IR, DART-MS, RMN, análisis elemental (AE), punto de fusión (pF), electroquímica (Figura A9 – Figura A24) y se obtuvieron con rendimientos de moderados a buenos (53–88 %).

El espectro de ¹H-RMN del L_1 (Figura 4.2) muestra los grupos metilo en posiciones 2 y 4 del anillo unido al tioéter en $\delta = 2.15$ y 2.17 ppm (intergración de 3H por cada CH_3); dos tripletes en $\delta = 2.97$ y

3.07 ppm, cada uno correspondiente a un grupo metileno que unen la amina central y el grupo tioéter (2H, CH₂); el singulete en $\delta = 3.72$ ppm (6H, NCH₃) corresponde a los metilos unidos al nitrógeno del NMe-bencimidazol; la señal en $\delta = 4.05$ ppm (4H, CH₂) corresponde a los grupos metileno que unen la amina central con los grupos bencimidazoilo; en la región aromática se observan las señales del bencimidazol que integran para 4, 2 y 2 protones respectivamente, y en la región de 6.8 a 7.14 ppm las señales que integran para 1 protón corresponde a las posiciones no sustituidas en el grupo fenilo tioéter. Las señales en $\delta = 1.73$, 2.49 y 3.58 ppm corresponden a disolventes residuales (THF y DMSO).



L₁: Y = S, R = 2,4-(CH₃)C₆H₃ Rendimiento = 54 %

L₂: Y = S, R = CH₃ Rendimiento = 53 %

L₃: Y = S, R = CH₂CH₂C₆H₅ Rendimiento = 89 %

L_{Se}: Y = Se, R = C₆H₅ Rendimiento = 55 %

Esquema 4.2. Síntesis de ligantes **L_{N3Y}**

La caracterización de los ligantes mediante ¹H-RMN muestra señales correspondientes a los grupos bencimidazoilo con valores de δ muy similares. Adicionalmente **L₂** presenta una señal en $\delta = 1.95$ ppm (3H, CH₃) correspondiente al grupo metilo unido directamente al azufre; en el caso de **L₃**, este presenta señales en $\delta = 2.72$ (2H, CH₂-S), 2.79 (2H, CH₂-N), 2.95 (4H, SCH₂CH₂Ph) ppm. Mientras que en el caso del **L_{Se}** se observan una señal correspondiente a los protones del grupo fenilo unido al selenio como multiplete centrado en $\delta = 7.2$ (5H, Ph-Se) ppm.

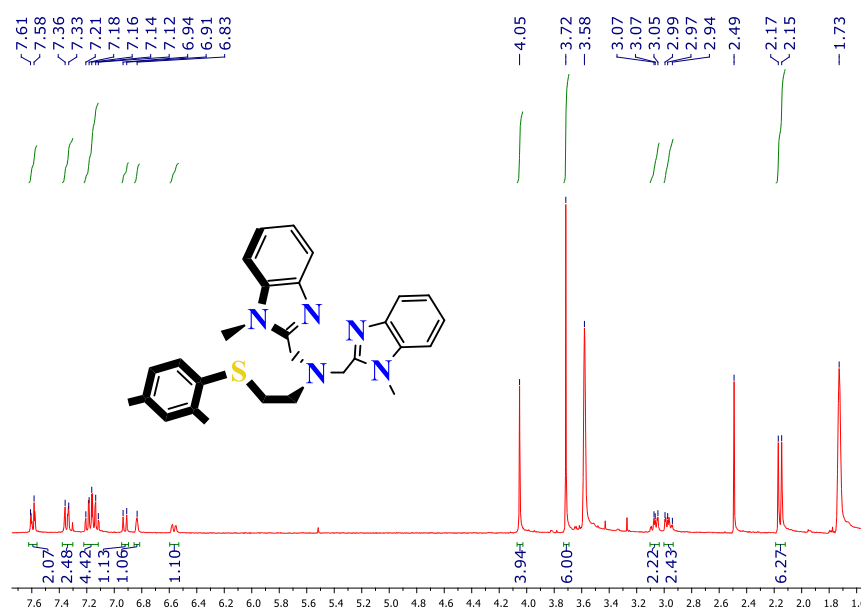


Figura 4.2. ¹H-RMN de **L₁** en THF-*d*₈ a 25 °C

Para el caso de L_{Se} se realizó la caracterización adicional mediante ^{77}Se -RMN, en la Figura 4.3 se muestra un espectro comparativo de los precursores (difeníldiselenuro y 2-fenilselenoetilamina) y el ligante, donde se observa en el espectro de color azul una señal en $\delta = 463$ (Ph_2Se_2) y en 256 (amina) ppm; el espectro que se muestra en color verde presenta una señal que corresponde a ASe después de purificación, mientras que el espectro rojo tiene una señal en $\delta = 274$ ppm asignada a L_{Se} .

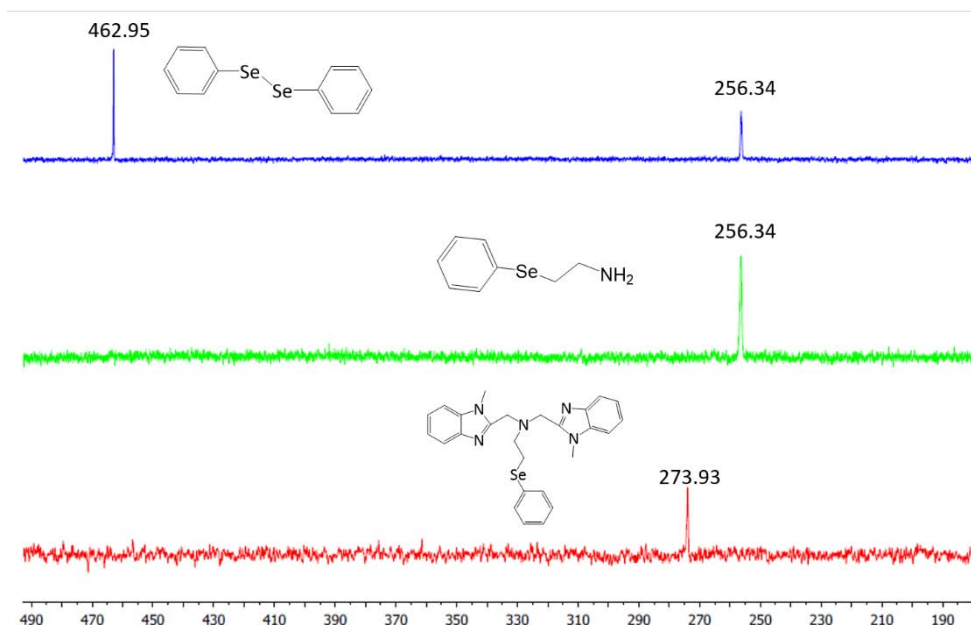
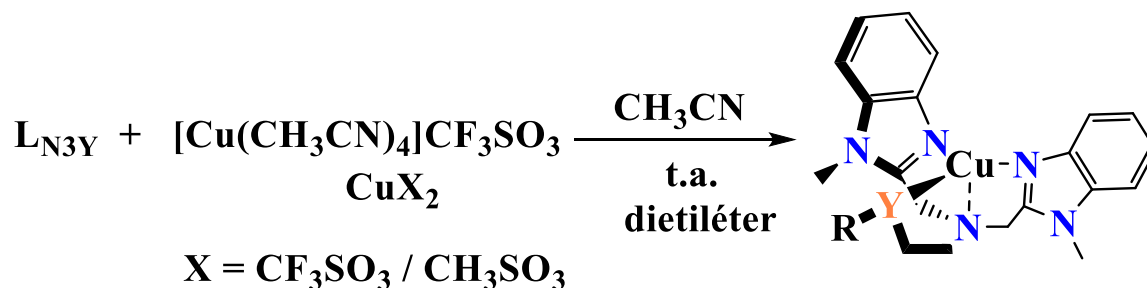


Figura 4.3. ^{77}Se -RMN de L_{Se} y precursores en $THF-d_8$ a $25\text{ }^{\circ}C$

4.3 Síntesis y caracterización de complejos de Cobre

Una vez caracterizados inequívocamente los ligantes, se procedió a la obtención de complejos de Cu en sus dos estados de oxidación más comunes (I y II) utilizando cantidades estequiométricas de la sal metálica y del ligante (Esquema 4.3). Los complejos cuprosos se sintetizaron mediante técnicas Schlenk y caja de guantes, utilizando disolventes anhidros; los complejos cúpricos se sintetizaron en condiciones ambientales. Todos los complejos sintetizados se caracterizaron mediante técnicas analíticas convencionales (IR, UV-vis, RMN, RPE, ESI-MS, AE, pF, rayos X).



Esquema 4.3. Reacción general para la síntesis de complejos de Cu (I y II)

4.3.1 Caracterización electroquímica de complejos cuprosos

Debido a la importancia del par redox $\text{Cu}^{2+/+}$ dentro del ciclo catalítico que las enzimas monooxigenasas dependientes de Cu llevan a cabo, la determinación de potencial de reducción impuesto por los ligantes sintetizados es necesaria. Se sabe que el potencial de óxido-reducción es un factor determinante en la reactividad de los sistemas modelo hacia la activación de la molécula de O_2 .⁴ La determinación del potencial redox del par $\text{Cu}^{2+/+}$ de los complejos se realizó mediante voltamperometría cíclica, para ello fue necesaria la caracterización potenciométrica de los ligantes en las mismas condiciones. Los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) obtenidos con la serie de ligantes sintetizada para el par redox $\text{Cu}^{2+/+}$ se reporta en la Tabla 4.1, en todos los casos referenciados contra el par redox $\text{Fc}^{+/0}$ (Fc = ferroceno).

Tabla 4.1. Potencial de media onda del par redox $\text{Cu}^{2+/+}$ en mV vs Fc^+/Fc

Ligante	L1	L2	L3	LSe
$E_{1/2}$ (mV)	-160	-175	-190	-131

Los valores de potencial de media onda obtenidos con cada ligante hablan de su estructura: como era de esperarse, L_{Se} tiene el valor de $E_{1/2}$ más positivo, lo cual se puede atribuir a que el átomo de Se se considera donador blando (teoría de ácidos y bases duras y blandas de Pearson)⁵ al ser un átomo de mayor tamaño que el S; esto hace que el proceso de oxidación del Cu requiera mayor energía (potencial aplicado) que sus análogos con tioéter, es decir, prefiere coordinarse al Cu en bajo estado de oxidación.

En el caso de los ligantes L₁ (reportado previamente en el grupo de investigación),⁶ L₂ y L₃ sus estructuras varían en el grupo funcional incorporado en el tioéter, por lo que resalta con los dos primeros un valor de $E_{1/2}$ bastante cercano entre ellos; L₂ al incorporar un grupo alquilo (más electrodonador que el grupo arilo en L₁) estabiliza mejor al Cu^{2+} que L₁. En el caso de L₃ incorpora en su estructura un grupo alquilo y arilo, este ligante presenta el valor de $E_{1/2}$ más negativo de toda la serie, evidenciando que es el mejor ligante para estabilizar al ion cúprico. El voltamperograma de L_{Se} (azul) y su correspondiente complejo cuproso (rojo) se muestra en la Figura 4.4, donde se observan 4 señales de oxidación de L_{Se} marcadas como I^{pa} (0.73 V), II^{pa} (0.96 V), III^{pa} (1.22 V) y IV^{pa} (1.66 V); dichas señales se desplazan ligeramente a valores más positivos cuando se coordina el Cu (voltamperograma rojo), la señal de oxidación del par $\text{Cu}^{2+/+}$ se observa claramente en el voltamperograma marcada con una flecha, $E_{pa} = -0.08$ V vs Fc^+/Fc .

Al analizar los valores de $E_{1/2}$ encontrados con la serie de ligantes sintetizada observamos que la diferencia de $E_{1/2}$ entre los ligantes que conforman la serie L_{N3Y} ($\Delta E = 60$ mV) no es tan grande como en otros sistemas modelo (TMPA y derivados $\Delta E = 380$ mV) y adicionalmente presentan valores más positivos (~ 400 mV). Esto significa que los complejos aquí reportados son más electrofílicos que sus análogos con grupos piridilo, lo que genera complejos cúpricos superoxo más reactivos.⁷

Figura 4.4. Voltamperograma en sentido anódico de L_{Se} y $[L_{Se}Cu]^+$

4.3.2 Síntesis y caracterización de complejos cuprosos

Se hizo reaccionar triflato ($OTf^- = O_3SCF_3^-$) de $[Cu(CH_3CN)_4]OTf$ con una cantidad equimolar del ligante correspondiente en un matraz tipo Schlenk; dentro de la caja de guantes se disolvió ésta mezcla de reacción en acetonitrilo (destilado, anhidro) y se dejó reaccionar por 3 horas. Pasado este tiempo, en la línea de vacío/ N_2 se concentró la disolución, evaporándose el acetonitrilo y se filtró mediante cánula; el complejo se lavó con éter etílico (destilado, anhidro) y se aislaron los complejos como sólidos microcristalinos.

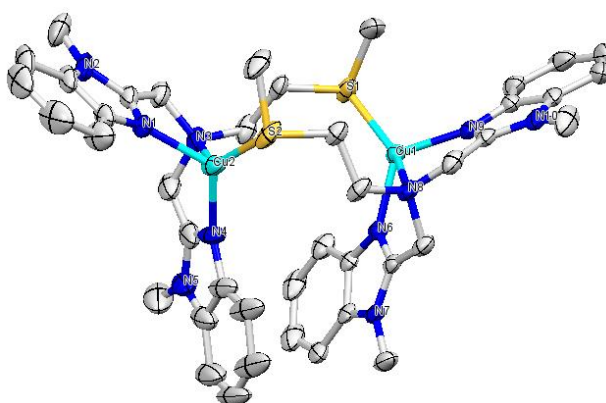


Figura 4.5. Diagrama Mercury de $[L_2Cu]_2OTf_2$ al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y los aniones OTf^- son omitidos por claridad

El complejo $[L_1Cu]ClO_4$ fue reportado previamente en el grupo de investigación,⁶ mientras que el complejo $[L_2Cu]_2OTf_2$ se obtuvo con un rendimiento del 45 % como un sólido incoloro; cristales adecuados para análisis por difracción de rayos X se obtuvieron de una disolución concentrada del compuesto en acetonitrilo por evaporación lenta. La estructura en estado sólido (Figura 4.5) revela una

especie dimérica, el Cu en cada entidad mononuclear se encuentra tetracoordinado con tres nitrógenos, de la amina central y de los bencimidazoles, y el átomo de azufre del grupo tioéter del otro ligante actuando como puente. Las distancias de enlace y ángulos seleccionados se muestran en la Tabla 4.2, los datos cristalográficos se reportan en anexos.

Los complejos cuprosos con **L1** y **L2** se comportaron de igual manera en estado sólido (dímeros). Para verificar su comportamiento en disolución [puesto que el sitio activo que tratamos de emular es mononuclear (Cu_M)], los complejos fueron analizados por 2D-DOSY RMN en THF- d_8 (DOSY = espectroscopía de resonancia magnética nuclear de difusión ordenada).⁸ Con esta técnica utilizando como estándar el coeficiente de difusión (D) del ligante libre, se obtuvo el valor de D para los complejos cuprosos. Dichos valores se utilizaron para calcular el radio hidrodinámico (r_H) mediante la ecuación de Stokes-Einstein. Los valores obtenidos se reportan en la Tabla 4.2 y son congruentes con una formulación mononuclear de los complejos en disolución (Figura 4.6).

Tabla 4.2. Coeficiente de difusión (D) y radio hidrodinámico (r_H) de **L_{N3Y}** y complejos cuprosos

Compuesto	D ($\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)	r_H (Å)
L1	8.214	5.78
L1Cu	7.178	6.61
L2	9.442	5.03
L2Cu	8.659	5.48
L3	8.696	5.45
L3Cu	6.647	7.13
L_{Se}	9.387	5.05
L_{Se}Cu	7.204	6.58

Los complejos cuprosos con los ligantes **L3** y **L_{Se}**, se obtuvieron con el procedimiento descrito y fueron caracterizados por técnicas analíticas convencionales. El complejo [**L_{Se}Cu**]OTf se aisló como sólido amarillo y se caracterizó por ESI-MS, IR y AE, los resultados obtenidos revelan la formación del complejo mononuclear, sin embargo, es interesante obtener su estructura en estado sólido para ver si se comporta como dímero (cómo sus análogos con **L1** y **L2**) o monómero. En el caso de **L3** la síntesis y caracterización del complejo cuproso no fue satisfactoria. En ambos casos se están repitiendo los experimentos para tener una caracterización más confiable. Los resultados de dichos estudios forman parte de un manuscrito que se encuentra en preparación.

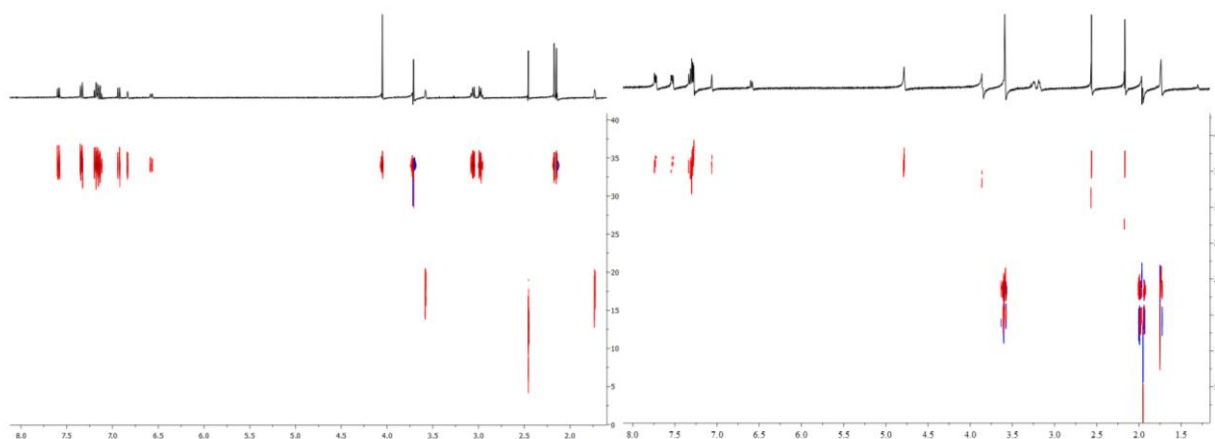


Figura 4.6. Comparación de espectros 2D-DOSY RMN de izq.) L_1 ; der) $[L_1Cu]OTf$ en $THF-d_8$ a $25^\circ C$, muestran valores de D comparables (disoluciones 3.3 mM)

4.3.3 Síntesis y caracterización de complejos cúpricos

Los complejos cúpricos se obtuvieron mezclando cantidades estequiométricas de los ligantes con triflato de cobre(II) ($CuOTf_2$) en CH_3CN , después de tres horas de agitación a temperatura ambiente; las mezclas fueron concentradas bajo presión reducida y el sólido obtenido se lavó con éter etílico, obteniéndose sólidos de color turquesa. Los complejos cúpricos L_1CuOTf_2 ; L_2CuOTf_2 , L_3CuOTf_2 y $L_{Se}CuOTf_2$ se confirmaron como especies mononucleares en disolución de acuerdo a los resultados obtenidos mediante ESI-MS (Figura A32 – Figura A41). El análisis de los complejos mediante RPE evidenció su naturaleza axial: el espectro de RPE del complejo $[L_{Se}Cu]OTf_2$ se confirma lo anterior con valores de $g_{\parallel} = 2.283$, $g_{\perp} = 2.069$ y $A_{\parallel} = 157$ G, como se muestra en la Figura 4.7; la simulación de los espectros de RPE de todos los complejos se realizó en el programa Anisimu/FA versión 2.4.0 de Jeol; los parámetros necesarios para obtener dicha simulación son, número de electrones desapareados en el sistema, frecuencia de absorción, spin nuclear, spin electrónico, los valores de g y de A , y la forma de la curva de absorción (lorentziana ó gaussiana).

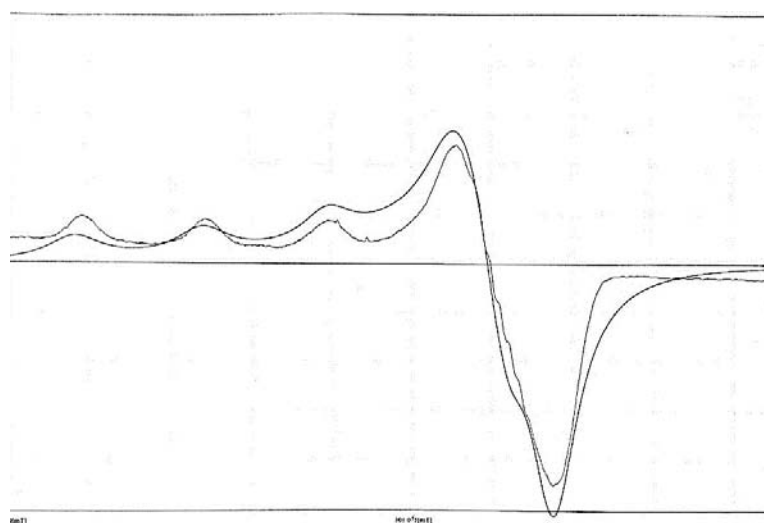


Figura 4.7. Espectro de RPE y simulación de $[L_{Se}Cu]OTf_2$ en CH_3CN a 77 K

Se obtuvieron cristales que permitieron identificar las estructuras en estado sólido de los complejos $[\text{L}_3\text{CuCl}]\text{OTf}$, $[\text{L}_3\text{CuNO}_3]\text{OTf}$ y $[\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O}]\text{OMes}_2$ ($\text{OMes}^- = \text{CH}_3\text{SO}_3^-$). Las estructuras de los complejos con L_3 (Figura 4.8) difieren en el ligante con el que el Cu completa su esfera de coordinación: en el caso del complejo con cloruro, la geometría alrededor del Cu es una pirámide de base cuadrada distorsionada ($\tau = 0.25$),⁹ con el grupo tioéter en posición axial actuando como ligante débil a distancia Cu-S de 2.6512(14) Å, y los átomos de nitrógeno en las posiciones ecuatoriales; las distancias y ángulos de enlace se presentan en la Tabla 4.2. Con la finalidad de eliminar el cloruro (proviene de la síntesis de L_3), se realizó la reacción de eliminación de este ión mediante la adición de un equivalente de AgNO_3 a una solución etanólica de L_3 ; una vez libre de cloruros se procedió a la síntesis del complejo de Cu^{2+} mediante el procedimiento descrito previamente. Se obtuvieron cristales azules y al analizarlos por difracción de rayos X se corroboró la presencia de la especie $[\text{L}_3\text{CuNO}_3]\text{OTf}$ en estado sólido. La estructura muestra al Cu^{2+} en una geometría octaédrica distorsionada, la suma de los ángulos alrededor del centro metálico es de 1512° mientras que en un octaedro perfecto es de 1620° , por lo que se considera que presenta un 7 % de distorsión;¹⁰ en posición axial se encuentra el grupo tioéter y uno de los átomos de O del anión NO_3^- , mientras que en las posiciones ecuatoriales se coordinan los átomos de nitrógeno del ligante y un átomo de oxígeno adicional del nitrato; este último se comporta como ligante bidentado hacia el centro metálico. Es importante resaltar que aún con el nitrato coordinado, el grupo tioéter se encuentra enlazado al centro metálico y con una distancia Cu-S casi idéntica a la del complejo $[\text{L}_3\text{CuCl}]\text{OTf}$ (Tabla 4.3).

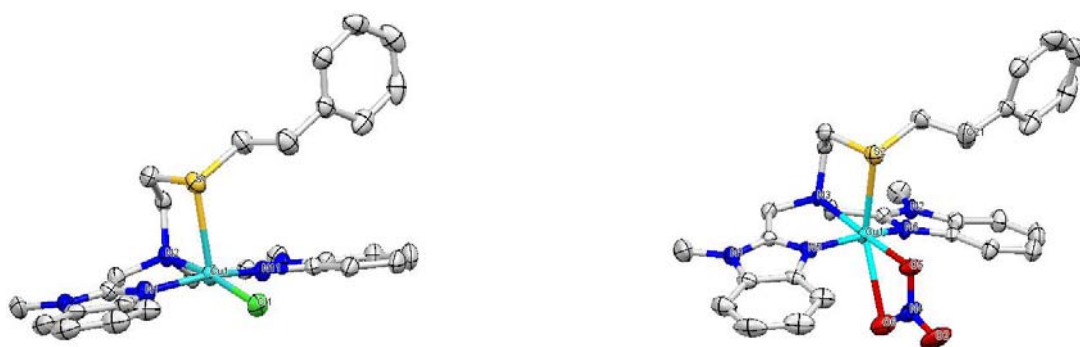


Figura 4.8. Diagrama Mercury de: izq.) $[\text{L}_3\text{CuCl}]\text{OTf}$ y der.) $[\text{L}_3\text{CuNO}_3]\text{OTf}$, ambos al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y aniones OTf son omitidos por claridad

El complejo $[\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O}]\text{OMes}_2$ presenta en estado sólido una geometría de pirámide de base cuadrada distorsionada alrededor del Cu^{2+} (Figura 4.9), con el átomo de Se en la posición axial y en los átomos de nitrógeno en posiciones ecuatoriales al igual que en las estructuras anteriormente descritas; una molécula de agua completa la esfera de coordinación ($\tau = 0.27$).⁹

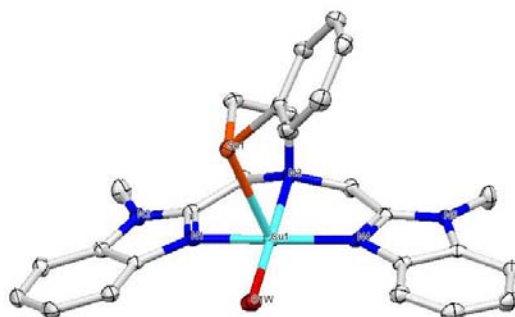


Figura 4.9. Diagrama Mercury de $[\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O}]\text{OMes}_2$ al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y el ión OTf son omitidos por claridad

Tabla 4.3. Distancias de enlace y ángulos seleccionados para las estructuras en estado sólido

Distancia (Å)		Ángulos (°)		Distancia (Å)		Ángulos (°)	
[L₃CuCl]OTf				[L₂Cu]₂OTf₂			
Cu1Cl1	2.2702(12)	Cl1Cu1N1	98.10(12)	Cu1S1	2.211(2)	S1Cu1N6	122.5(2)
Cu1N1	1.968(4)	Cl1Cu1N2	172.29(11)	Cu1N6	1.987(6)	S1Cu1N8	135.3(1)
Cu1N2	2.14(4)	Cl1Cu1N11	96.81(11)	Cu1N8	2.458(6)	S1Cu1N9	113.6(2)
Cu1N11	1.964(4)	Cl1Cu1S1	102.57(5)	Cu1N9	2.015(5)	N6Cu1N8	76.5(2)
Cu1S1	2.6512(14)	N1Cu1N2	81.72(15)	Cu2S2	2.188(2)	N6Cu1N9	121.7(2)
		N1Cu1N11	157.09(16)	Cu2N1	2.035(3)	N8Cu1N9	74.8(2)
		N2Cu1N11	81.18(14)	Cu2N3	2.437(6)	S2Cu2N1	111.7(2)
		N1Cu1S1	88.68(12)	Cu2N4	1.996(7)	S2Cu2N3	132.3(1)
		N2Cu1S1	85.14(11)			S2Cu2N4	130.8(2)
		N11Cu1S1	104.92(12)			N1Cu2N3	74.3(2)
						N1Cu2N4	114.7(2)
						N3Cu2N4	76.8(2)
[L₅CuH₂O]OMes₂				[L₃CuNO₃]OTf			
Cu1Ow	1.9591(17)	OwCu1N1	95.05(8)	Cu1O5	1.992(3)	O5Cu1O6	53.76
Cu1N1	1.957(2)	OwCu1N3	175.96(8)	Cu1O6	2.634	O5Cu1N3	177.93(14)
Cu1N3	2.103(2)	OwCu1N4	99.19(8)	Cu1N3	2.111(3)	O5Cu1N5	98.50(13)
Cu1N4	1.952(2)	OwCu1Se1	94.85(5)	Cu1N5	1.953(3)	O5Cu1N6	97.17(14)
Cu1Se1	2.7371(4)	N1Cu1N3	82.47(8)	Cu1N6	1.946(4)	N3Cu1N5	82.50(13)
		N1Cu1N4	159.49(9)	Cu1S1	2.660	N3Cu1N6	82.45(14)
		N3Cu1N4	82.41(8)			N5Cu1N6	156.09(15)
		N1Cu1Se1	85.59(6)			N3Cu1S2	85.71
		N3Cu1Se1	88.16(6)			N5Cu1S2	90.95
		N4Cu1Se1	107.69(6)			N6Cu1S2	106.34
						O5Cu1S2	92.46
						O6Cu1S2	145.28
						O6Cu1N3	128.20
						O6Cu1N5	87.08
						O6Cu1N6	87.72

4.4 Estudios de reactividad

Los sistemas modelo de las monooxigenasas dependientes de Cu desarrollados en este trabajo se estudiaron como agentes activantes de oxígeno y de enlaces C-H, de manera análoga a las enzimas que se pretende modelar;¹¹ como ya se discutió previamente (capítulo 2) se utilizaron las metodologías ya establecidas en literatura para este fin, como el uso de disolventes apróticos y baja temperatura. De manera general los complejos de Cu(I) se hicieron reaccionar con O₂ en THF y los complejos de Cu(II) con H₂O₂ en presencia de Et₃N. Ambas reacciones se monitorearon con un equipo de espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) acoplado a un criostato.

4.4.1 Reactividad de complejos Cuprosos

Estudios previos con **L**₁ revelaron la generación catalítica del anión superóxido (O₂^{•-}), adicionalmente mediante RPE se observó la señal característica de este radical;⁶ esta evidencia nos permitió concluir que los sistemas modelo generados con la serie de ligantes aquí reportada **L**_{N3Y} (Y = S ó Se), pueden activar O₂ y presentar una reactividad similar a las monooxigenasas dependientes de Cu. El valor de potencial redox obtenido para el par redox Cu^{2+/+} con **L**_{N3Y} es otro indicativo de la reactividad de los sistemas modelo, el cual se puede relacionar con la energía libre de reacción (ΔG) entre los complejos cuprosos y O₂, mediante la ecuación 4.1;¹² donde *n* es el número de electrones intercambiados en la reacción redox, *F* es la constante de Faraday (96485 C mol⁻¹) y ΔE la diferencia de potencial entre las reacciones de oxidación y reducción.

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad \text{Ecuación 4.1}$$

De la ecuación 4.1 podemos concluir que si se obtiene un ΔE negativo la reacción redox será termodinámicamente desfavorable y si este valor es positivo la reacción es favorable. En el caso de los sistemas modelo desarrollados en este trabajo, al aplicar ésta ecuación obtenemos que las reacciones de media celda son:

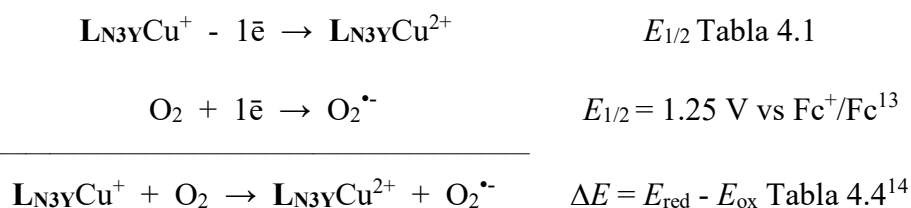


Tabla 4.4. Valores de ΔE y ΔG para los sistemas modelo **L**_{N3Y}

Sistema modelo	ΔE (V)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
L ₁ Cu	1.41	-136
L ₂ Cu	1.43	-137.5
L ₃ Cu	1.44	-139
L _{Se} Cu	1.38	-133

Los valores presentados en la Tabla 4.4 indican que la reacción de transferencia electrónica entre los complejos cuprosos y O₂ es termodinámicamente favorable con los cuatro sistemas modelo aquí presentados.

Para obtener mayor evidencia de lo anterior, disoluciones de concentración conocida de complejos cuprosos en THF fueron preparadas en celdas tipo Schlenk para determinar su espectro de UV-vis a -80°C. Posteriormente se les burbujeó O₂ y se midió el espectro nuevamente, observándose la aparición de una señal en $\lambda \sim 340$ nm ($\epsilon \sim 2000$ M⁻¹ cm⁻¹) la cual de acuerdo a la literatura se asignó inicialmente a la formación de un aducto Cu-O₂ tipo superoxo enlazado de forma lateral (Figura 4.10).¹⁵ Una vez generada la especie se burbujeó Ar y no se observó cambio en la señal, lo que indica que la formación de dicha especie no es reversible bajo las condiciones de trabajo. Después de un tiempo de 2 horas aproximadamente no se observaron cambios en el espectro, evidenciando la estabilidad de la especie Cu-O₂ que además fueron silenciosas en RPE.

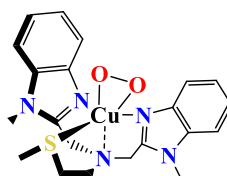


Figura 4.10. Espectro UV-vis del complejo $[\text{L}_2\text{CuO}_2^{\bullet-}]^+$ en THF a -80°C

Sin embargo, características espectrales similares se han reportado para complejos tipo μ - $\eta^2\eta^2$ peroxo Cu₂ con ϵ mayores ($\sim 20\,000$ M⁻¹ cm⁻¹),¹⁶ por lo que no se descartó la posibilidad de que se pudiera estar formando. Se ha descrito que dicha especie puede encontrarse en equilibrio en disolución con la especie bis- μ -oxo Cu₂ y que se puede desplazar dicho equilibrio hacia la especie bis- μ -oxo ($\lambda \sim 420$ nm) cuando se añaden ligantes coordinantes por oxígeno.¹⁷ Para descartar esta posibilidad, una vez identificada la formación del aducto Cu-O₂ con los sistemas modelos aquí desarrollados se añadieron a las disoluciones 3 equivalentes de benzoato de potasio (PhCOO⁻) o metansulfonato de tetrametilamonio (CH₃SO₃⁻) para probar ésta hipótesis; sin embargo, no se observó cambio alguno en el espectro de UV-vis (Figura 4.10), descartando la presencia de otras especies en equilibrio en las disoluciones estudiadas.

Con la finalidad de obtener información de la estructura electrónica de los aductos Cu-O₂ propuestos, se realizaron cálculos DFT y TD-DFT utilizando el software ORCA. Se consideraron especies mono- y dinucleares con el brazo de tioéter coordinado y descoordinado (Figura A44 – Figura A55), en dos estados electrónicos (singlete y triplete). La optimización geométrica de las estructuras dinucleares tipo μ - $\eta^2\eta^2$ peroxo Cu₂ reveló como la estructura más estable el estado singlete con S descoordinado. Al

comparar los espectros electrónicos calculados de las especies dinucleares con los obtenidos experimentalmente (Figura A46 y Figura A47) se confirmó que no se trata de una especie dinuclear debido a la notable diferencia. Por lo tanto, se descartó la formación de esta especie tanto experimental como teóricamente (*vide supra*).

En el caso de los complejos mononucleares, la optimización geométrica de las especies con el tioéter coordinado resultó en complejos en estado electrónico triplete, mientras que el singlete presentó mayor energía (17 kJ mol⁻¹);¹⁸ el espectro electrónico calculado de estas especies difiere drásticamente de los obtenidos experimentalmente (Figura A50). Las especies mononucleares con el brazo de tioéter descoordinado resultó en complejos tipo superoxo coordinado de forma lateral (Cu(II)- η^2 -O₂^{•-}) que fueron analizadas energéticamente en estados electrónico singlete y triplete. Al comparar los espectros electrónicos calculados (TD-DFT) con los experimentales (línea negra), se concluyó que la especie Cu(II)- η^2 -O₂^{•-} formada con los sistemas modelo presenta estado electrónico triplete (Figura 4.11) con señales predichas en $\lambda \sim 340$ nm y transiciones $d-d \lambda \sim 740$ nm (línea roja). Por el contrario, el espectro simulado de las especies singlete predice una banda intensa alrededor de 300 nm (línea azul), además la optimización geométrica de los sistemas modelados reveló como más estable a la estructura en estado electrónico triplete que la estructura en estado electrónico singlete por 6 kJ mol⁻¹. Adicionalmente los valores de J (constante de intercambio y correlación) para los sistemas modelados [L₁CuO₂]⁺, $J = +250$ cm⁻¹; [L₂CuO₂]⁺, $J = +231$ cm⁻¹ (solapamiento espacial de los átomos que tienen los electrones desapareados, $S = 0.568$ y $S = 0.570$, respectivamente, BS-DFT) indican un acoplamiento ferromagnético entre los dos electrones (Cu²⁺ y O₂^{•-}) lo que es consistente con el estado electrónico triplete presentado por los complejos de Cu con L_{N3Y}.¹⁹

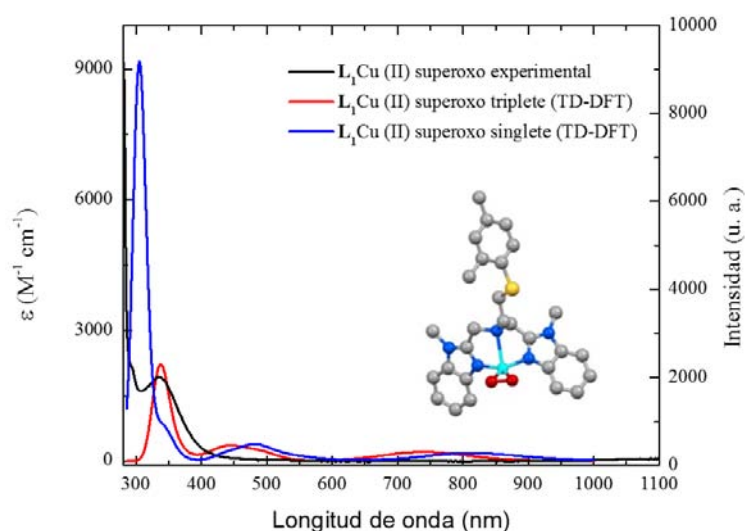


Figura 4.11. Espectro experimental UV-vis de [L₁Cu]⁺ después de burbujear O₂ en THF a -80 °C y espectros simulados en estado electrónico singlete y triplete con el brazo de tioéter descoordinado optimización geométrica superoxo lateral [L₁Cu(II)- η^2 -O₂]⁺. Figura insertada: Estructura optimizada del complejo cúprico superoxo triplete [L₁Cu(II)- η^2 -O₂]⁺

El diagrama de orbitales moleculares para los complejos cúpricos superoxo tripletes [L₁Cu(II)- η^2 -O₂]⁺ y [L₂Cu(II)- η^2 -O₂]⁺ (Figura A54 y Figura A55) confirma una vez más una interacción ferromagnética, esto debido a la ortogonalidad que forman los orbitales que contienen a los dos electrones; un electrón

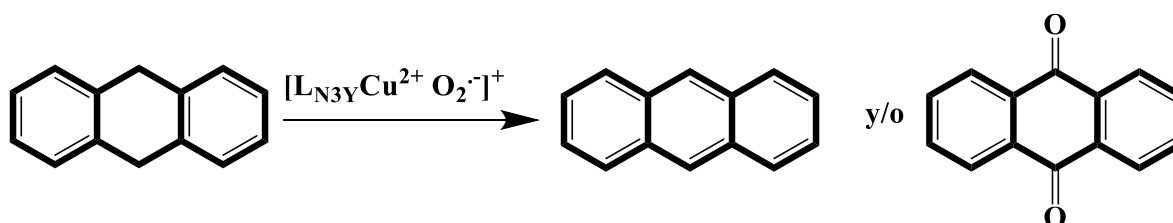
se encuentra en el orbital pi de antienlace (π_v^*) del fragmento superoxo $O_2^{\bullet-}$, mientras que el otro electrón se encuentra en el orbital de antienlace formado por los orbitales dx^2-y^2 del Cu y el orbital π_σ^* del $O_2^{\bullet-}$. Sin embargo, hasta este trabajo los reportes de complejos modelos cúprico superoxo coordinados de forma lateral se habían asociado a estados electrónicos singlete.²⁰ La optimización geométrica de los sistemas modelo $[L_1Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ y $[L_2Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ reveló una distancia de enlace Cu-O (hacia el átomo de O más alejado) de 1.97 Å, indicativo de una interacción débil (promedio de enlace con otros sistemas modelo 1.84 Å). La distancia de enlace Cu-O predicha por los cálculos DFT es adscrita la capacidad σ -donadora de los grupos bencimidazoilo. Como consecuencia de esto la interacción de enlace y antienlace entre los orbitales dx^2-y^2 del Cu y el orbital π_σ^* del $O_2^{\bullet-}$ es menor que el valor de la energía de apareamiento de los electrones, resultando en el estado electrónico triplete.

La estructura optimizada de $[L_1Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ revela al centro metálico en una geometría de pirámide de base cuadrada, las posiciones ecuatoriales la ocupan los dos átomos de oxígeno del fragmento superoxo y los átomos de N de los grupos bencimidazol, el promedio de distancia de enlace Cu-N bencimidazol es de 1.96 Å, mientras que en la posición axial se encuentra el N de la amina central con una distancia de 2.38 Å hacia el cobre (Figura insertada 4.11).

Como ya se mencionó en el capítulo 2, los complejos tipo superoxo se han propuesto como intermediarios reactivos en la reacción de abstracción de átomo de hidrógeno (AAH) de las enzimas monooxigenasas dependientes de Cu.⁷ Con la finalidad de probar esta reactividad con los complejos modelo con L_{N3Y} , se utilizó como agente donador de átomos de hidrógeno el 9,10-dihidroantraceno (DHA), observándose una disminución en la intensidad de la banda de transferencia de carga del $O_2^{\bullet-} \rightarrow Cu^{2+}$ ($\lambda \sim 340$ nm) cuando se agregaron 10 eqv. del sustrato a -60 °C en disoluciones 0.3 mM de los complejos cúpricos-superoxo en THF, con un comportamiento cinético de pseudo-primerorden ($L_1 k = 7 \times 10^{-4} s^{-1}$, $t_{1/2} = 1664$ s; $L_2 k = 0.002 s^{-1}$, $t_{1/2} = 315$ s; Figura 4.12 y Figura A56).

Figura 4.12. izq.) Espectro UV-Vis de $[L_2Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ con 9,10-DHA en THF a -60 °C. der.) Gráfica de cinética de pseudo-primerorden de la desaparición de la banda de 340 nm del complejo $[L_2Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ con 9,10-DHA en THF a -60 °C, $R = 0.98$

Con la finalidad de analizar los productos formados como consecuencia de la desaparición de la banda en 340 nm, se hicieron extracciones de las mezclas de reacción con CH_2Cl_2 como fase orgánica y una disolución acuosa de Na_2EDTA para eliminar el cobre. La fase orgánica reveló mediante un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) la formación de antraceno y antraquinona (Esquema 4.4) como productos de oxidación (Figura A57 y Figura A58), en el caso de L_1 los productos de oxidación se obtuvieron en una proporción 1:1 mientras que en el caso de L_2 se observaron en una proporción de 7:3. De este estudio se concluyó que L_2 es más selectivo en la abstracción de hidrógeno, sin llevar a la sobreoxidación del producto.



Esquema 4.4. Reacción entre $[\text{LN}_3\text{YCu}(\text{II})-\eta^2\text{-O}_2]^+$ y 9,10-DHA

Intentos por obtener la estructura en estado sólido del complejo cúprico superoxo con L_1 dieron lugar a la formación de un complejo dinuclear con grupos hidroxilo puente (Figura 4.13), evidenciando la AAH desde disolvente (THF); ésta reactividad se comprobó también mediante espectroscopía UV-vis a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (L_2 $k = 1.78 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$; $t_{1/2} = 3894\text{ s}$) en presencia únicamente del disolvente como sustrato. La estructura en estado sólido revela a los centros de Cu^{2+} en una geometría de pirámide de base cuadrada ($\tau = 0.02$, Figura 4.13), el tioéter no se coordina en presencia de un grupo de átomos donadores N_3O_2 como se predice por cálculos DFT; las distancias y ángulos de enlace seleccionados se reportan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Distancias y ángulos seleccionados de $[\text{L}_1\text{Cu}-(\mu\text{-OH})]_2^{2+}$

	Distancia (Å)		Ángulos ($^\circ$)	
$[\text{L}_1\text{Cu}-(\mu\text{-OH})]_2^{2+}$				
O1-H1	0.851(19)	O1-Cu1-O1*	79.48(13)	
Cu1-O1	1.913(2)	N1-Cu1-N3	96.9(1)	
Cu1-O1*	1.917(3)	N1-Cu1-N5	75.3(1)	
Cu1-N1	2.006(3)	N3-Cu1-N5	77.0(1)	
Cu1-N3	1.985(2)	N1-Cu1-O1	162.3(1)	
Cu1-N5	2.460(3)	N3-Cu1-O1	93.3(1)	
Cu1-S1	6.01(1)	N1-Cu1-O1*	92.3(1)	
O1-O1*	2.449	N3-Cu1-O1*	168.5(1)	

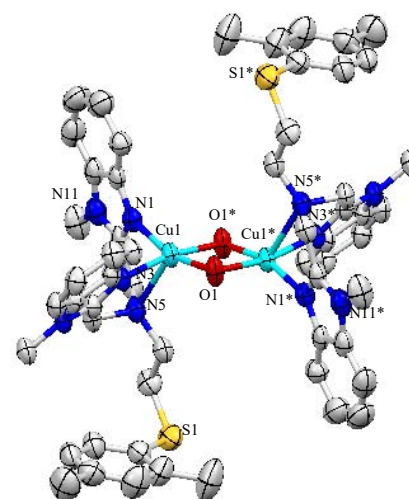
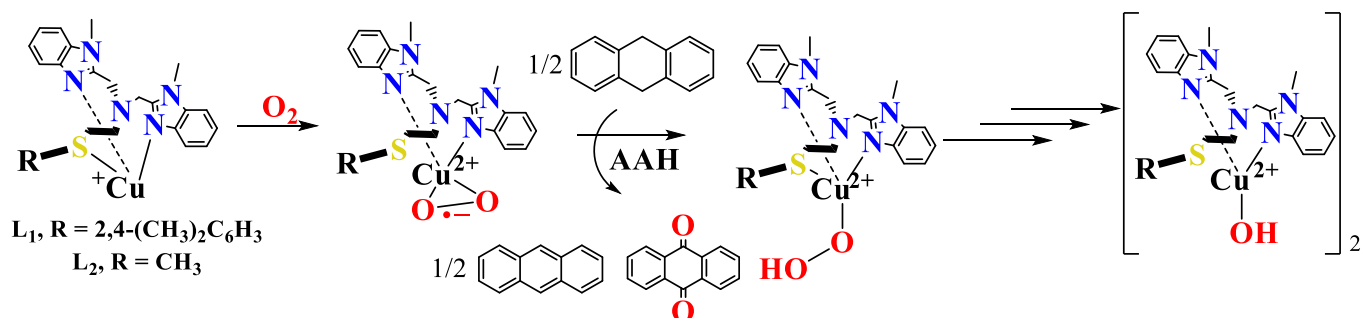


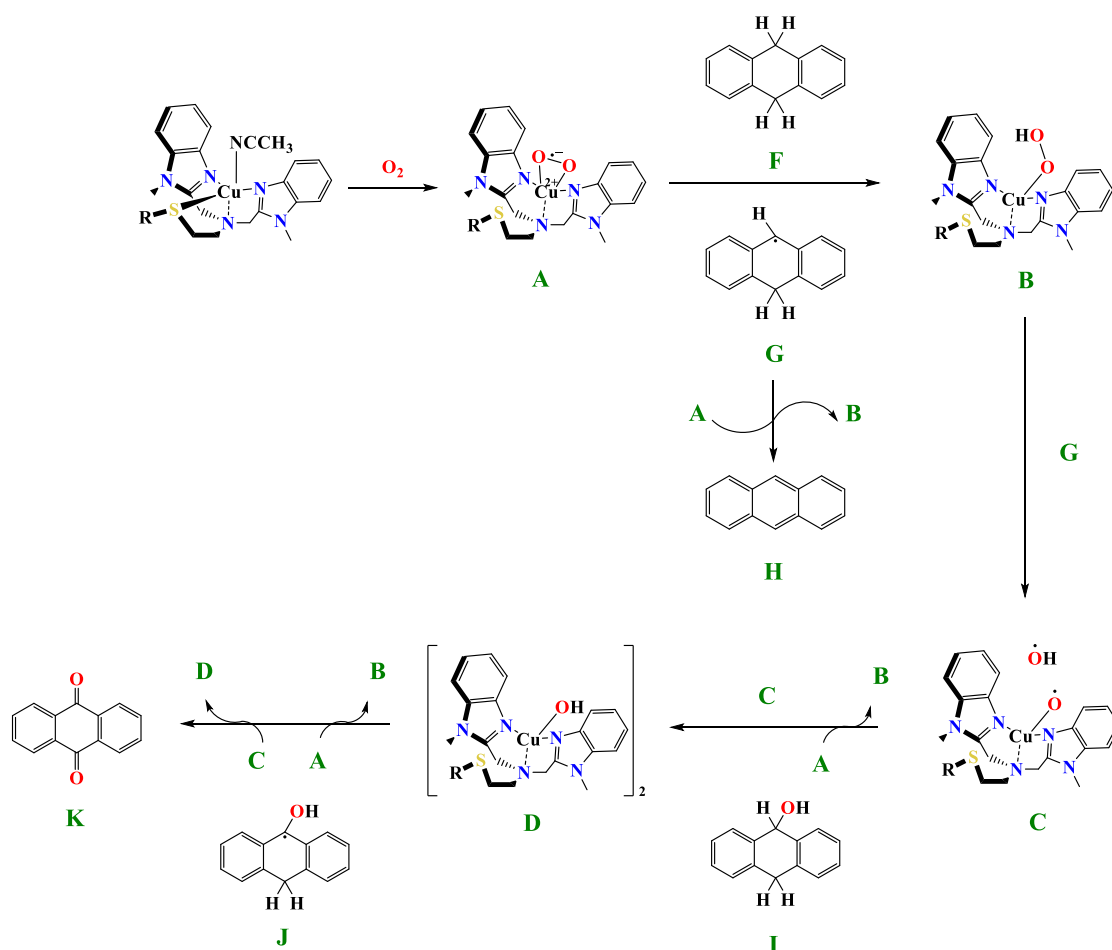
Figura 4.13. Diagrama Mercury de $[\text{L}_1\text{Cu}-(\mu\text{-OH})]_2^{2+}$ al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y contraíón se omiten por claridad

Con los resultados obtenidos de las reacciones de los complejos cuprosos con **L1** y **L2** frente a O_2 y activación de enlaces C-H mediante AAH, se propone el siguiente mecanismo de reacción (Esquema 4.5).²¹



Esquema 4.5. Mecanismo de reacción propuesto para la activación de O_2 y oxidación de 9,10-DHA por los complejos modelo con ligantes L_{N3Y}

Los complejos cuprosos coordinan O_2 , una vez coordinado ocurre un proceso de transferencia electrónica del Cu^+ al O_2 formándose el complejo cúprico-superoxo coordinado de forma lateral $[L_{N3Y}Cu(II)-\eta^2-O_2]^+$ (Esquema 4.6, A).



Esquema 4.6. Obtención de antraceno y antraquinona con los complejos cúpricos superoxo con L_{N3Y}

Esta especie lleva a cabo la reacción de AAH del sustrato modelo (F), generando el hidroperoxo complejo (B) y un radical en el antraceno (G) que queda muy estabilizado por la conjugación de la molécula (otro mol del complejo cúprico-superoxo abstrae otro átomo de hidrógeno generando el antraceno (G → H), de ahí la estequiometría señalada para la reacción en el Esquema 4.5).

El complejo hidroperoxo es el responsable de la generación de la antraquinona (K) al insertar los átomos de O en las posiciones 9 y 10 del sustrato, posiblemente pasando por el intermediario cuprilo (C) como se propone para las enzimas (capítulo 1) y generando como producto final el hidroxocomplejo (D), mismo que fue caracterizado en estado sólido por difracción de rayos X.

En el caso de los complejos cuprosos con **L₃** y **L_{Se}** pruebas preliminares muestran un comportamiento similar, con la formación de una especie cobre-oxígeno y una banda de transferencia de carga en $\lambda \sim 340$ nm ($\epsilon \sim 2000$ M⁻¹ cm⁻¹, Figura 4.14). Los resultados se están ampliando para comparar directamente con lo observado con los ligantes **L₁** y **L₂**.



Figura 4.14. izq.) Espectro UV-vis de $[\mathbf{L}_3\text{Cu}]^+ + \text{O}_2$ en THF a -80 °C, der.) Espectro UV-vis de $[\mathbf{L}_{\text{Se}}\text{Cu}]^+ + \text{O}_2$ en THF a -80 °C

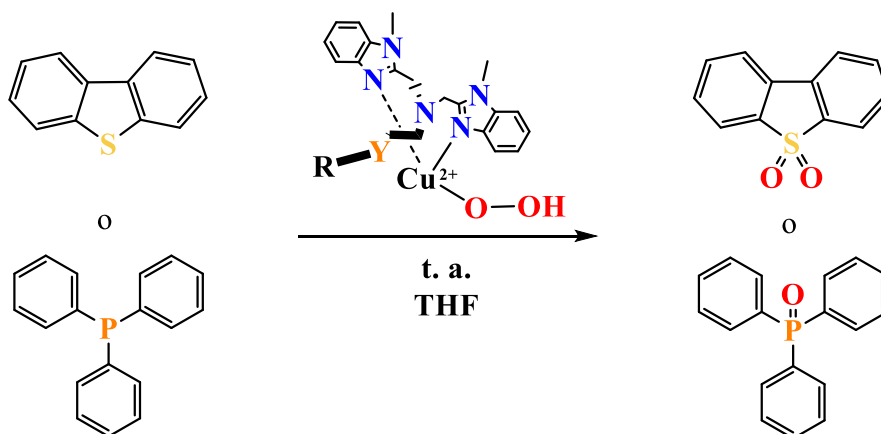
4.4.2 Reactividad de complejos Cúpricos

Se ha descrito en literatura que los complejos cúpricos reaccionan con H_2O_2 en presencia de Et_3N ,¹⁶ generando los complejos hidroperoxo correspondientes. En este contexto se probó la reactividad de los complejos cúpricos de **L_{N3Y}**: a disoluciones del complejo en THF a temperatura ambiente se le añadieron 10 eqv. de una disolución 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2:\text{Et}_3\text{N}$; al medir el espectro UV-vis de las mezclas de reacción se evidenció la aparición de nuevas señales (**L₁** $\lambda = 324$ nm, $\epsilon = 1099$ M⁻¹ cm⁻¹; *d-d* $\lambda = 712$ nm, $\epsilon = 145$ M⁻¹ cm⁻¹; **L₂** $\lambda = 305$ nm, $\epsilon = 1780$ M⁻¹ cm⁻¹; *d-d* $\lambda = 737$ nm, $\epsilon = 115$ M⁻¹ cm⁻¹; Figura 4.15); estas se asignaron a la banda de transferencia de carga $\text{OOH} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$.²² Los hidroperoxo complejos se analizaron también por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE) en disoluciones de acetona a 77 K; ambos complejos presentaron la señal de Cu^{2+} en un ambiente axial (**L₁**: $g_{\parallel} = 2.273$; $g_{\perp} = 2.053$; $A_{\parallel} = 157$ G. **L₂**: $g_{\parallel} = 2.256$; $g_{\perp} = 2.056$; $A_{\parallel} = 169$ G, Figura A59 y Figura A60).

Masuda y colaboradores²² reportaron la síntesis y caracterización de un hidroperoxo complejo con el cual exploraron la reactividad frente a sustratos orgánicos con heteroátomos (sulfuros orgánicos), obteniendo como productos de oxidación los sulfóxidos correspondientes. De manera similar se decidió probar la capacidad de oxidación de sustratos orgánicos con los complejos hidroperoxo generados, es decir, evaluar la capacidad de transferencia de átomo de oxígeno (TAO), con diferentes fosfinas, dibenzotiofeno y tioanisol como sustratos. Para ello se prepararon disoluciones de los complejos en THF para las reacciones en una relación molar 1:1:0.1 de sustrato/oxidante/complejo respectivamente; como oxidante se utilizó una disolución de H₂O₂/Et₃N en relación 1:1 entre dichos reactivos. Se probaron diferentes condiciones de reacción, tanto a temperatura ambiente (t.a.) como a baja temperatura (-10 °C), además se llevaron a cabo reacciones blanco, es decir, sin complejo.



Figura 4.15. izq.) Espectro UV-vis de [L₁Cu]²⁺ + H₂O₂/Et₃N en THF a t.a., der.) Espectro UV-vis de [L₂Cu]²⁺ + H₂O₂/Et₃N en THF a t.a.



Esquema 4.7. Reacciones de oxidación de sustratos con heteroátomos con hidroperoxo complejos con L_{N3Y}

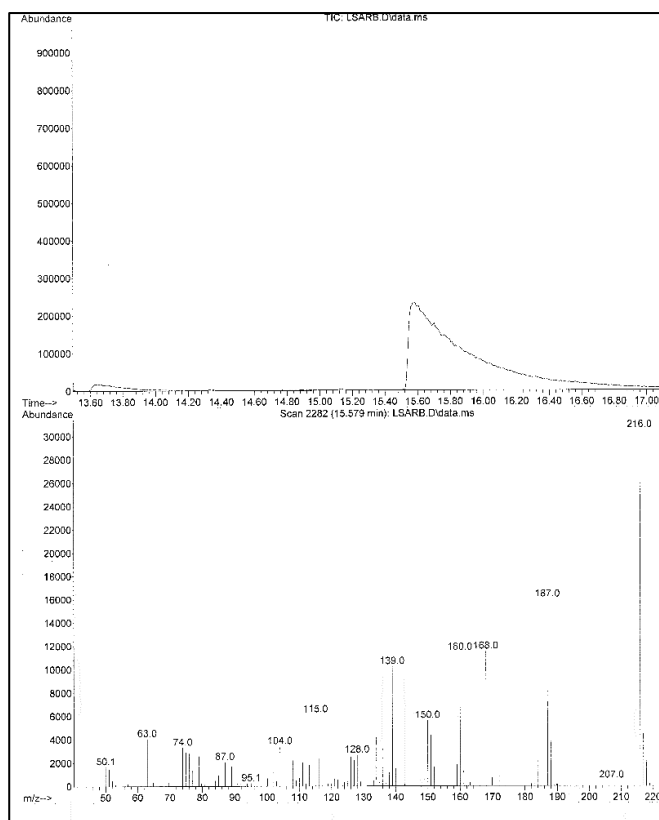


Figura 4.16. Cromatograma y espectro de masas de los productos de la reacción entre $[L_1Cu]OTf_2$ y DBT

Con el sustrato dibenzotiofeno (DBT) se probaron los complejos cúpricos con los ligantes L_1 , L_2 y L_{se} bajo las condiciones descritas anteriormente. Después de terminada la reacción, se hicieron separaciones de fases orgánica (CH_2Cl_2) y acuosa (saturada con Na_2EDTA); al analizar la fase orgánica mediante GC-MS se encontró en todos los casos la formación de la sulfona (tiempo de retención = T.R. 15.4 min., $m/z = 216$) en un 85 %, sin que se observara la presencia del sulfóxido. Esto nos permite concluir que los complejos son selectivos hacia el producto de doble oxidación (Esquema 4.7, Figura 4.16 y Figura A63).

En el caso de las fosfinas PPh_3 y $HPPH_2$ se encontró formación del óxido de fosfina correspondiente con L_2 y L_3 (Esquema 4.7), así como en el caso de las reacciones blanco, es decir la oxidación ocurre con H_2O_2 sin la necesidad del complejo, de acuerdo a la caracterización por ^{31}P -RMN (Figura A61). En el caso del tianisol se observó un ligero desplazamiento de 0.1 ppm a campo bajo en la señal en 2.37 ppm, que corresponde al grupo metilo unido al átomo de azufre con los complejos cúpricos de L_2 y L_3 (Figura A62), mientras que para el blanco la señal aparece en 2.36 ppm. Este desplazamiento es atribuido a la formación del sulfóxido del tianisol mediante la TAO mediada por los complejos, sin embargo, este experimento no es concluyente, las pruebas para descartar o confirmar lo anterior se están realizando (manuscrito en preparación).

Los resultados obtenidos muestran la capacidad de oxidación de los complejos Cu^{2+} -OOH hacia compuestos con heteroátomos: en el caso de las fosfinas se sabe que estos compuestos son fácilmente oxidables esto puede explicar la formación del óxido incluso en ausencia de los complejos, no así en el caso del tianisol y el DBT donde la oxidación no ocurre sin los complejos. Para el caso del DBT

los resultados muestran selectividad de los complejos estudiados hacia la formación de un solo producto de oxidación. Sin embargo, se requiere una caracterización más detallada de estas reacciones para proponer un posible mecanismo de reacción de los complejos. Por otro lado, los sistemas modelo con LN_3Y muestran una reactividad similar a la presentada por las enzimas monooxigenasas dependientes de Cu cuando los complejos cuprosos son expuestos a O_2 a baja temperatura, generando las especies putativas $\text{Cu}^{2+}\text{-O}_2^{\cdot-}$. Los complejos aquí reportados ponen de manifiesto su capacidad para la abstracción de hidrógeno del sustrato modelo 9,10-DHA, así como la importancia del enlace Cu-S presente en el sitio activo de las monooxigenasas, que podría modular la reactividad de dichos sitios activos actuando como ligante hemilábil durante el ciclo catalítico.

Referencias

- (1) Prigge, S. T.; Mains, R. E.; Eipper, B. A.; Amzel, L. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1236.
- (2) Amosova, S. V.; Makhaeva, N. A.; Martynov, A. V.; Potapov, V. A.; Steele, B. R.; Kostas, I. D. *Synthesis (Stuttg)*. **2005**, *10*, 64.
- (3) Ghosh, S.; Tochtrop, G. P. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1723.
- (4) Kitajima, N.; Moro-oka, Y. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 737.
- (5) Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.
- (6) Castillo, I.; Ugalde-Saldívar, V. M.; Rodríguez Solano, L. A.; Sánchez Eguía, B. N.; Zeglio, E.; Nordlander, E. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 9394.
- (7) Liu, J. J.; Diaz, D. E.; Quist, D. A.; Karlin, K. D. *Isr. J. Chem.* **2016**, *56*, 738.
- (8) Li, W.; Kagan, G.; Hopson, R.; Williard, P. G. *J. Chem. Educ* **2011**, *88*, 1331.
- (9) Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Van Rijn, J.; Verschoor, G. C. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 1349.
- (10) Vargas-Pineda, D. G.; Guardado, T.; Cervantes-Lee, F.; Metta-Magana, A. J.; Panell, K. H. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 960.
- (11) Klinman, J. P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3013.
- (12) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Fundamentals and Applications*, 2nd Ed.; Harris, D.; Swain, E.; Robey, C. . A. E., Ed.; John Wiley & Sons: United States of America, **2001**.
- (13) D. Vasudevan, H. W. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *192*, 69.
- (14) Atkins, P. W. *Inorganic Chemistry*, Fifth.; Atkins, P.; Overton, T.; Rourke, J.; Weller, M.; Armstrong, F.; Hagerman, M., Ed. Oxford University Press, Great Britain, **2010**.
- (15) Fujisawa, K.; Tanaka, M.; Moro-oka, Y.; Kitajima, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *12*, 12079.
- (16) Karlin, K. D.; Itoh, S. *Copper-Oxygen Chemistry*, First Ed.; Karlin, K. D. and Itoh, S., Ed.; WILEY: New Jersey, **2011**.
- (17) Maiti, D.; Woertink, J. S.; Sarjeant, A. A. N.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 3787.
- (18) Ginsbach, J. W.; Peterson, R. L.; Cowley, R. E.; Karlin, K. D.; Solomon, E. I. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12872.
- (19) Comba, P.; Hausberg, S.; Martin, B. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 6751.
- (20) Donoghue, P. J.; Gupta, A. K.; Boyce, D. W.; Cramer, C. J.; Tolman, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15869.
- (21) Sánchez-Eguía, B. N.; Flores-Alamo, M.; Orio, M.; Castillo, I. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11134.
- (22) Fujii, T.; Naito, A.; Yamaguchi, S.; Wada, A.; Funahashi, Y.; Jitsukawa, K.; Nagatomo, S.; Kitagawa, T.; Masuda, H. *Chem. Commun.* **2003**, *1*, 2700.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

La serie de ligantes L_{N3Y} son una buena aproximación estructural del sitio activo Cu_M de las monooxigenasas dependientes de Cu, incorporando bencimidazoles que imitan a los imidazoles de las histidinas, además de grupos calcogenoéter que imitan al grupo tioéter de la metionina. Los grupos funcionales contenidos en la serie de ligantes L_{N3Y} también modulan electrónicamente al par redox $Cu^{2+/+}$ confiriéndoles un valor de potencial que los hace más electrofílicos con respecto a sus análogos con donadores tipo piridínico; esto predispone su reactividad hacia la activación de O_2 y enlaces C-H de sustratos orgánicos de manera análoga a las monooxigenasas.

Los ligantes L_{N3Y} confieren características únicas a los complejos de Cu^+ y Cu^{2+} , estabilizándolos tanto en disolución (2D-DOSY RMN; ESI-MS), como en estado sólido (Rayos X). Para los complejos cúpricos la resonancia paramagnética electrónica (RPE) confirma en la mayoría de los casos su naturaleza axial. En términos generales, la serie de ligantes L_{N3Y} permiten al centro metálico la plasticidad necesaria para intercambiar de estado de oxidación, dando lugar a la formación de un aducto Cu-superoxo con características electrónicas no descritas anteriormente: enlazado de forma lateral al Cu, en estado triplete y activante de enlaces C-H (UV-vis a baja temperatura). Los cálculos de estructura electrónica confirman la formación de un intermediario superoxo en estado electrónico triplete en el cual el grupo tioéter actúa como ligante hemilábil, saliendo de la esfera de coordinación cuando se coordina el O_2 .

Las pruebas de reactividad frente al sustrato modelo 9,10-DHA, además del THF revelaron que los complejos modelo son capaces de llevar a cabo oxidación de enlaces C-H ($FE = 78 \text{ kcal mol}^{-1}$ y 92 kcal mol^{-1} para 9,10-DHA y THF respectivamente)¹ obteniendo como productos de oxidación el antraceno y antraquinona, y presumiblemente 2-hidroxi-THF en el segundo caso. En la oxidación de 9,10-DHA con L_2 se observó una mayor selectividad hacia la formación del antraceno con respecto a la antraquinona, siendo así el más cercano en estructura y reactividad al Cu_M de las monooxigenasas de cobre.

Las reacciones de TAO con complejos cúpricos frente a fosfinas, DBT y tioanisol dieron lugar a los productos de oxidación esperados y en ninguno de los casos se observó oxidación del brazo calcogenoéter del ligante. Estas observaciones nos permiten plantear que los complejos cuprosos activantes de O_2 actúan como agentes de AAH en reacciones de transferencia de un electrón a la vez, mientras que los complejos cúpricos activantes de H_2O_2 actúan como agentes de TAO frente a heteroátomos, participando de esta manera en oxidaciones por dos electrones. Finalmente, los sistemas modelo desarrollados en este trabajo revelan la importancia del enlace del grupo tioéter presente en el sitio activo Cu_M de las enzimas monooxigenasas, modulando el potencial redox del centro metálico, además de tener la posibilidad de actuar como ligante hemilábil durante la catálisis.

Referencias

- (1) Matsumoto, T.; Ohkubo, K.; Honda, K.; Yazawa, A.; Furutachi, H.; Fujinami, S.; Fukuzumi, S.; Suzuki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9258.

Capítulo 6

PERSPECTIVAS

Para el complemento de este trabajo se requieren numerosos experimentos, aunque los inmediatamente necesarios e importantes para profundizar en los estudios sobre el comportamiento de los sistemas modelo con los ligantes L_{N3Y} se enuncian a continuación:

Se requiere repetir las pruebas de reactividad frente a O_2 con los ligantes L_3 y L_{Se} , una vez confirmada experimentalmente la formación de la especie reactiva se requiere la confirmación mediante cálculos de estructura electrónica de las especies Cu^{2+} -superóxido propuestas.

Con la serie de ligantes se requiere un estudio detallado del efecto isotópico con los sustratos modelo DHA y DHA- d_4 ; las pruebas preliminares con L_1 y L_2 indican un KIE de ~ 10 ; dicho valor debe corroborarse y verificar la generalidad de este resultado que implicaría a la abstracción de átomo de hidrógeno como el paso limitante de la velocidad de reacción.

La generación de los complejos hidropéroxido a baja temperatura con L_{N3Y} , así como su reactividad frente a sustratos orgánicos con heteroátomos (fosfinas, tioéteres), y caracterización de los productos obtenidos, aportaría información sobre el mecanismo de reacción de TAO.

La caracterización por 2D-DOSY RMN de los complejos cuprosos con L_3 y L_{Se} , así como su caracterización en estado sólido, corroboraría sobre todo en el segundo caso la capacidad del selenoéter de coordinarse al Cu^+ , así como su potencial para actuar como puente.

Caracterización mediante ^{77}Se -RMN de los complejos cuproso y cúprico con L_{Se} aportaría información sobre su posible utilidad como técnica de identificación en este tipo de estudios.

Pruebas de reactividad con los complejos activantes de O_2 frente a sustratos orgánicos con diferentes valores de fuerza de enlace C-H establecerían un rango de potenciales sustratos susceptibles de ser hidroxilados por estos sistemas.

Con L_3 estudio de reactividad del complejo cuproso frente a O_2 para observar hidroxilación del C bencílico contenido en la estructura del ligante.

Pruebas de cinética electroquímica para utilizarlos como electrocatalizadores.

Capítulo 7

SECCIÓN EXPERIMENTAL

7.1 General

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico de proveedores comerciales y se utilizaron sin tratamiento previo, salvo que se indique lo contrario; el 1-metil-2-clorometilbencimidazol se sintetizó en el laboratorio del Dr. José Ignacio Regla Contreras en la Facultad de Estudios Superiores - Zaragoza. Los compuestos sensibles al aire se manejaron mediante técnicas Schlenk en línea de vacío/N₂, así como en una caja de guantes MBraun. Los disolventes utilizados se obtuvieron de proveedores comerciales y en los casos necesarios se destilaron por métodos convencionales. Para los análisis de RMN se utilizaron CDCl₃ 99.8 % D, CD₂Cl₂ 99.8 % D, CD₃CN 99.8 % D, THF-*d*₈ 99.8 % D, obtenidos de Sigma-Aldrich o Cambridge Isotope Laboratories.

7.2 Equipos

Punto de Fusión (p.F.): Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Electrothermal Mel-Temp y no fueron corregidos.

Espectrofotometría Infrarroja (IR-KBr): Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 entre 4000 y 400 cm⁻¹ con disoluciones de cloruro de metileno o como pastillas de KBr.

Espectrofotometría Ultravioleta visible (UV-vis): Los experimentos UV-visibles a baja temperatura se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Aligent modelo 8453 equipado con un criostato Unisoku USP-203-A refrigerado con nitrógeno líquido usando una celda Schlenk modificada de 1 cm de longitud óptica.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Los espectros de RMN se obtuvieron a 300 (¹H) y 75 (¹³C) MHz con un espectrómetro JEOL Eclipse 300 y un espectrómetro Bruker Advance DRX respectivamente, utilizando la señal residual de disolvente TMS como referencia interna o empleando los protones residuales del disolvente (TMS δ = 0.00, CDCl₃ δ = 7.26 ppm).

Espectrometría de masas: Los espectros de masas (FAB – Bombardeo de átomos rápido) se obtuvieron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-SX-102A con un voltaje de aceleración de 10keV, con una matriz de alcohol nitrobenílico y átomos de Xenon a 6keV, en un espectrómetro Bruker Daltonics Esquire 6000 con una trampa de iones (ESI-MS – Espectrometría de Masas por Electrospray), o en un espectrofotómetro JEOL The AccuTOF JMS-T100LC (DART - Análisis directo en tiempo real).

Análisis Elemental: Los análisis elementales fueron obtenidos con un aparato Exeter Analytical CE-440.

Resonancia Paramagnética Electrónica: Los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) se adquirieron en tubos de cuarzo a temperatura ambiente o 77 K con espectrómetro JEOL JES-TE300 de 1.4 T de campo magnético que opera en banda X (9.4 GHz).

Difracción de Rayos X de Monocristal: Los monocristales se montaron en un difractorómetro Bruker Smart equipado con un detector de área Apex CCD, o un difusor de Oxford Gemini A Difractorómetro con un detector de área CCD. Los cuadros fueron recolectados por omega scans e integrados con el paquete de software Bruker SAINT usando la celda unitaria apropiada en el caso del difractorómetro anterior¹ y los paquetes de software CRYNALIS PRO y CRYNALIS RED para la recopilación de datos y la integración de datos con estos últimos.² Las estructuras se resolvieron utilizando el programa SHELXS-97,³ y se refinaron por mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 con SHELXL-97.⁴ Los factores R ponderados, R_w y todos los indicadores de ajuste, S, se basaron en F^2 . El criterio observado de ($F^2 > 2\sigma F^2$) se utilizó sólo para el cálculo de los factores R. Todos los átomos que no son de hidrógeno se refinaron con parámetros térmicos anisotrópicos en los ciclos finales de refinamiento. Los átomos de hidrógeno se colocaron en posiciones idealizadas, con distancias C-H de 0,93 Å y 0,98 Å para los átomos de carbono sp^2 y sp^3 , respectivamente. A los parámetros térmicos isotrópicos de los átomos de hidrógeno se les asignaron los valores de $U_{iso} = 1.2$ veces los parámetros térmicos del átomo primario sin hidrógeno. Las figuras de las estructuras cristalinas fueron obtenidas con el programa Mercury versión 1.1.4 para Windows.

Electroquímica: Los estudios de voltamperometría cíclica de barrido se realizaron en la Facultad de Química bajo la asesoría del doctor Víctor Ugalde con atmósfera de nitrógeno en acetonitrilo grado biotecnológico con un potenciostato-galvanostato EG&G Princeton Applied Research modelo 263A, utilizando NBu_4PF_6 (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio) como electrolito soporte a una concentración 0.1 M, empleando como electrodo de trabajo de carbón vítreo ($\phi = 7.1 \text{ mm}^2$), como electrodo de referencia de plata (Ag/solución AgBr), como electrodo auxiliar de platino (Pt/solución NBu_4PF_6). Todos los voltamperogramas se iniciaron desde el potencial de corriente nula ($E_i = 0$) y se hizo el barrido de potencial en ambas direcciones, positiva y negativa, y se obtuvieron a una velocidad de barrido de 0.100 V s^{-1} . De acuerdo con la convención de la IUPAC, el voltamperograma del par ferricinio/ferroceno (Fc^+/Fc) fue obtenido para establecer los valores de potencial de media onda ($E_{1/2}$) de la expresión $E_{1/2} = (E_{ap} + E_{cp})/2$. Para obtener la corriente normalizada para cada complejo, la corriente medida fue dividida por la concentración molar exacta de la especie electroactiva.

Detalles computacionales: Todos los cálculos de estructura electrónica se hicieron con base en la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés), utilizando el programa ORCA.⁵ Las optimizaciones geométricas se hicieron para todos los complejos utilizando el funcional GGA BP86⁶⁻⁸ en combinación con el set de bases TZV/P;⁹ para todos se utilizaron átomos y mediante el aprovechamiento de la aproximación de resolución de la identidad (RI) Split-RI-J¹⁰ con los sets Coulomb.¹¹ Un apropiado aumento de las redes de integración adecuados (Grid4 en la convención ORCA) y criterios de convergencia de SCF. Se realizaron cálculos de frecuencia vibratoria para asegurar que cada optimización de la geometría convergiera a un mínimo real. Los efectos del solvente se tomaron en cuenta de acuerdo a las condiciones experimentales. Se utilizó el disolvente THF ($\epsilon = 7.25$) con el método de solvatación COSMO (conductor-like screening model).¹² Las propiedades ópticas fueron predichas a partir de cálculos de punto único adicionales utilizando el funcional B3LYP^{13,14} junto con el set de bases TZV / P. Las energías de transición electrónica y momentos dipolares para todos los modelos se calcularon usando DFT dependiente del tiempo (TD-DFT)¹⁵⁻¹⁷ dentro de la aproximación Tamm-Dancoff.^{18,19} Para aumentar la eficiencia computacional, se utilizó la aproximación RI²⁰ en el cálculo del término de Coulomb y al menos 40 estados excitados se calcularon en cada caso. Los gráficos de densidad se generaron para cada transición y se visualizaron con el programa Chemcraft.²¹ El análisis energético se llevó a cabo a partir de un solo punto alto spin adicional y Broken Symmetry (BS),²²⁻²⁴ cálculos utilizando el funcional B3LYP el conjunto de bases TZV / P en las geometrías previamente optimizadas. Para el estado de BS, el cálculo de un solo punto se realizó mediante la función de onda de alto espín y el comando BrokenSym (1,1) palabras clave

para generar la función de onda singlete-simetría rota sin restricciones. Las constantes de acoplamiento de cambio isotrópica Heisenberg J se evaluaron desde el estado BS y la fórmula Yamaguchi^{25,26} se utilizó para estimar las constantes de acoplamiento J intercambio basado en la Heisenberg-Dirac-van Vleck Hamiltonian.²⁷⁻³⁰

7.3 Síntesis y caracterización de compuestos

ASAr (2(2,4-dimetilfenil)tioetilamina). En un matraz bola de 100 mL se disolvió 1.48 g (7.2 mmol) de bromohidrato de 2-bromoetilamina en 20 mL de etanol destilado, a ésta solución se adicionó 1 g (7.2 mmol) de Na; en otro matraz se disolvió 1 g (7.2 mmol) de 2,4-dimetilbencenotiol en etanol y a esta mezcla se le añadió 1 g (7.2 mmol) de K_2CO_3 ; éstas soluciones se mezclaron a temperatura ambiente y la reacción se colocó a reflujo por 3 horas. La solución resultante se filtró y acidificó con 1 eqv. de HCl 1M, el producto se aisló como clorhidrato de ASAr.

Rendimiento: 63 %. p.F.: 105-108°C. 1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, 20°C) δ 2.1 (s, 3 H, CH_3 -Ar), 2.88 (t, 2 H, CH_2 -N), 3.32 (t, 2 H, CH_2 -S), 3.83 (s, 3 H, CH_3 -Ar), 4.59 (s, 2 H, NH_2), 7.29 (m, 2 H, Ar), 7.63 (m, 1 H, Ar) ppm.

ASPh (2-feniletiltioetilamina). En un matraz bola de 100 mL se disolvió 1 g (7.6 mmol) de clorhidrato de cisteamina en 20 mL de etanol destilado, a ésta solución se adicionaron 0.97 g (17 mmol) de KOH (88 %), la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 1 hora, pasado este tiempo se adicionaron 1.77g (7.6 mmol) de 2-yodoetilbenceno gota a gota a la mezcla de reacción a 0°C. La reacción se mantuvo a reflujo por 3 horas. La solución etanólica se evaporó obteniéndose un aceite que se extrajo con CH_2Cl_2 .

Rendimiento: 88 %. IR (ATR): $\nu = 3348, 3082, 3059, 3026, 2916, 2851, 1600, 1494, 1451, 1381, 1318, 1271, 1225, 1122, 1071, 1027, 888, 746, 697, 562, 490\text{ cm}^{-1}$. DART-MS: $C_6H_5CH_2CH_2SCH_2CH_2 = 165\text{ m/z}$; $ASPh = 182\text{ m/z}$. 1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, 20°C) δ 2.72 (t, 2 H, CH_2 -S), 2.79 (t, 2H, CH_2 N), 2.95 (m, 4 H, CH_2CH_2Ph), 3.17 (s, 2 H, NH_2), 7.24 (m, 3 H, Ph), 7.32 (m, 2 H, Ph) ppm. Anal. Calc. para $C_{10}H_{18}ClNOS$: C, 50.94; H, 7.70; N, 5.94; S, 13.60; Encontrado: C, 49.27; H, 5.06; N, 5.14; S, 9.58.

ASe (2-fenilselenoetilamina). En un matraz bola de 100 mL se disolvieron 1 g (3.2 mmol) de difenildiselenuro en 20 mL de etanol destilado, se adicionó $NaBH_4$ hasta decoloración de la solución. En un matraz Schlenck se disolvió 1.31 g (6.4 mmol) de bromohidrato de 2-bromoetilamina en 10 mL de etanol destilado y a ésta mezcla de reacción se adicionaron 0.147 g (6.4 mmol) de Na^0 ; una vez que esta mezcla de reacción se decoloró, se adicionó mediante cánula a la solución del selenolato, esta mezcla de reacción se dejó en agitación y reflujo por 3 horas. La solución resultante se filtró y acidificó con 1 eqv. de HCl 1M, el producto se aisló como clorhidrato de ASe.

Rendimiento: 53 %. p.F.: $> 300^\circ C$ (desc. $300\text{--}305^\circ C$). IR (ATR): $\nu = 3623, 3545, 3383, 3216, 1616, 1412, 1327, 1281, 1220, 1101, 1030, 919, 782, 746, 689, 675, 552, 492, 467, 435\text{ cm}^{-1}$. DART-MS: $ASe = 201\text{ m/z}$. 1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz, 20°C) δ 1.89 (s, 2H, NH_2), 2.98 (m, 4 H, CH_2CH_2 - NH_2), 7.27 (m, 3 H, Ph), 7.52 (m, 2 H, Ph) ppm. ^{77}Se -RMN ($THF-d_8$, 300 MHz, 20°C) δ 256.34 ppm.

L1 [bis(1-metil-2-metilbencimidazolil)(2(2,4-dimetilfeniltioetil)amina)]. A una solución de acetonitrilo (40 mL) que contenía 535 mg (2.96 mmol) de 2-clorometilbencimidazol y 348 mg (1.48 mmol) de ASAr se agregaron 409 mg (2.96 mmol) de K_2CO_3 y una cantidad catalítica de NaI (~ 40 mg). La solución se mantuvo a reflujo por 3 horas. La mezcla de reacción resultante se filtró a través de celita y se lavó con CH_2Cl_2 , por evaporación lenta se obtuvieron cristales incoloros.

Rendimiento 54 %. p.F.: 146 -149 °C. IR (KBr): $\nu = 3057, 3030, 2973, 2921, 2811, 1512, 1478, 1433, 1402, 1360, 1331, 1283, 1237, 1172, 1128, 1098, 1058, 1033, 989, 951, 882, 863, 808, 790, 762, 741, 653, 569, 539, 485, 442, 401 \text{ cm}^{-1}$. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz, 20 °C): δ 7.70 (m, 2 H, Bzim), 7.26 (m, 6 H, Bzim), 4.09 (s, 4 H, NCH_2Bzim), 3.70 (s, 6 H, NCH_3), 3.00 (s, 4 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.16 (s, 6 H, PhCH_3) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (CDCl_3 , 75 MHz, 20 °C): δ 150.87 (Bzim), 140.86 (Bzim), 137.85 (Bzim), 136.12 (Bzim), 135.76 (Bzim), 131.17 (Bzim), 130.99 (Bzim), 129.18 (Ph), 127.25 (Ph), 123.36 (Ph), 122.73 (Ph), 119.31 (Ph), 109.53 (Ph), 54.16 (NCH_2Bzim), 51.30 (NCH_3), 31.22 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 30.26 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 20.97 (PhCH_3), 20.39 (PhCH_3) ppm. Anal. Calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{S}$: C, 71.18; H, 6.42; N, 15.37. Encontrado: C, 71.39; H, 6.45; N, 14.79. $E_{1/2} = -160 \text{ mV (Fc}^+/\text{Fc)}$.

***L*₂** [*bis*(1-metil-2-metilbencimidazolil)(metiltioetil)amina]. En un matraz bola de 100 mL se colocaron 1.12 g (6.2 mmol) de 2-clorometilbencimidazol, 0.57 g (6.47 mmol) de metiltioetilamina, K_2CO_3 (0.895 g, 6.45 mmol) y NaI (40 mg, 0.27 mmol), una vez homogeneizada la mezcla en acetonitrilo (20 mL) se mantuvo a reflujo por 3 horas. La solución se filtró a través de celita, se concentró a sequedad y se extrajo con CH_2Cl_2 la solución resultante dio lugar a un sólido blanco.

Rendimiento 53 %. p.F.: 175–177 °C. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.83 (m, 2H, BzIm), 7.20 (m, 6H, BzIm), 3.94 (s, 4H, BzIm CH_2), 3.60 (s, 6H, NCH_3), 1.76 (s, 3H, SCH_3) ppm. FAB⁺ MS: m/z 307 [**L**₂-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SMe}$)+H]⁺. Anal. Calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{S}$ (379.52): C, 66.46; H, 6.64; N, 18.45. Encontrado: C, 66.75; H, 6.80; N, 17.98 %. $E_{1/2} = -175 \text{ mV (Fc}^+/\text{Fc)}$.

***L*₃** [*bis*(1-metil-2-metilbencimidazolil)(feniletioetil)amina]. En un matraz bola de 100 mL, 500 mg (2.8 mmol) de 2-clorometilbencimidazol, 382 mg (2.78 mmol) de K_2CO_3 y 40 mg (0.27 mmol) de NaI se disolvieron en CH_3CN , la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente; a esta solución se le agregó 250.7 mg (1.39 mmol) de ASPH. La reacción se mantuvo a reflujo por 3 horas. La solución resultante se filtró y el CH_3CN se evaporó lentamente formando cristales incoloros.

Rendimiento: 55 %. p.F.: 132 – 135 °C. IR (KBr): $\nu = 3057, 3028, 2922, 2807, 1611, 1511, 1475, 1454, 1437, 1398, 1358, 1330, 1289, 1234, 1206, 1173, 1147, 1121, 1097, 1029, 988, 939, 906, 860, 798, 762, 741, 696, 653, 569, 538, 499, 471, 440, 410 \text{ cm}^{-1}$. DART-MS: **L**₃ = 470 m/z . ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz, 20°C) δ 2.72 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.79 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.95 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.17 (s, 2 H, NH_2), 7.24 (m, 3 H, Ph), 7.32 (m, 2 H, Ph) ppm. $E_{1/2} = -190 \text{ mV (Fc}^+/\text{Fc)}$.

***L*_{Se}** [*bis*(1-metil-2-metilbencimidazolil)(feniletioetil)amina]. En un matraz bola de 100 mL se disolvieron 500 mg (2.8 mmol) de 2-clorometilbencimidazol, 382 mg (2.78 mmol) de K_2CO_3 y 40 mg (0.27 mmol) de NaI en CH_3CN , la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente; después de que la solución se homogeneizó se adicionaron 280 mg (1.38 mmol) de ASe. La mezcla se agitó a temperatura de reflujo por 3 horas. La solución resultante se filtró y el CH_3CN se evaporó para obtener un sólido amarillo.

Rendimiento: 89 %. IR (KBr): $\nu = 3049, 2927, 2847, 1699, 1671, 1612, 1577, 1509, 1473, 1436, 1397, 1360, 1329, 1284, 1257, 1234, 1176, 1153, 1122, 1077, 1022, 1001, 959, 929, 904, 848, 733, 689, 666, 576, 536, 462, 439 \text{ cm}^{-1}$. DART-MS: **L**_{Se} = 490 m/z . ^1H -RMN ($\text{THF-}d_8$, 300 MHz, 20°C) δ 3.04 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.11 (t, 2 H $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.70 (s, 6 H, NMeBzim), 4.05 (s, 4 H, NCH_2), 7.02 (m, 4 H, Bzim), 7.19 (m, 5 H, Ph-Se), 7.34 (dd, 2 H, Bzim), 7.59 (dd, 2 H, Bzim) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN ($\text{THF-}d_8$, 75 MHz, 20 °C): δ 152.3 (Bzim), 143.9 (Bzim), 137.5 (Bzim), 132.4 (Se-Ph), 131 (Se-Ph), 129.6 (Se-Ph), 127 (Se-Ph), 122.9 (Bzim), 122.1 (Bzim), 120.4 (Bzim), 110 (Bzim), 55.19 (Se- CH_2), 51.33 (N- CH_2), 30.16 (NCH_2Bzim), 30.11 (NCH_3) ppm. ^{77}Se -RMN ($\text{THF-}d_8$, 300 MHz, 20°C) δ 273.93 ppm. $E_{1/2} = -131 \text{ mV (Fc}^+/\text{Fc)}$.

[**L**₁Cu]₂(ClO₄)₂. 112 mg de **L**₁ (0.24 mmol) se disolvieron en 10 mL acetonitrilo anhidro en un matraz Schlenck bajo atmósfera de N_2 y se agregaron 79 mg (0.24 mmol) de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$. La solución incolora fue tornándose amarilla pálida transcurridas 3 h de agitación. La solución fue evaporada a

sequedad bajo presión reducida; posterior lavado con éter etílico fue llevado a sequedad dando lugar a $[\text{L}_1\text{Cu}]_2(\text{ClO}_4)_2$ como microcristales incoloros.

Rendimiento: 82 %. p.F.: 216–219 °C (dec.). Una pequeña cantidad de complejo cuproso con hexafluorofosfato de cobre (I) fue preparada para análisis elemental exclusivamente empleando la misma metodología. IR (KBr): $\nu = 3030, 2947, 2919, 2868, 1615, 1486, 1451, 1359, 1328, 1279, 1242, 1212, 1084, 1008, 975, 926, 873, 809, 749, 621, 546, 456, 430 \text{ cm}^{-1}$. ^1H RMN (CD_3CN , 300 MHz, 20 °C): δ 7.88 (m, 2 H, Bzim), 7.55 (m, 2 H, Bzim), 7.36 (m, 4 H, Bzim), 4.17 (s, 4 H, NCH_2Bzim), 3.72 (s, 6 H, NCH_3), 3.06 (s, 4 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.30 (s, 3 H, PhCH_3), 2.18 (s, 3 H, PhCH_3) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (CD_3CN , 75 MHz, 20 °C): δ 141.31 (Bzim), 139.51 (Bzim), 137.93 (Bzim), 132.16 (Bzim), 131.23 (Bzim), 130.98 (Bzim), 124.29 (Ph), 123.92 (Ph), 119.07 (Ph), 118.76 (Ph), 111.56 (Ph), 55.40 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 52.08 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 34.01 (NCH_2Bzim), 20.91 (PhCH_3), 20.57 (PhCH_3) ppm. Anal. Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{CuF}_6\text{N}_5\text{PS}$: C, 49.59; H, 4.61; N, 10.33. Encontrado: C, 49.63; H, 4.58; N, 10.37.

$[\text{L}_2\text{Cu}]_2(\text{OTf})_2$. A una solución de L_2 (140 mg, 0,49 mmol) en 5 ml de THF se añadió $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{OTf}$ (130 mg, 0,49 mmol), y la mezcla se agitó bajo atmósfera de N_2 durante 3 h. Los volátiles se evaporaron a presión reducida, y la adición de aprox. 3 mL de dietiléter y filtración proporcionaron 96 mg de $\text{L}_2\text{Cu}(\text{OTf})$ como microcristales incoloros.

Rendimiento: 45 %. p.F.: 157 - 159°C. IR (KBr): $\nu = 3521, 3212, 3060, 2922, 2854, 1672, 1614, 1502, 1480, 1455, 1373, 1327, 1254, 1154, 1086, 1026, 936, 869, 801, 746, 698, 635, 572, 549, 515, 466, 432 \text{ cm}^{-1}$. ^1H -RMN (300 MHz, THF-*d*8): δ 7.61 (d, $^3J = 64.7 \text{ Hz}$ 2 H, BzIm), 7.47 (d, $^3J = 64.7 \text{ Hz}$, 2 H, BzIm), 7.2 (m, 4 H, BzIm), 4.45 (s, 4 H, BzIm CH_2), 3.78 (s, 6 H, NCH_3), 3.62 (s, 2 H, NCH_2), 2.78 (s, 2 H, SCH_2), 1.93 (s, 3 H, SCH_3) ppm. Anal. Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{CuF}_3\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$ ($\text{L}_2\text{Cu}(\text{OTf}) \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$): C 46.32, H, 4.63, N, 14.54; Encontrado C 46.35, H 4.34, N 14.09.

$\text{L}_{\text{Se}}\text{CuOTf}$. Dentro de la caja de guantes en un matraz Schlenck se colocaron 50 mg (0.102 mmol) de L_{Se} y 38.5 mg (0.102 mmol) de $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{OTf}$ y se disolvieron en THF, la mezcla se agitó durante 3 h bajo atmósfera de N_2 , una vez transcurrido este tiempo se evaporó a sequedad y el sólido resultante se lavó con dietiléter, obteniendo un sólido amarillo.

Rendimiento: 45 %. IR (KBr): $\nu = 3473, 3058, 2946, 2873, 1596, 1576, 1481, 1451, 1327, 1256, 1222, 1148, 1064, 1027, 964, 922, 886, 739, 690, 634, 571, 515, 465, 433 \text{ cm}^{-1}$. ESI-MS: $[\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}]^+ = 552 \text{ m/z}$. Anal. Calc. para $[\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}]\text{OTf}$: C, 46.26; H, 3.88; N, 9.99; S, 4.57; Encontrado: C, 43.90; H, 3.88; N, 9.10; S, 5.47.

$[\text{L}_1\text{Cu}(\text{EtOH})](\text{OTf})_2$. En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se añadieron 100 mg (0,21 mmol) de L_1 disueltos en 20 ml de etanol destilado y se añadieron 77 mg (0,21 mmol) de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ a la solución después de 5 minutos de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se volvió verde. Después de 3 horas de agitación, se añadieron 20 ml de éter dietílico y el complejo se precipitó como un sólido de color verde intenso, que se secó al vacío para dar 133 mg de complejo de cobre (II). Rendimiento: 75 %. p.F.: 158 – 160 °C. IR (KBr): $\nu = 3233, 2957, 1615, 1599, 1530, 1501, 1485, 1455, 1324, 1273, 1241, 1156, 1054, 1026, 935, 812, 746, 705, 634, 572, 545, 514, 432 \text{ cm}^{-1}$. ESI-MS: $[\text{L}_1]^+ = 469.9 \text{ m/z}$; $[\text{L}_1\text{Cu}]^+ = 531.9 \text{ m/z}$; $[\text{L}_1\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})]^+ = 577.9 \text{ m/z}$; $[\text{L}_1\text{CuCF}_3\text{SO}_3]^+ = 680.8 \text{ m/z}$. UV-vis (0.3 mM, THF, ta): $\lambda = 313 \text{ nm S} \rightarrow \text{Cu(II)}$, $\epsilon = 1710 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\lambda = 712 \text{ nm } d-d$, $\epsilon = 123 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. RPE (77 K, CH_3CN): $g_{\parallel} = 2.249$; $g_{\perp} = 2.064$; $A_{\parallel} = 167 \text{ G}$. Anal. Calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{CuF}_6\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3$ ($[\text{L}_1\text{Cu}(\text{EtOH})](\text{OTf})_2$): C, 43.80; H, 4.25; N, 7.98; Encontrado: C, 44.11; H, 4.02; N, 8.59.

$[\text{L}_2\text{CuCl}]\text{ClO}_4$. En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se añadieron 100 mg (0,26 mmol) de L_2 disuelto en 20 ml de etanol destilado y 93 mg (0,26 mmol) de $\text{Cu}(\text{ClO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se adicionaron a la solución; después de 5 minutos de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se coloreó azul verdoso. Después de 3 horas de agitación, se añadieron 20 ml de éter dietílico y el complejo

cúprico precipitó en forma de un sólido turquesa, que se secó a vacío para proporcionar 154 mg. Mediante el mismo procedimiento se sintetizó el complejo $[\text{L}_2\text{CuH}_2\text{O}](\text{OTf})_2$.

Rendimiento: 89 %. p.F.: 223 – 225 °C. IR (KBr): $\nu = 3467, 3356, 3099, 3035, 2975, 1614, 1504, 1454, 1362, 1323, 1296, 1251, 1079, 932, 911, 778, 749, 706, 620, 544, 506, 464, 430 \text{ cm}^{-1}$. ESI-MS: $[\text{L}_2\text{Cu}]^+ = 441.8 \text{ m/z}$; $[\text{L}_2\text{CuCl}]^+ = 476.8 \text{ m/z}$; $[\text{L}_2\text{CuClO}_4]^+ = 540.8 \text{ m/z}$; $[(\text{L}_2+\text{H})\text{CuCl}(\text{ClO}_4)]^+ = 576.9 \text{ m/z}$. UV-vis (0.3 mM, CH_3CN , ta): $\lambda = 326 \text{ nm S} \rightarrow \text{Cu(II)}$, $\epsilon = 1201 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\lambda = 665 \text{ nm } d-d$, $\epsilon = 92 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. RPE (77 K, CH_3CN): $g_{\parallel} = 2.244$; $g_{\perp} = 2.072$; $A_{\parallel} = 167 \text{ G}$. Anal. Calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$ ($[\text{L}_2\text{CuCl}]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): C, 42.32; H, 4.57; N, 11.75; Encontrado: C, 42.74; H, 3.89; N, 12.04.

$[\text{L}_3\text{CuCl}](\text{OTf})_2$. En un matraz bola de 100 mL, se colocaron 50 mg (0.106 mmol) de L_3 y una cantidad equimolar de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (39 mg, 0.106 mmol) se agitó la solución de CH_3CN durante 3 h a temperatura ambiente; posteriormente fue llevado a sequedad y lavado con éter etílico, para obtener un sólido color verde intenso.

Rendimiento: 92 %. p.F.: 242 – 245 °C. IR (KBr): $\nu = 3415, 3052, 2955, 2924, 2829, 1645, 1616, 1565, 1504, 1452, 1357, 1326, 1222, 1156, 1100, 1025, 935, 886, 860, 795, 745, 724, 700, 633, 572, 514, 490 \text{ cm}^{-1}$. ESI-MS: $[\text{L}^{\text{SPh}}\text{CuCl}]^+ = 567.3$, $[\text{L}^{\text{SPh}}\text{CuOTf}]^+ = 681.2$ y $[\text{L}^{\text{SPh}}\text{CuClOTf}]^+ = 717.3 \text{ m/z}$. UV-vis (0.3 mM, THF, ta): $\lambda = 343 \text{ nm S} \rightarrow \text{Cu(II)}$, $\epsilon = 2201 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\lambda = 634 \text{ nm } d-d$, $\epsilon = 81 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. RPE (77 K, CH_3CN): $g_{\parallel} = 2.257$; $g_{\perp} = 2.071$; $A_{\parallel} = 164 \text{ G}$. Anal. Calc. para $[\text{L}_3\text{CuCl}](\text{H}_2\text{O})_3\text{OTf}$: C, 45.13; H, 4.83; N, 9.07; S, 8.31; Encontrado: C, 45.35; H, 4.86; N, 6.94; S, 8.31.

$[\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ ($^1\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}$). En un matraz bola de 100 mL, provisto de agitación se colocaron 52 mg de L_{Se} (0.106 mmol) y 39 mg de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (0.106 mmol) se disolvieron en 20 mL de CH_3CN . La solución se coloreó verde intenso a los 5 minutos de agitación; pasadas 3 h de reacción a temperatura ambiente, se evaporó el acetonitrilo y se lavó con dietiléter; obteniéndose un sólido verde. De manera análoga se sintetizó el complejo $[(\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{OMes})_2$ ($^2\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}$)

$^1\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}$. Rendimiento 98 %. p.F.: 115 – 117°C. IR (KBr): $\nu = \text{cm}^{-1}$. ESI-MS: $[\text{L}^{\text{Se}}\text{CuOTf}]^+ = 701 \text{ m/z}$. UV-vis (0.3 mM, THF, ta) $\lambda = 344 \text{ nm}$, $\epsilon = 1167 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\text{Se} \rightarrow \text{Cu(II)}$, $\lambda = 689 \text{ nm } d-d$, $\epsilon = 101 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. RPE (77 K, CH_3CN) $g_{\parallel} = 2.069$, $g_{\perp} = 2.283$ and $A_{\parallel} = 157 \text{ G}$. Anal. Calc. para $[\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$: C, 37.19; H, 3.68; N, 7.75; S, 7.09; Encontrado: C, 36.95; H, 3.37; N, 7.06; S, 7.33.

$^2\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}$. Rendimiento 88 %. IR (KBr): $\nu = \text{cm}^{-1}$. ESI-MS: $[\text{L}^{\text{Se}}\text{CuMes}]^+ = 647 \text{ m/z}$. Anal. Calc. para $[\text{L}_{\text{Se}}\text{CuH}_2\text{O}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{OMes})_2$: C, 40.41; H, 5.21; N, 8.41; S, 7.70; Encontrado: C, 40.41; H, 5.18; N, 7.76; S, 7.63.

7.4. Generación y caracterización de especies reactivas

Generación de $[\text{L}_{\text{N}_3\text{Y}}\text{Cu}^{2+}\text{O}_2^{\cdot-}]^+$. En la caja de guantes de una solución madre 1 mM, se prepararon soluciones de complejos de Cu^+ 0.3 mM en 10 ml de THF o 2-MeTHF. 4 mL de esta solución se transfirieron a una celda tipo Schlenk de 1 cm, que se selló con un septum. La celda se colocó en el equipo de UV-vis adaptado con criostato, donde ya se encontraba el blanco, se enfrió a -100°C o -80°C (THF), -125 °C (2-MeTHF), se midió el espectro de los complejos cuprosos, una vez que se equilibró la temperatura, se burbujeó O_2 suavemente a través de la solución usando una aguja larga durante 40 segundos formando $[\text{L}_{\text{N}_3\text{Y}}\text{Cu}^{2+}\text{O}_2^{\cdot-}]^+$.

$[\text{L}_1\text{Cu}^{2+}-\text{OO}^{\cdot-}]^+$. UV-vis (-100°C, THF): $\lambda = 336 \text{ nm}$ $\epsilon = 1529 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $d-d \lambda = 614 \text{ nm}$ $\epsilon = 285 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$[\text{L}_2\text{Cu}^{2+}-\text{OO}^{\cdot-}]^+$. UV-vis (-100°C, THF): $\lambda = 339 \text{ nm}$, $\epsilon = 2318 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $d-d \lambda = 609 \text{ nm}$, $\epsilon = 119 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. UV-vis (-125°C, 2-MeTHF): $\lambda = 340 \text{ nm}$, $\epsilon = 2220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$[\text{L}_3\text{Cu}^{2+}-\text{OO}^{\cdot-}]^+$. UV-vis (-100°C, THF): $\lambda = 333 \text{ nm}$ $\epsilon = 2871 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$[\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}^{2+}-\text{OO}^{\cdot-}]^+$. UV-vis (-100°C, THF): $\lambda = 340 \text{ nm}$, $\epsilon = 1582 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Generación de $[\text{LN}_3\text{YCu}^{2+}\text{OOH}]^+$. En la caja de guantes de una solución stock 1 mM, se prepararon soluciones de complejos de Cu^{2+} 0.3 mM en 10 ml de THF. 4 ml de esta solución se transfirieron a una celda Schlenk de 1 cm, que se selló con un septum. La celda se transfirió al espectrofotómetro UV-vis y 10 eqv. de una solución 1: 1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$. Después de la adición, la formación de $[\text{LN}_3\text{YCu}^{2+}\text{-OOH}]^+$. Se monitoreó durante 1 h.

$[\text{L}_1\text{Cu}^{2+}\text{-OOH}]^+$. UV-vis (25°C, THF): $\lambda = 309$ nm, $\epsilon = 1279$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $\lambda = 339$ nm, $\epsilon = 1146$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. $\lambda = 324$ nm, $\epsilon = 1099$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $d-d = 712$ nm, $\epsilon = 145$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. RPE (77 K, CH_3COCH_3): $g_{\parallel} = 2.273$; $g_{\perp} = 2.053$; $A_{\parallel} = 157$ G.

$[\text{L}_2\text{Cu}^{2+}\text{-OOH}]^+$. UV-vis (25°C, THF): $\lambda = 305$ nm, $\epsilon = 1780$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $d-d \lambda = 737$ nm, $\epsilon = 115$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. RPE (77K, CH_3COCH_3): $g_{\parallel} = 2.256$; $g_{\perp} = 2.056$; $A_{\parallel} = 169$ G.

$[\text{L}_{\text{Se}}\text{Cu}^{2+}\text{-OOH}]^+$. UV-vis (25°C, THF): $\lambda = 323$ nm, $\epsilon = 2232$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. RPE (77K, CH_3CN): $g_{\parallel} = 2.258$; $g_{\perp} = 2.071$; $A_{\parallel} = 164$ G.

7.5. Activación de sustratos orgánicos mediada por los sistemas modelo

Complejos $[\text{LN}_3\text{YCu}^{2+}\text{O}_2^{\cdot-}]^+$. Una vez que se generaron a baja temperatura los complejos cúpricos tipo superoxo, se procedió a agregar a esta solución 10 eqv. de una solución 3 mM de 9,10-dihidroantraceno (9,10-DHA). La reacción se monitoreó por 1 h donde se observó la disminución de la banda de transferencia de carga lo que se asoció con el consumo del complejo superoxo formado. Una vez terminado el monitoreo se hicieron extracciones líquido-líquido con CH_2Cl_2 y una solución acuosa de Na_2EDTA y se analizó la fase orgánica por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Complejos $[\text{LN}_3\text{YCu}^{2+}\text{OOH}]^+$. Una vez que se generaron a temperatura ambiente soluciones de concentración conocida de los complejos cúpricos en THF, a partir de esta concentración se colocaron las reacciones en una relación 1:1:0.1; sustrato, oxidante, complejo respectivamente; como oxidante se utilizó una solución de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ en relación 1:1 entre dichos reactivos. Se probaron como sustratos la PPh_3 , HPPH_2 , tioanisol y dibenzotiofeno. Las reacciones se colocaron en agitación por 3 h, pasado este tiempo se hicieron extracciones líquido-líquido con CH_2Cl_2 y una solución acuosa de Na_2EDTA y se analizó la fase orgánica GC-MS y RMN de ^{31}P y ^1H .

Referencias

- (1) Bruker AXS, SAINT Software reference manual v. 6.23C, Madison, Wisconsin, USA, **2002**.
- (2) CRYCALIS CCD and CRYCALIS R, Oxford Diffraction, Abingdon, UK, **2009**.
- (3) Sheldrick, G. M. SHELXS-97, Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Germany, **1990**.
- (4) Sheldrick, G. M. SHELXL-97, Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, **1997**.
- (5) Neese, F. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, 2, 73.
- (6) Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1986**, 33, 8822.
- (7) Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1986**, 34, 7406.
- (8) A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, 38, 3098.
- (9) Schäfer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1994**, 100, 5829.
- (10) Neese, F. *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 1740.
- (11) Weigend, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 1057.
- (12) Klamt, A.; Schürmann, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1993**, 2, 799.

- (13) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.
- (14) Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785.
- (15) Casida, M. E. in *Recent Advances in Density Functional Methods*, D. P. Chong, Ed. World Scientific: Singapore, **1995**.
- (16) Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 8218.
- (17) Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, 454.
- (18) Hirata, S.; Head-Gordon, M. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 314, 291.
- (19) Hirata, S.; Head-Gordon, M. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 302, 375.
- (20) Neese, F. *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 11080.
- (21) Chemcraft <http://chemcraftprog.com>.
- (22) Noodleman, L. *J. Chem. Phys.* **1981**, 74, 5737.
- (23) Noodleman, L.; Case, D. A. *Adv. Inorg. Chem.* **1992**, 38, 423.
- (24) Noodleman, L.; Davidson, E. R. *Chem. Phys.* **1986**, 109, 131.
- (25) Soda, T.; Kitagawa, Y.; Onishi, T.; Takano, Y.; Shigeta, Y.; Nagao, H.; Yoshika, Y.; Yamaguchi, K. *Chem. Phys. Letters* **2000**, 223.
- (26) Yamaguchi, K.; Takahara, Y.; Fueno, T. in *Applied Quantum Chemistry, V*, V. H. Smith, Ed., Reidel: Dordrecht, **1986**.
- (27) Heisenberg, W. *Z. Physik* **1926**, 38, 411.
- (28) Heisenberg, W. *Z. Physik* **1928**, 49, 619.
- (29) Dirac, P. A. M. *Proc. Roy. Soc.* **1929**, A123, 714.
- (30) Van Vleck, J. H. in *The Theory of Electronic and Magnetic Susceptibilities*. Oxford University: London **1932**.

ANEXOS

Tabla A1. Datos cristalográficos para las estructuras en estado sólido

	L ₂ CuCl	[L ₂ Cu] ₂ (OTf) ₂ •2THF	[L ₂ CuCl]ClO ₄	[L ₁ Cu(μ-OH)] ₂ OTf ₂	[L ₁ CuCl]ClO ₄
Fórmula	C ₂₁ H ₂₅ ClCuN ₅ S	C ₅₂ H ₆₆ Cu ₂ F ₆ N ₁₀ O ₈ S ₄	C ₂₁ H ₂₅ Cl ₂ CuN ₅ O ₄ S	C ₅₈ H ₆₄ Cu ₂ F ₆ N ₁₀ O ₈ S ₄	C ₂₈ H ₃₁ C ₁₂ CuN ₅ O ₄ S
Peso molecular	478.51	1328.46	577.9	1398.51	668.08
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P 21/n	C 2/c	P 21/c	P 21/n	P1 ⁻
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	1.54184	0.71073
Color	Incoloro	Gris pálido	Azul	Azul	Verde
T (K)	173(2)	130(2)	298(2)	130 (2)	298(2)
Tamaño (mm)	0.10 × 0.32 × 0.33	0.33 × 0.22 × 0.21	0.39 × 0.26 × 0.15	0.45 x 0.20 x 0.14	0.06 × 0.10 × 0.31
a (Å)	11.2265(11)	47.532(4)	8.1746(4)	11.6838(4)	11.3107(15)
b (Å)	14.2640(14)	11.8821(5)	23.0559(9)	26.1913(11)	11.6824(16)
c (Å)	12.7921(12)	29.711(2)	13.4166(6)	15.5908(7)	13.0796(17)
α (°)	90	90	90	90	66.608(2)
β (°)	97	135	103	111	70.800(2)
γ (°)	90	90	90	90	71.327(2)
V (Å ³)	2032.2(3)	11766(3)	2462.94(19)	4431.8(3)	1461.7(3)
<i>hkl</i> rangos	-13 ≤ h ≤ 13	-51 ≤ h ≤ 57	-8 ≤ h ≤ 9	-14 ≤ h ≤ 11	-13 ≤ h ≤ 13
	-17 ≤ k ≤ 17	-14 ≤ k ≤ 10	-25 ≤ k ≤ 27	-32 ≤ k ≤ 32	-14 ≤ k ≤ 14
	-15 ≤ l ≤ 15	-35 ≤ l ≤ 35	-16 ≤ l ≤ 16	-19 ≤ l ≤ 19	-15 ≤ l ≤ 15
ρ _{calc} (g cm ⁻³)	1.564	1.500	1.619	1.048	1.518
Z	4	8	2	2	2
F(000)	992	5504	1224	1444	690
μ (mm ⁻¹)	1.328	0.945	1.984	1.951	1.045
θ range (°)	2.28 hasta 25.36	3.675 hasta 29.063	2.36 hasta 22.00	4.048 hasta 68.358	1.95 hasta 25.37
Absorción corr.	Analítica	Analítica	Analítica	Analítica	Empírica
T _{max} , T _{min}	0.8785, 0.6304	0.835, 0.79	0.8724, 0.7759	0.32, 0.629	0.9349, 0.7498
Refinamiento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Reflexiones	3715	9515	8786	8828	5363
Data/restr./param.	3715/0/265	10746/389/733	4488/186/357	8828/1/381	5363/81/402
Goodness-of-fit	1.044	1.028	0.926	0.94	1.018
R	0.0313	0.0650	0.0485	0.0999	0.0372
R _w	0.0779	0.1569	0.1076	0.1917	0.0931
Peak, hole (e Å ³)	0.321, -0.580	1.056, -0.823	0.878, -0.607	0.831, -0.447	0.434, -0.255

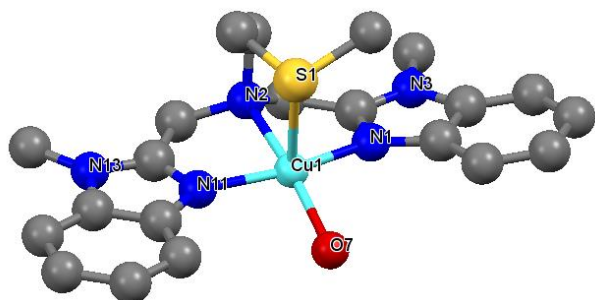
Tabla A1. Continuación

	[L ₁ Cu] ₂ ClO ₄	[L ₂ CuCl]Cl •EtOH•H ₂ O	[L ₂ CuH ₂ O] OTf ₂	[L ₃ CuCl] OTf	[L ₃ CuNO ₃] OTf	[L _{se} CuH ₂ O] OMes ₂
Fórmula	C ₅₆ H ₆₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₁₀ O ₈ S ₂	C ₂₁ H ₂₅ Cl ₂ CuN ₅ O ₂ S	C ₂₃ H ₂₉ CuO ₈ N ₅ S ₂ F ₆	C ₂₉ H ₃₁ ClCuF ₃ N ₅ O ₃ S ₂	C ₂₉ H ₃₁ Cu ₁ F ₃ N ₆ O ₆ S ₂	C ₂₈ H ₄₃ CuN ₅ O ₁₁ S ₂ S _e
Peso molecular	1265.26	575.02	777.23	717.70	744.3	832.29
Sistema cristalino	Triclinico	Trigonal	Monoclínico	Triclinico	Triclinico	Monoclínico
Grupo espacial	P1 ⁻	R-3	P 21/n	P1 ⁻	P1 ⁻	C 2/c
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073	0.7107	0.71073
Color	Incoloro	Verde	Azul	Verde	Azul	Verde
T (K)	123(2)	298(2)	298(2)	150(2)	293	130(2)
Tamaño (mm)	0.06 × 0.12 × 0.17	0.05 x 0.07 x 0.22	0.311 x 0.254 x 0.174	0.03 x 0.04 x 0.12		0.17 x 0.11 x 0.06
a (Å)	11.355(2)	34.5000(14)	14.8479(15)	10.1502(7)	10.0808(9)	29.655(3)
b (Å)	11.7958(16)	34.5000(14)	13.6783(14)	11.2603(8)	11.073(2)	14.2464(5)
c (Å)	12.583(2)	11.9367(10)	15.4050(16)	14.2159(10)	15.1848(14)	22.408(2)
α (°)	67.661(2)	90	90	73.544(2)	72.568(13)	90
β (°)	63.781(2)	90	93.215(3)	87.037(2)	89.747(7)	133.248(16)
γ (°)	87.360(2)	120	90	82.201(2)	83.654(12)	90
V (Å ³)	1383.3(3)	12304.2(12)	3123.74	1543.68(19)	1606.5(4)	6895.6(16)
hkl ranges	-13 ≤ h ≤ 13 -14 ≤ k ≤ 14 -15 ≤ l ≤ 15	-41 ≤ h ≤ 41 -41 ≤ h ≤ 41 -14 ≤ h ≤ 14	-18 ≤ h ≤ 17 -16 ≤ h ≤ 16 -18 ≤ h ≤ 18	-12 ≤ h ≤ 10 -13 ≤ h ≤ 13 -17 ≤ h ≤ 17	-8 ≤ h ≤ 9 -14 ≤ h ≤ 4 -19 ≤ h ≤ 18	-40 ≤ h ≤ 40 -19 ≤ h ≤ 19 -30 ≤ h ≤ 29
ρ _{calc} (g cm ⁻³)	1.519	1.397	1.653	1.544	1.5386	1.603
Z	1	8	4	2	2	8
F(000)	656	5364	1588	738	766	3432
μ (mm ⁻¹)	1.006	1.099	0.989	0.988	0.879	1.875
θ range (°)	1.89 hasta 25.40	1.84 hasta 25.37	2.026 hasta 25.745	2.70 hasta 25.35	2.96 hasta 29.17	3.394 hasta 29.506
Absorción corr.	Empírica	Analítica	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan
T _{max} , T _{min}	0.9424, 0.8008	0.9193, 0.7581	0.847, 0.748	0.971, 0.891	1, 0.65	
Refinamiento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Reflexiones	5061	5012	5917	5608	5677	8746
Data/restr./param	5061/0/365	5012/79/366	5917/118/458	5608/0/399	5677/0/424	8746 / 5 / 449
Goodness-of-fit	1.028	0.801	1.049	1.184	1.39	1.043
R	0.0410	0.0587	0.0729	0.0696	0.0492	0.0402
R _w	0.0897	0.1500	0.1932	0.1190	0.0509	0.0739
Peak, hole (e Å ³)	0.477, -0.264		1.312, -1.035			0.523, -0.517

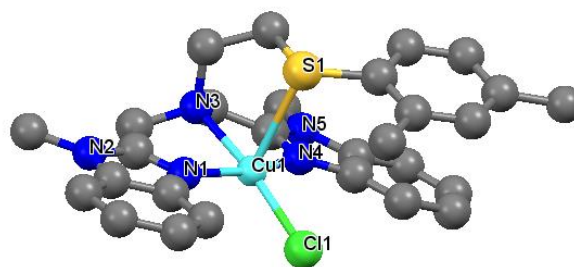
Tabla A2. Distancias de enlace y ángulos seleccionados para las estructuras en estado sólido

	Distancia (Å)		Ángulos (°)		Distancia (Å)		Ángulos (°)	
L₂CuCl					[L₂CuCl]Cl •EtOH•H₂O			
Cu1N1	2.053(2)	N1Cu1N11	116.35(7)		CuS	2.6881(17)	SCuCl1	100.60(7)
Cu1N11	2.027(2)	N1Cu1S26	123.65(5)		CuCl1	2.2381(18)	SCuN1	101.80(12)
Cu1S26	2.691(1)	N11Cu1S26	86.86(5)		CuN1	1.964(4)	SCuN11	88.66(13)
Cu1Cl1	2.350(1)	N1Cu1Cl1	112.47(5)		CuN11	1.957(5)	SCuN12	84.73(13)
		N11Cu1Cl1	114.36(5)		CuN12	2.125(4)	Cl1CuN1	96.90(16)
		S26Cu1Cl1	100.29(2)				Cl1CuN11	98.41(16)
							Cl1CuN12	174.67(14)
							N1CuN11	159.5(2)
							N1CuN12	81.61(19)
							N11CuN12	81.9(2)
[L₂CuCl]ClO₄					[L₁CuCl]ClO₄			
Cu1Cl1	2.280(9)	Cl1Cu1S1	102.0(3)		Cu1S1	2.727(1)	S1Cu1Cl1	105.61(3)
Cu1S1	2.686(2)	Cl1Cu1N1	97.7(3)		Cu1Cl1	2.247(1)	S1Cu1N1	92.19(7)
Cu1N1	1.963(4)	Cl1CuN2	172.1(3)		Cu1N1	1.954(2)	S1Cu1N3	93.30(7)
Cu1N2	2.141(3)	Cl1Cu1N11	98.0(3)		Cu1N3	1.961(2)	S1Cu1N4	83.20(7)
Cu1N11	1.965(3)	S1Cu1N1	88.1(1)		Cu1N4	2.140(2)	Cl1Cu1N1	98.50(8)
		S1Cu1N2	85.8(1)				Cl1Cu1N3	97.53(7)
		S1Cu1N11	101.2(1)				Cl1Cu1N4	171.14(7)
		N1Cu1N2	81.9(1)				N1Cu1N3	161.0(1)
		N1Cu1N11	159.7(2)				N1Cu1N4	81.8(1)
		N2Cu1N11	80.8(1)				N3Cu1N4	80.76(9)
[L₁Cu]₂ClO₄					[L₂CuH₂O] OTf₂			
Cu1S1	2.254(1)	S1Cu1N1	125.42(7)		Cu1S1	2.5902(14)	S1Cu1N2	89.11(11)
Cu1N1	1.977(2)	S1Cu1N11	108.66(7)		Cu1N1	1.973(4)	S1Cu1O7	103.84(11)
Cu1N11	2.029(2)	S1Cu1N21	139.80(6)		Cu1N2	2.095(3)	N1Cu1N11	161.63(15)
Cu1N21	2.657(3)	N1Cu1N11	125.5(1)		Cu1N11	1.975(4)	N1Cu1N2	81.20(14)
		N1Cu1N21	71.56(9)		Cu1O7	1.976(3)	N2Cu1N11	82.38(14)
		N11Cu1N21	71.29(9)				N2Cu1O7	167.00(15)

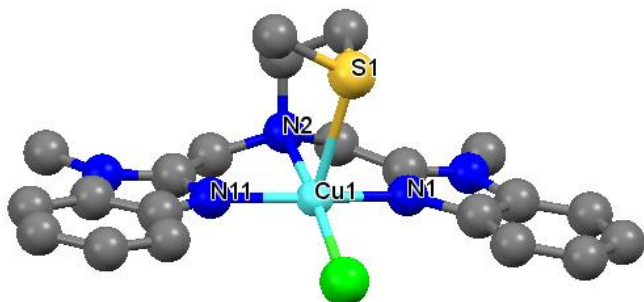
Figura A1. Diagramas Mercury de complejos con L_{N3Y} al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y contraión (es) son omitidos por claridad



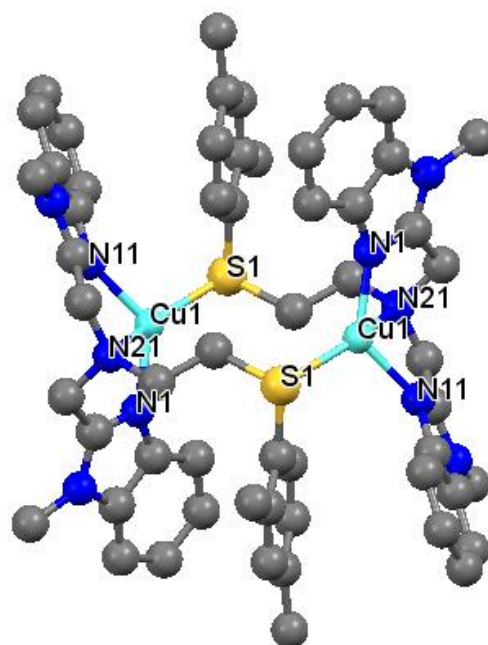
$[L_2CuH_2O]OTf_2$



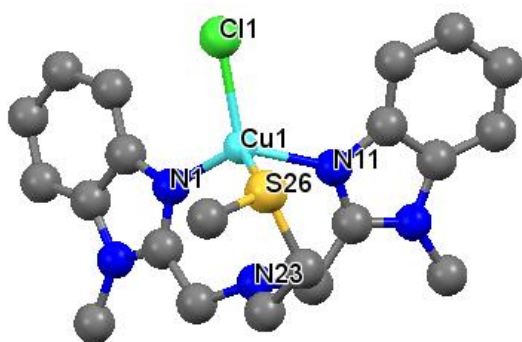
$[L_1CuCl]ClO_4$



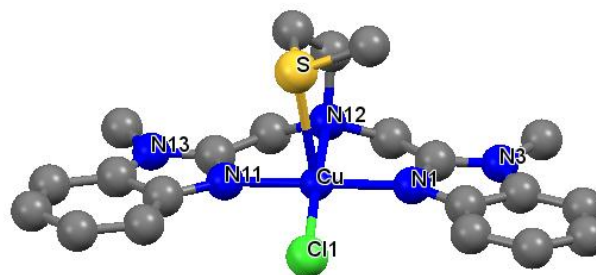
$[L_2CuCl]ClO_4$



$[L_1Cu]_2ClO_4$



L_2CuCl



$[L_2CuCl]Cl \cdot EtOH \cdot H_2O$

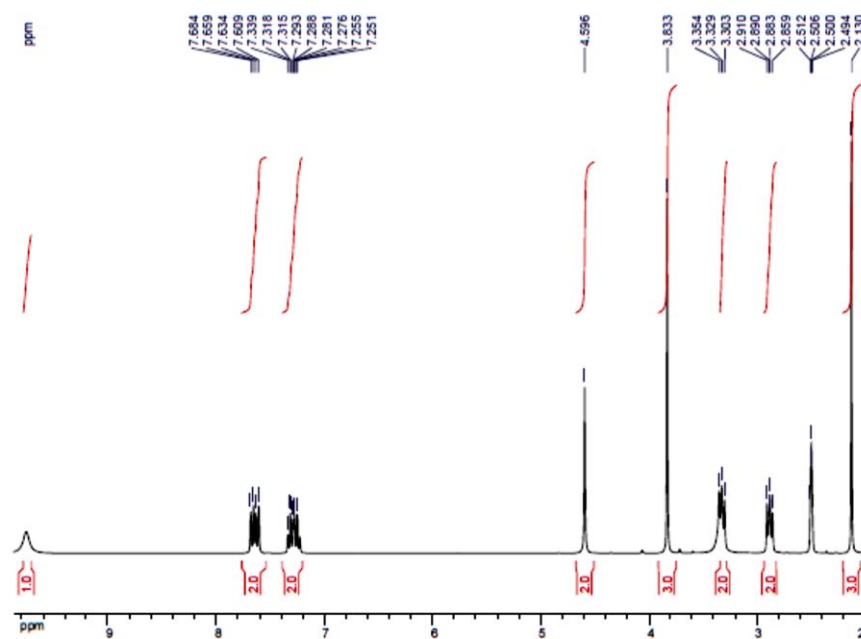


Figura A2. Espectro ^1H -RMN de ASAr en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$

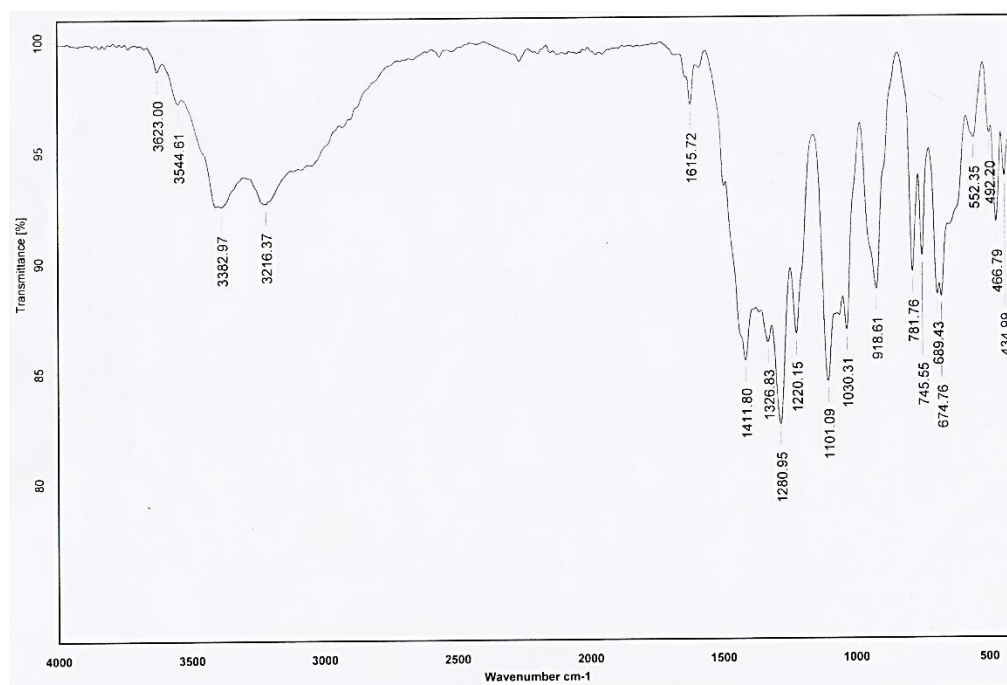


Figura A3. Espectro IR-KBr de ASe

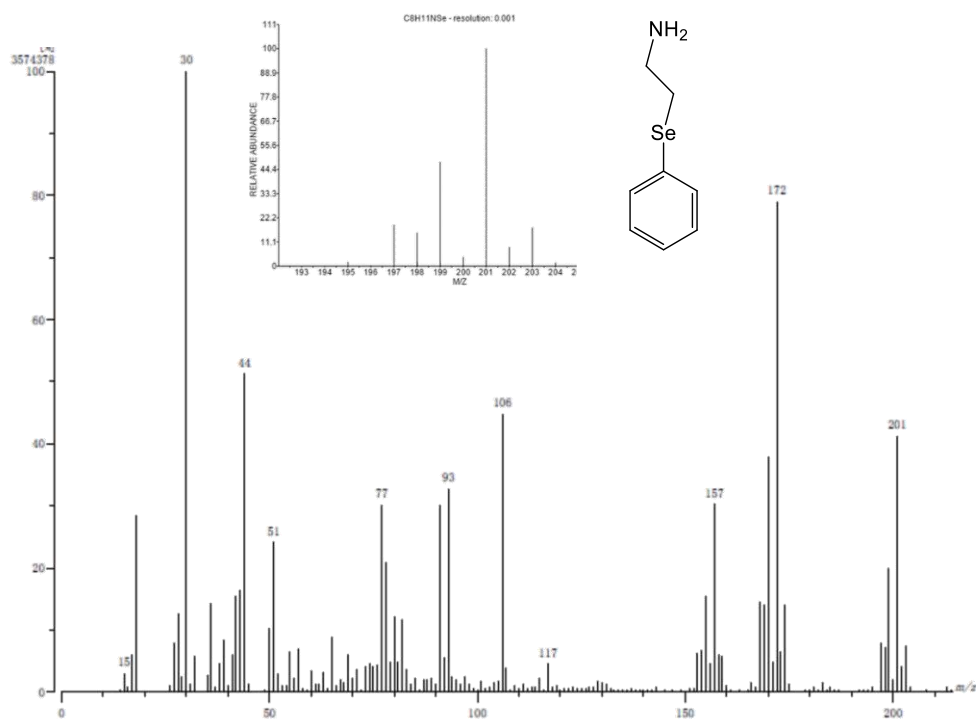
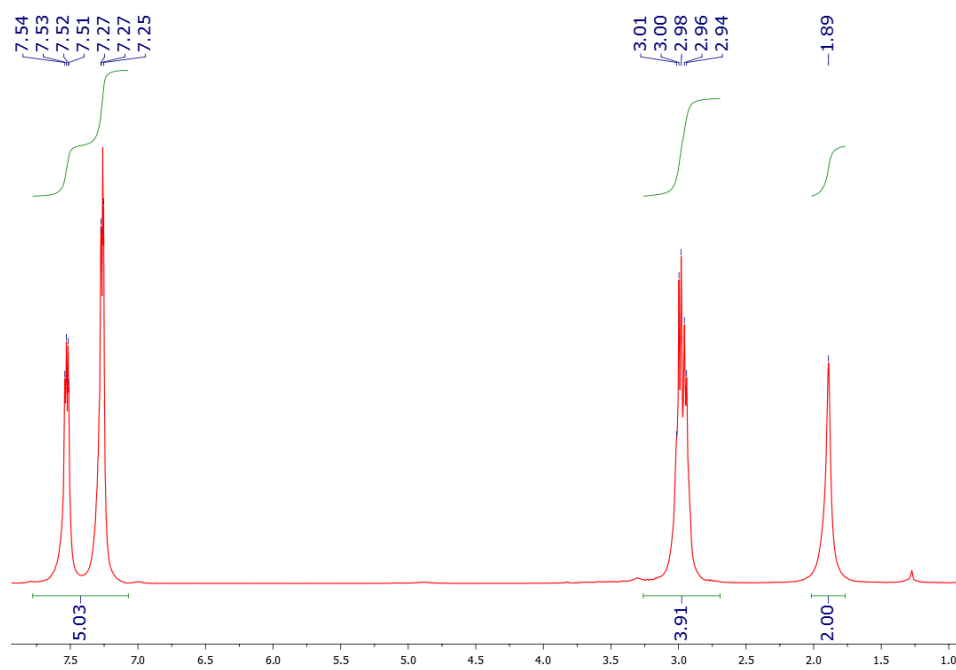


Figura A4. Espectro DART-MS y simulación de ASe

Figura A5. Espectro ¹H-RMN de ASe en CDCl₃ a 25 °C

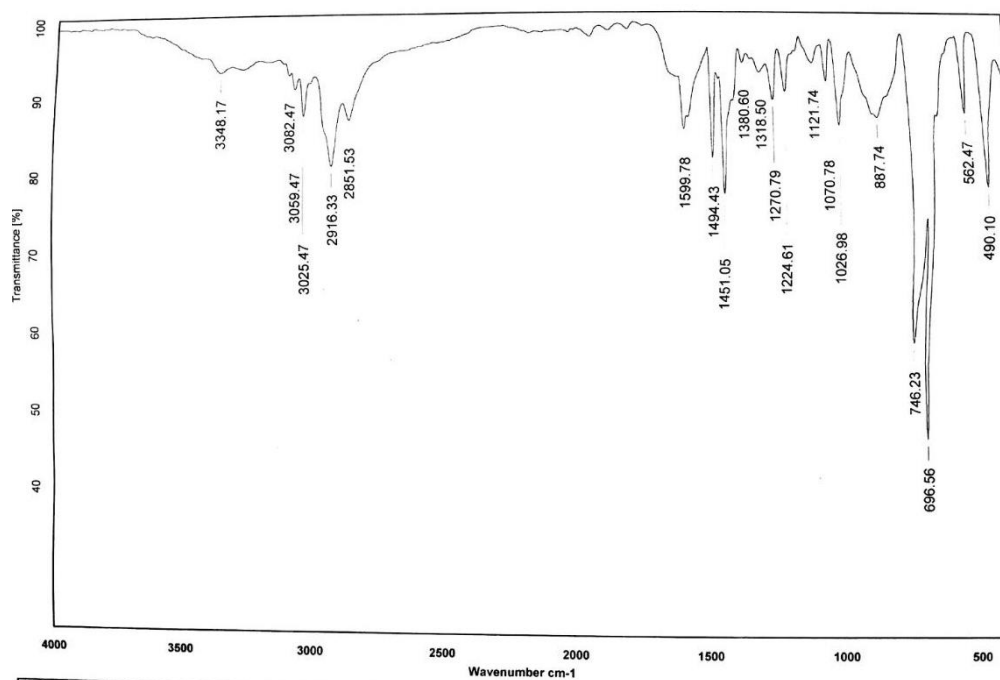


Figura A6. Espectro IR-KBr de ASPh

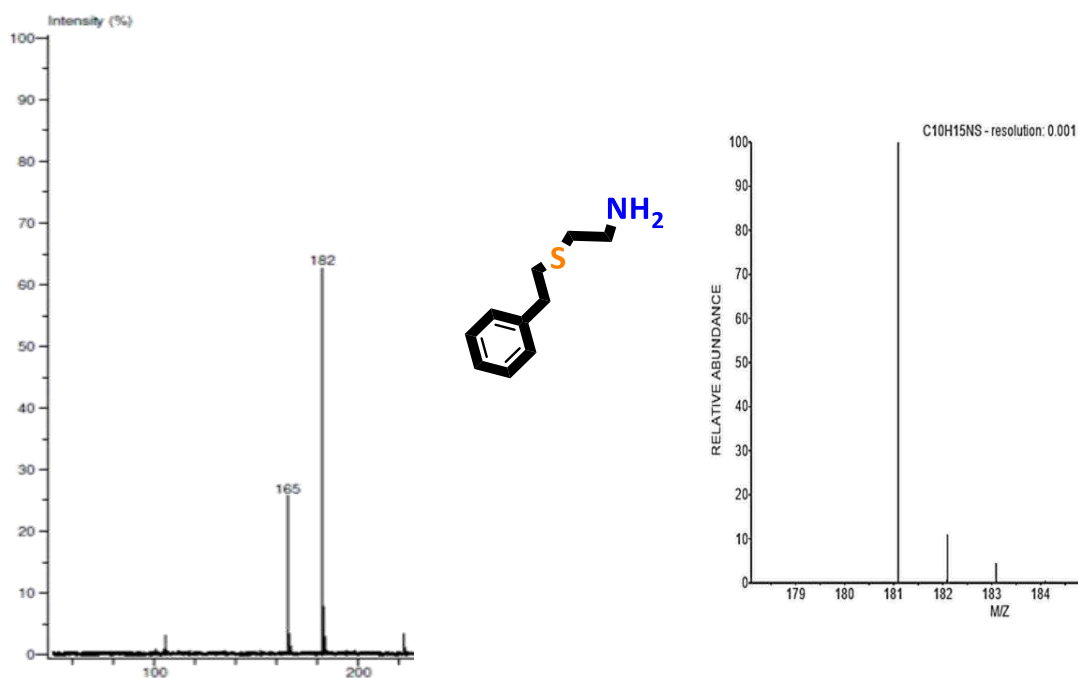


Figura A7. Espectro DART-MS y simulación de ASPh

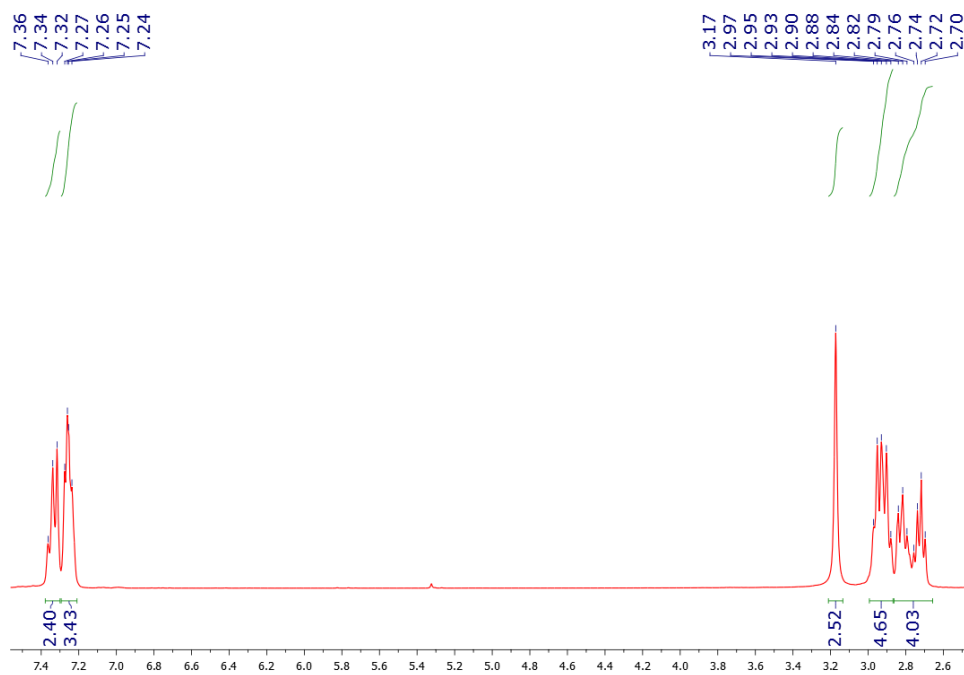


Figura A8. Espectro ¹H-RMN de ASPH en CDCl₃ a 25 °C

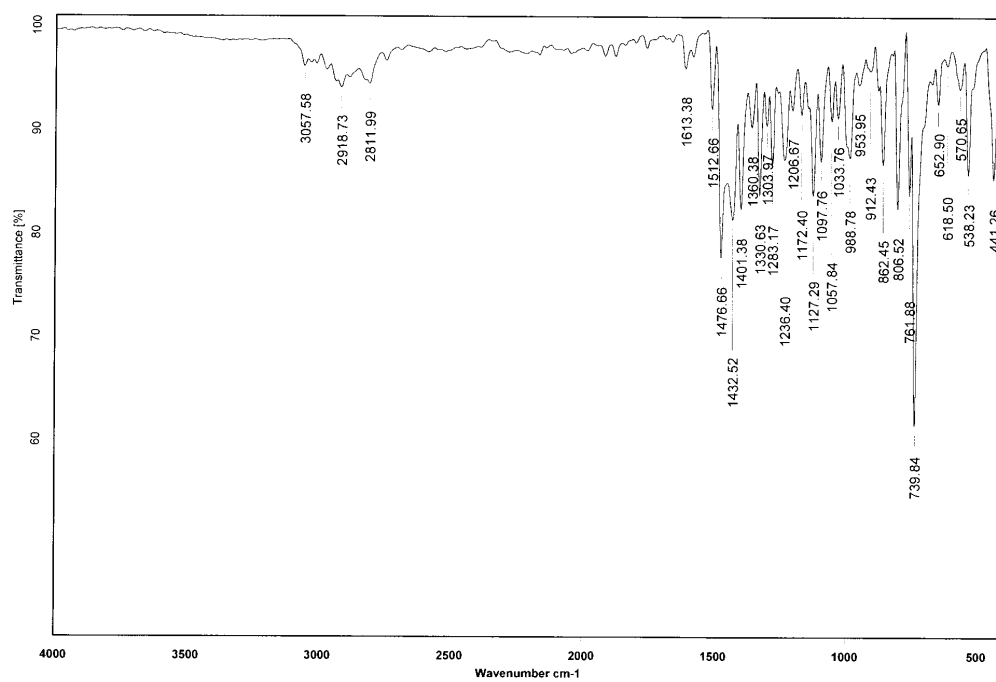


Figura A9. Espectro IR-KBr de L₁

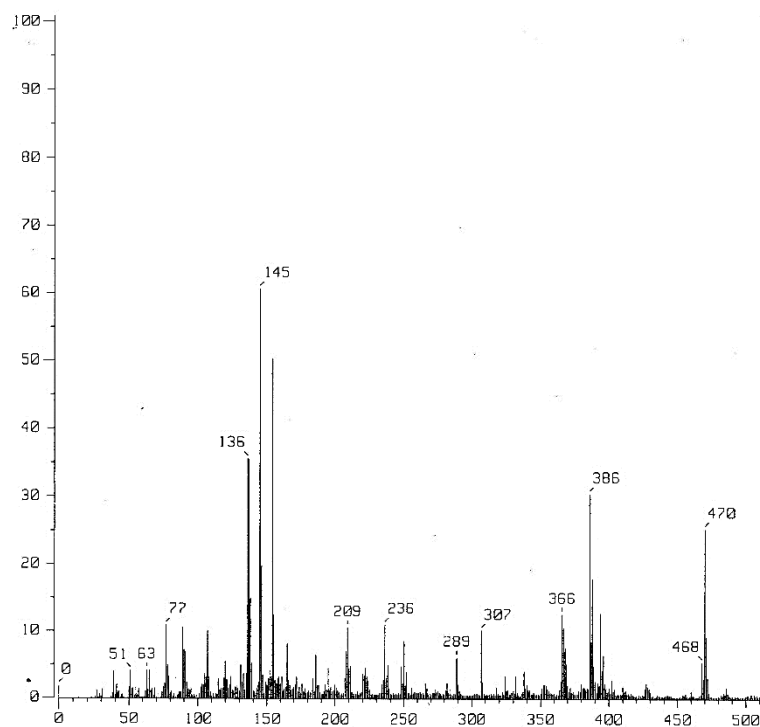


Figura A10. Espectro FAB⁺ - MS de L₁

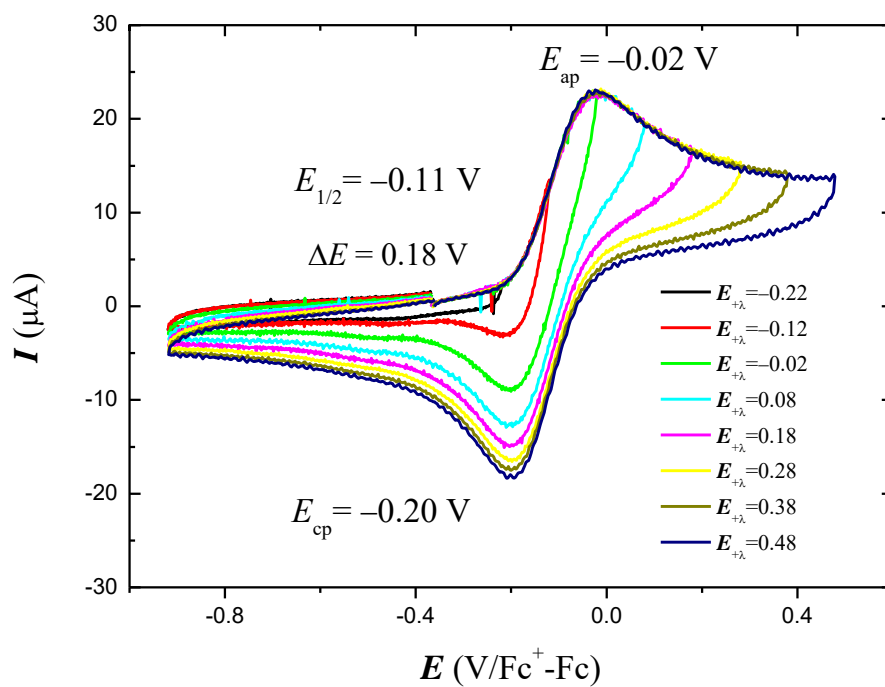


Figura A11. Voltamperograma de velocidades de barrido de L₁Cu vs Fc⁺/Fc

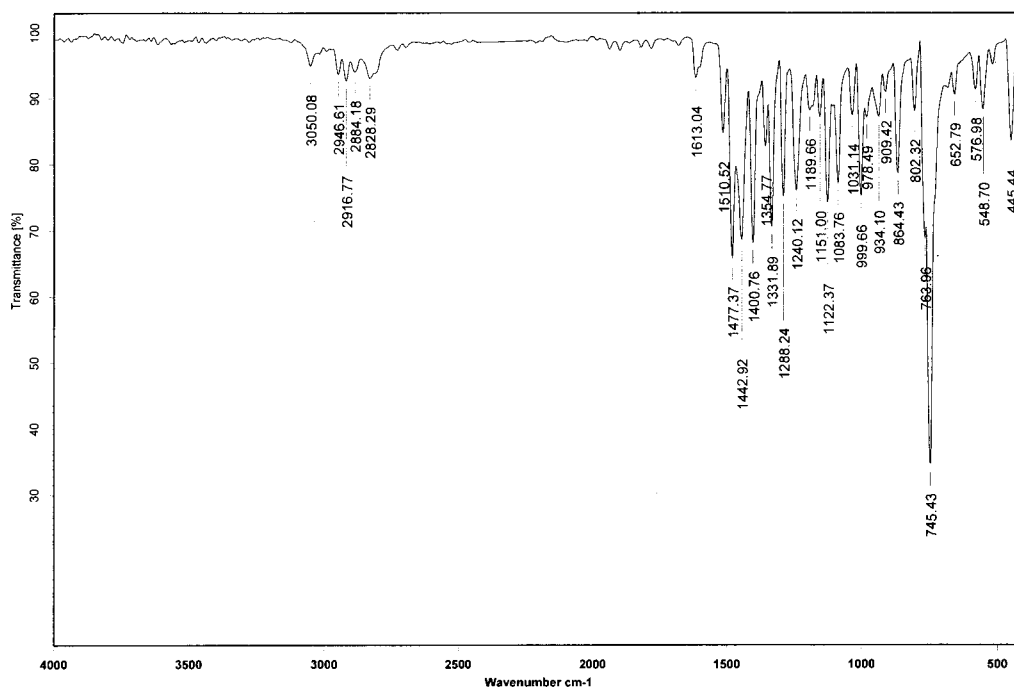


Figura A12. Espectro IR-KBr de L₂

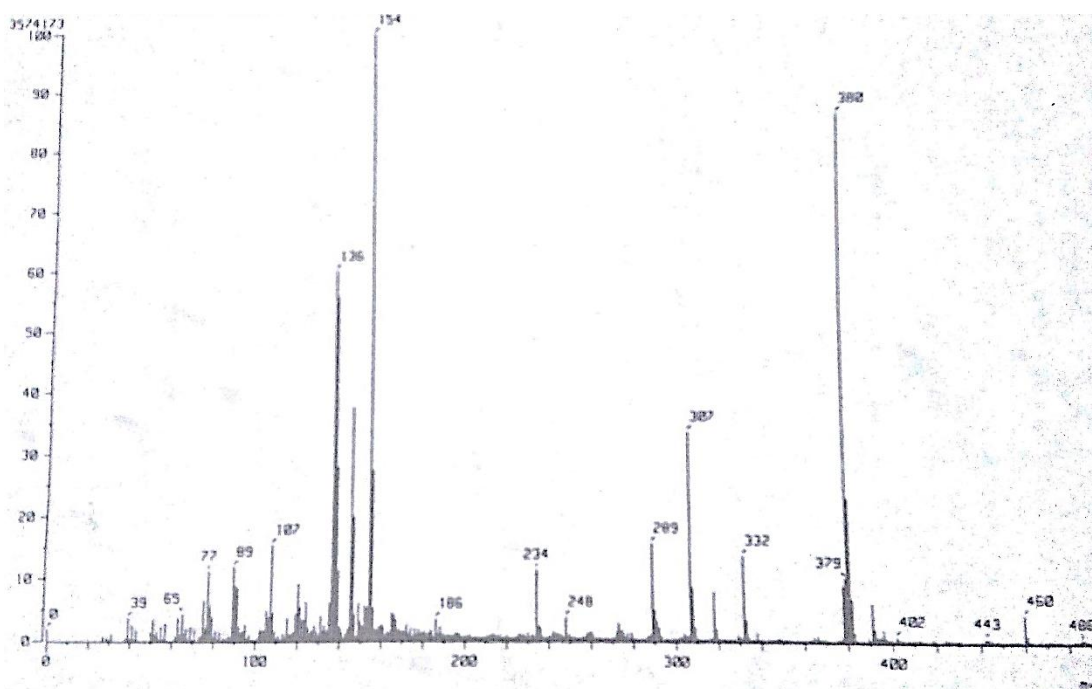


Figura A13. Espectro FAB⁺- MS de L₂

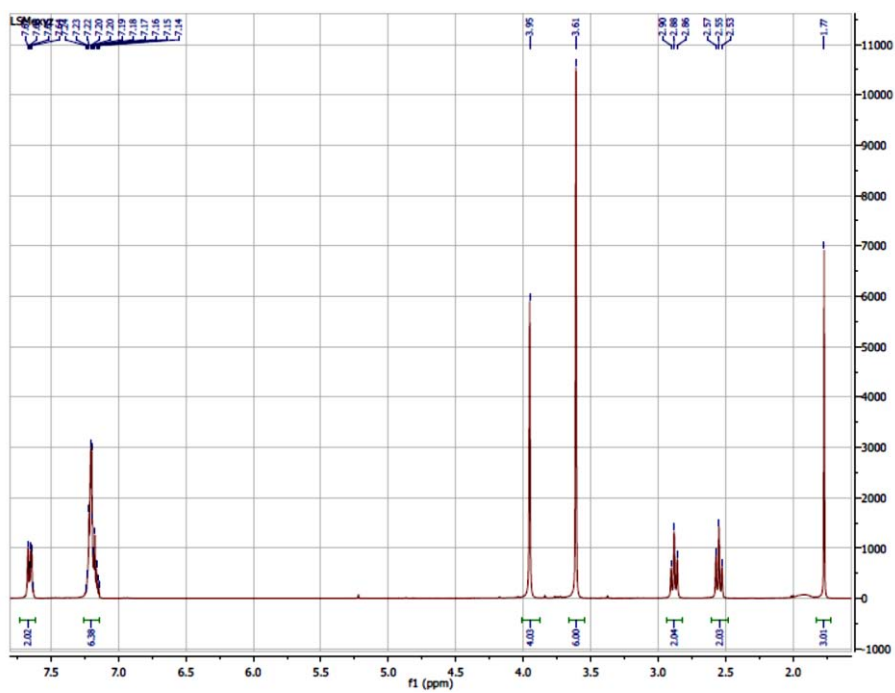


Figura A14. Espectro ^1H -RMN de L_2 en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$

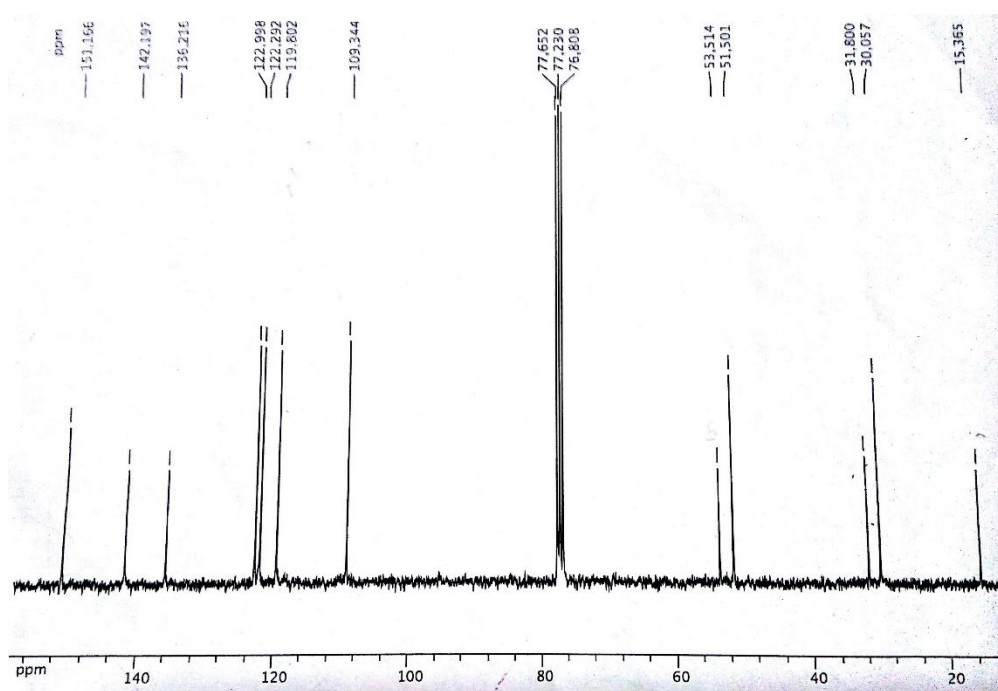


Figura A15. Espectro ^{13}C -RMN de L_2 en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$

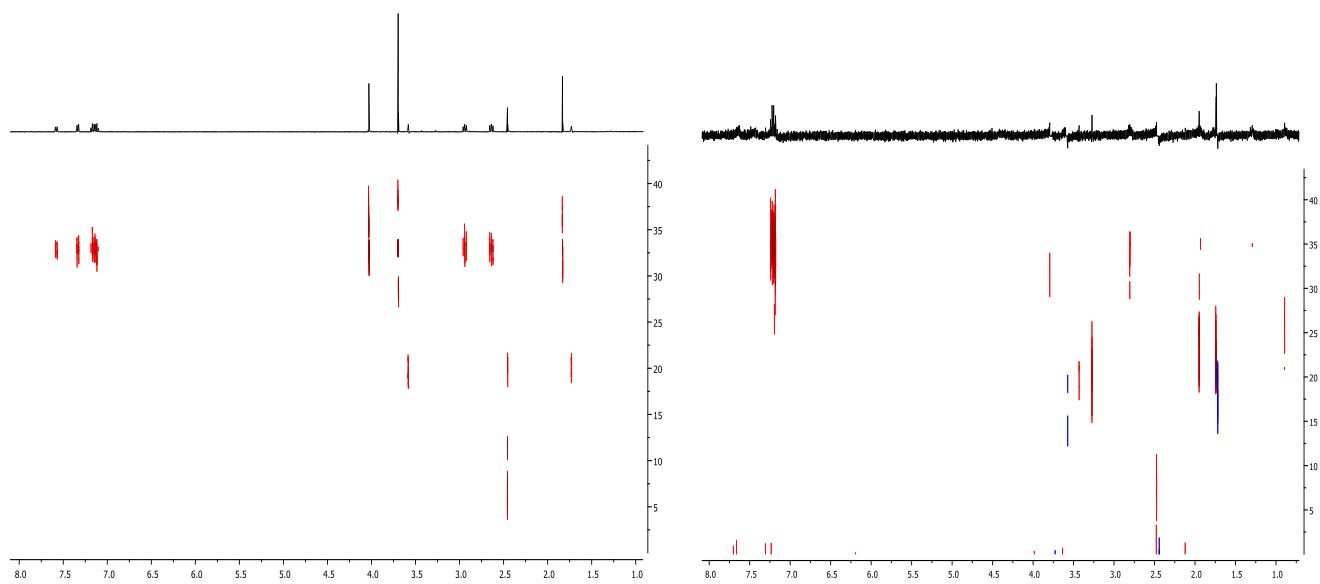


Figura A16. Espectro 2D-DOSY-RMN de izq.) L_2 y der.) $[L_2Cu]^+OTf$ en $THF-d_8$ a $25\text{ }^\circ C$. (3.3 mM)

Figura A17. Voltamperograma de velocidades de barrido de L_2Cu vs Fc^+/Fc

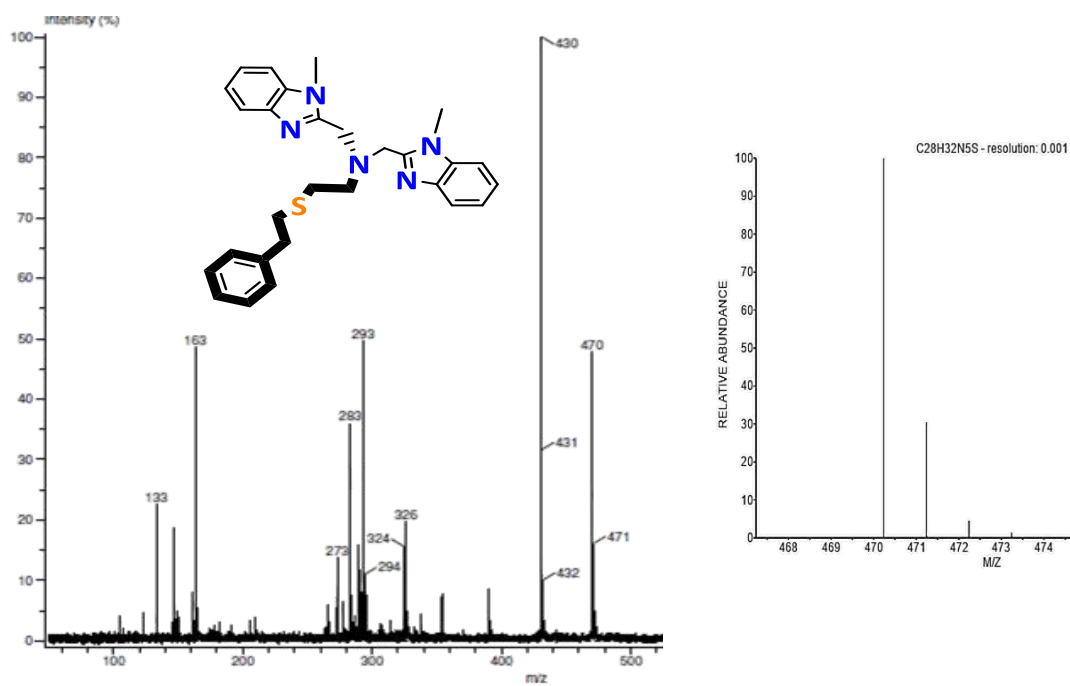


Figura A18. Espectro DART-MS y simulación de L3

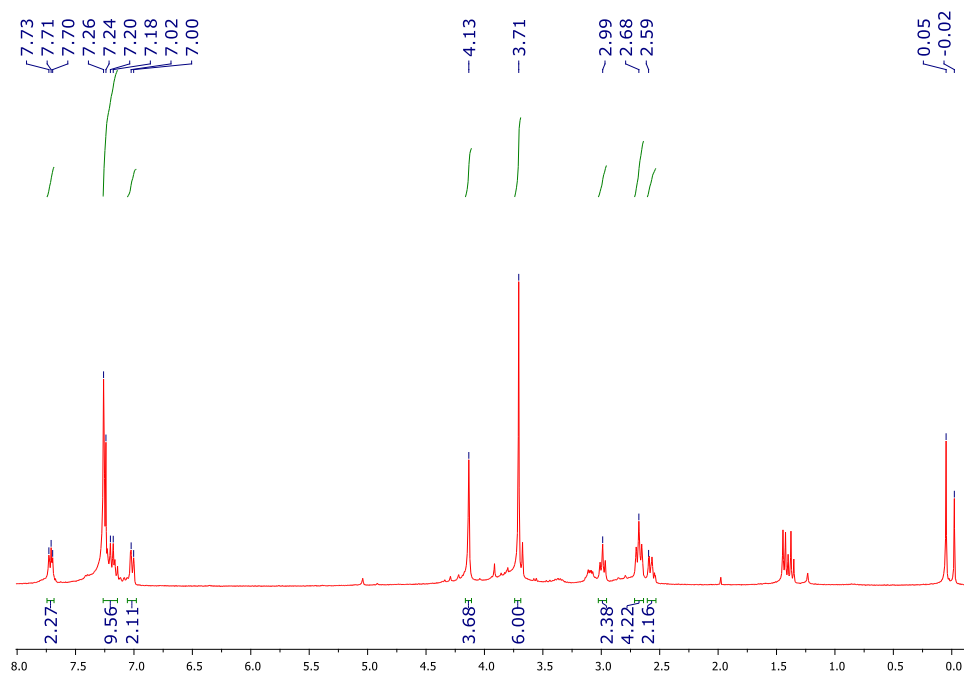
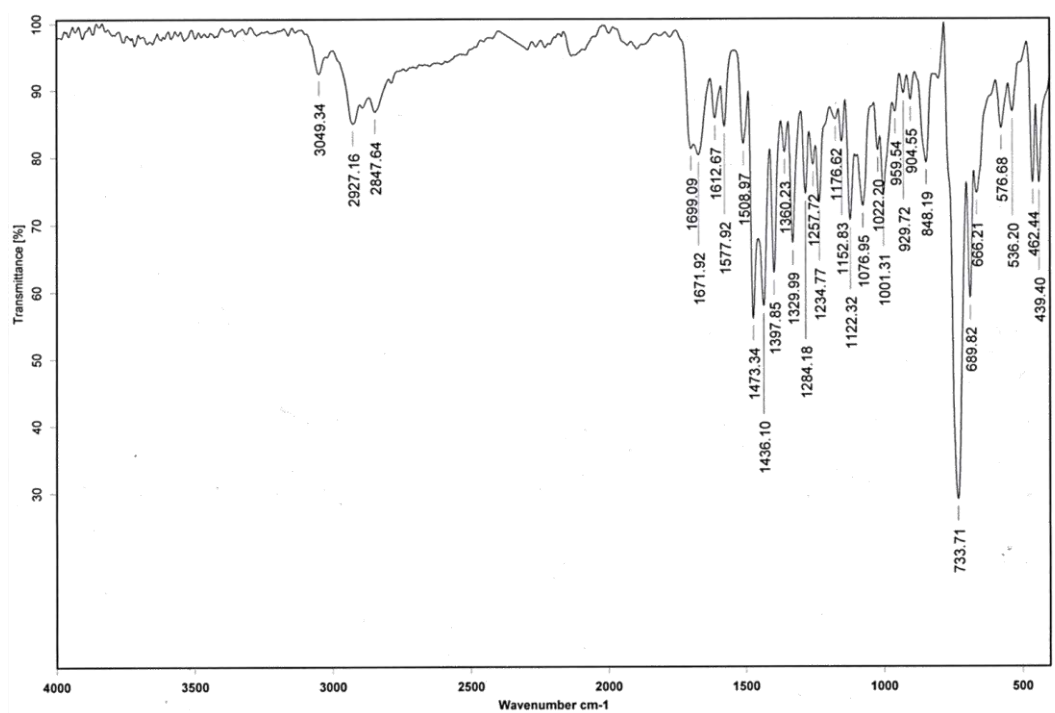


Figura A19. Espectro ¹H-RMN de L3 en CDCl₃ a 25 °C

Figura A20. Voltamperograma de velocidades de barrido de L_3Cu vs Fc^+/Fc

Figura A21. Voltamperograma de L_3 y L_3Cu vs Fc^+/Fc

Figura A22. Voltamperograma de velocidades de barrido de $L_{Se}Cu$ vs Fc^+/Fc Figura A23. Espectro IR-KBr de L_{Se}

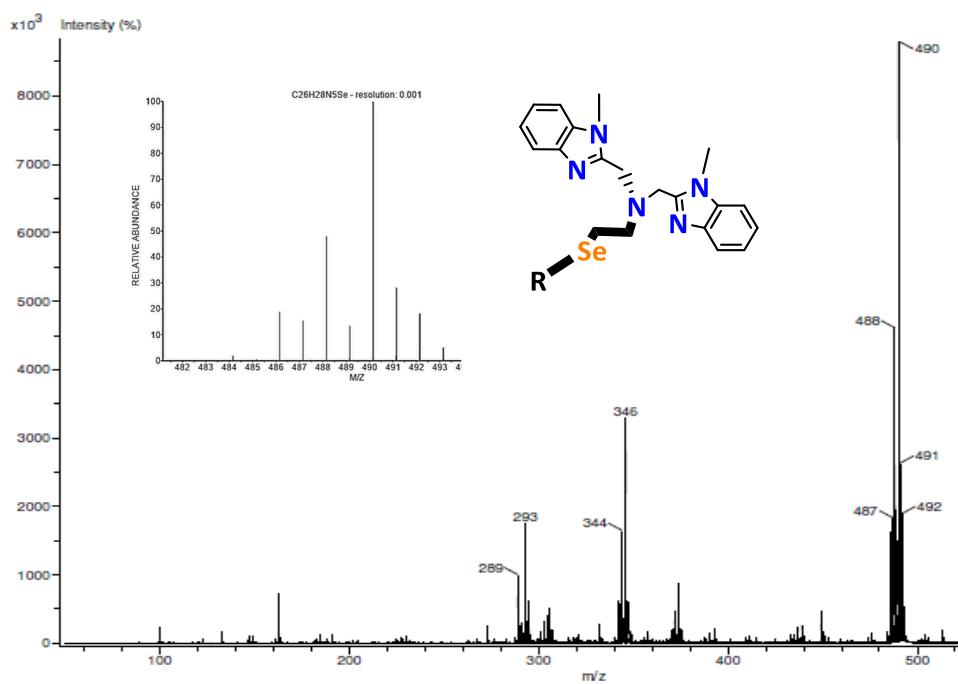


Figura A24. Espectro DART-MS y simulación de Lse

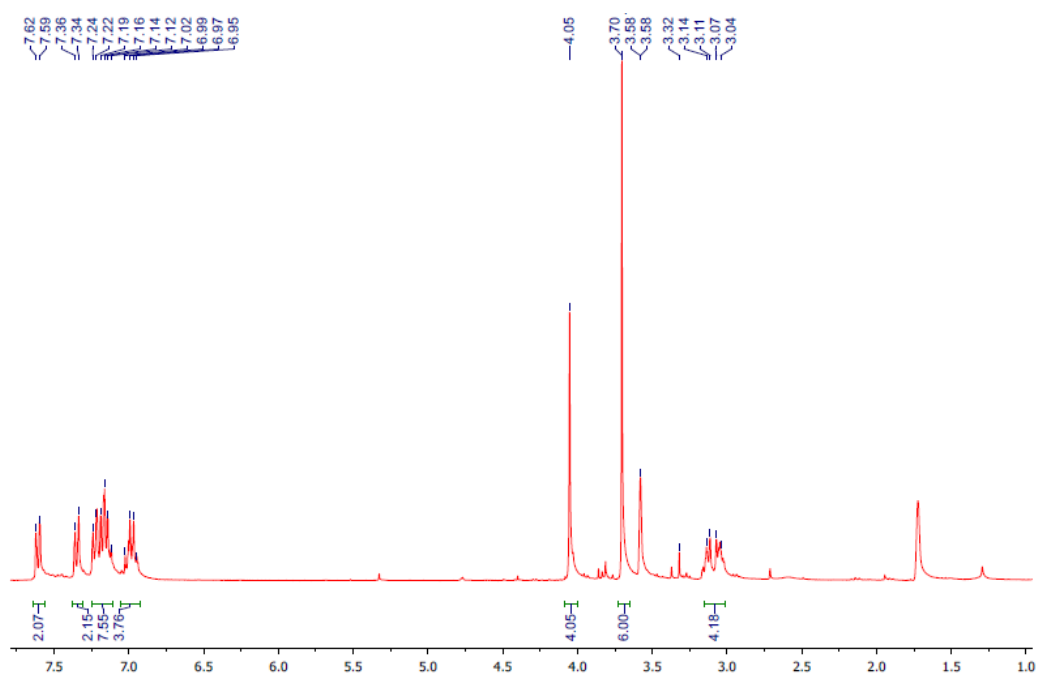


Figura A25. Espectro ¹H-RMN de Lse en THF-*d*₈ a 25 °C

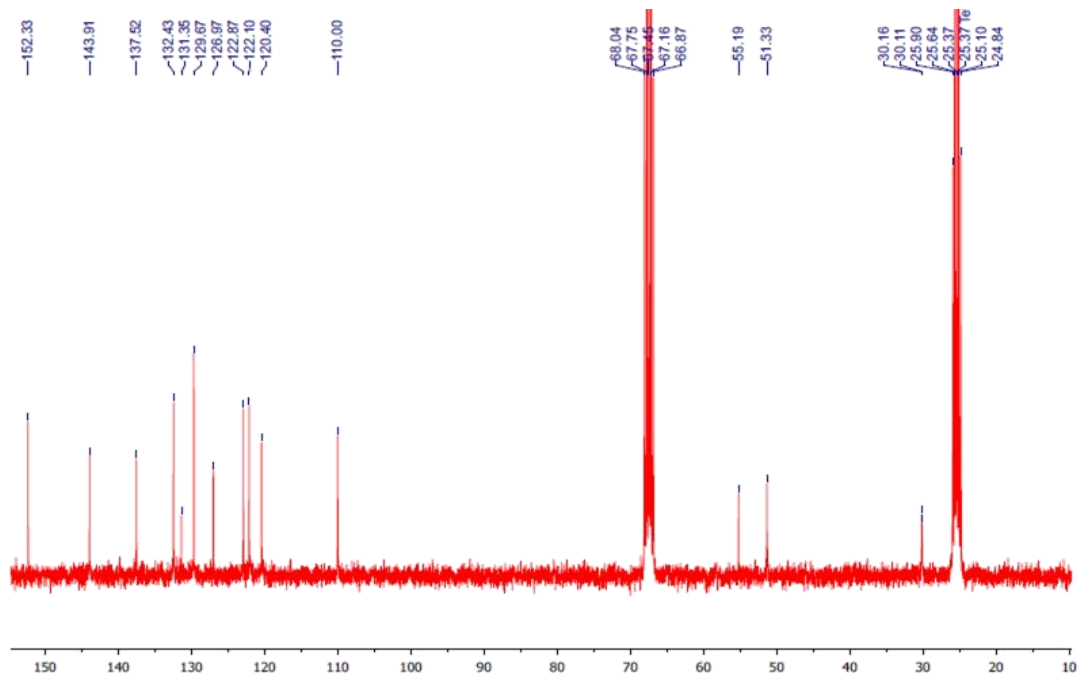


Figura A26. Espectro ^{13}C -RMN de LSe en $\text{THF-}d_8$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$

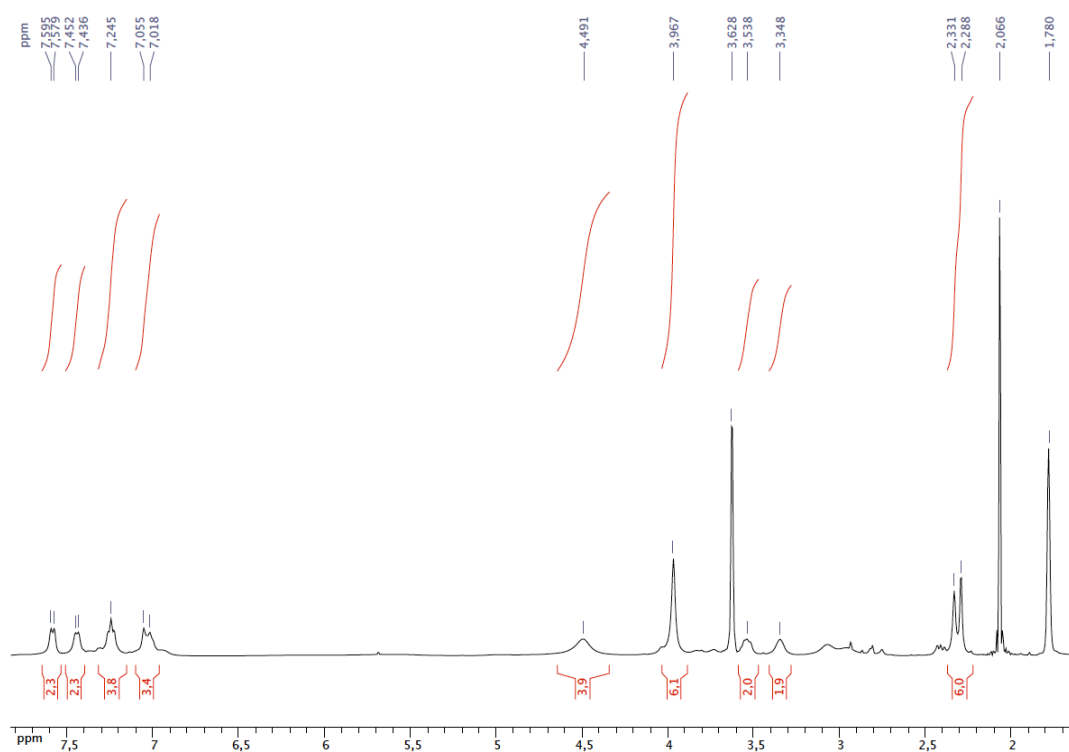


Figura A27. Espectro ^1H -RMN de $[\text{L}_1\text{Cu}]\text{OTf}$ en $\text{THF-}d_8$ a $-40\text{ }^\circ\text{C}$

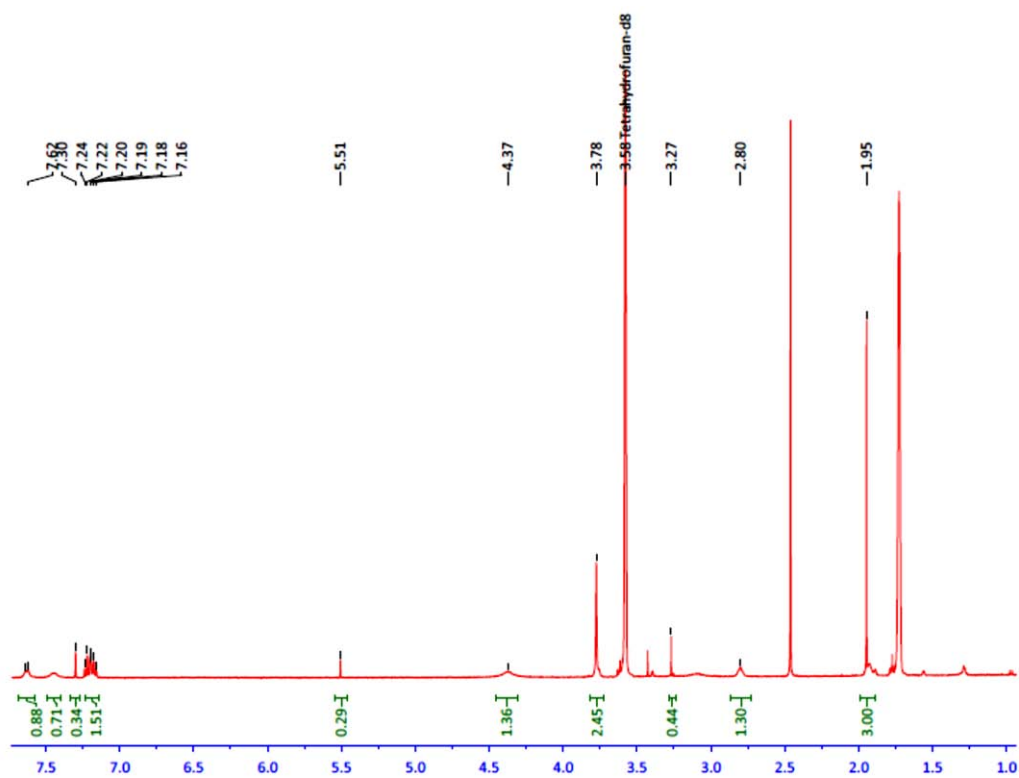


Figura A28. Espectro ^1H -RMN de $[\text{L}_2\text{Cu}]\text{OTf}$ en $\text{THF-}d_8$ a 25°C

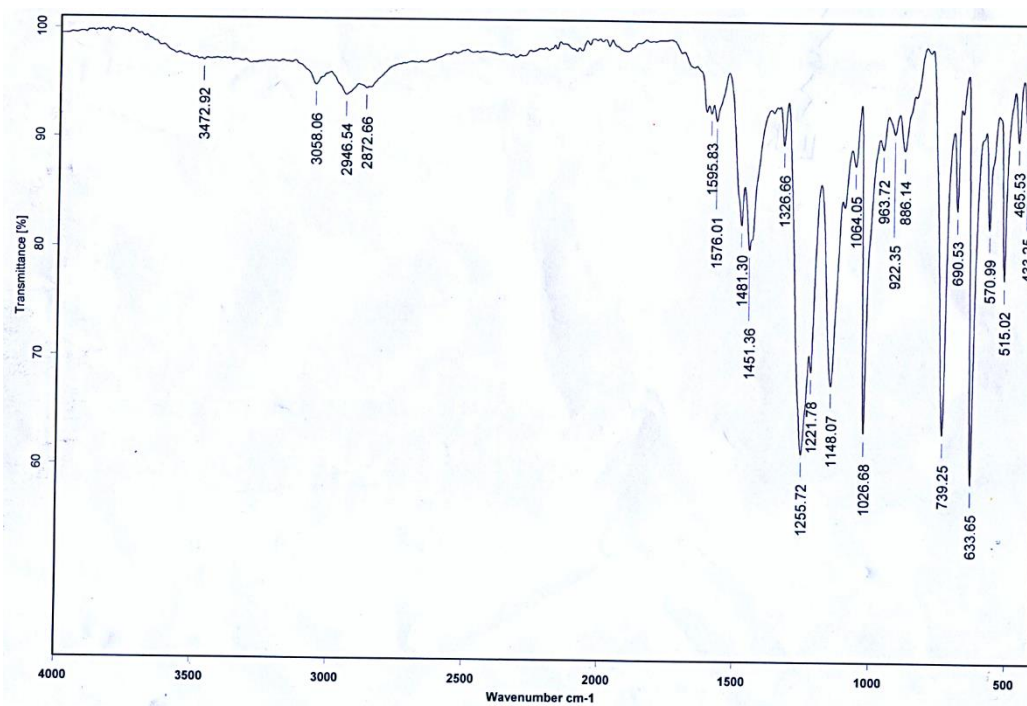
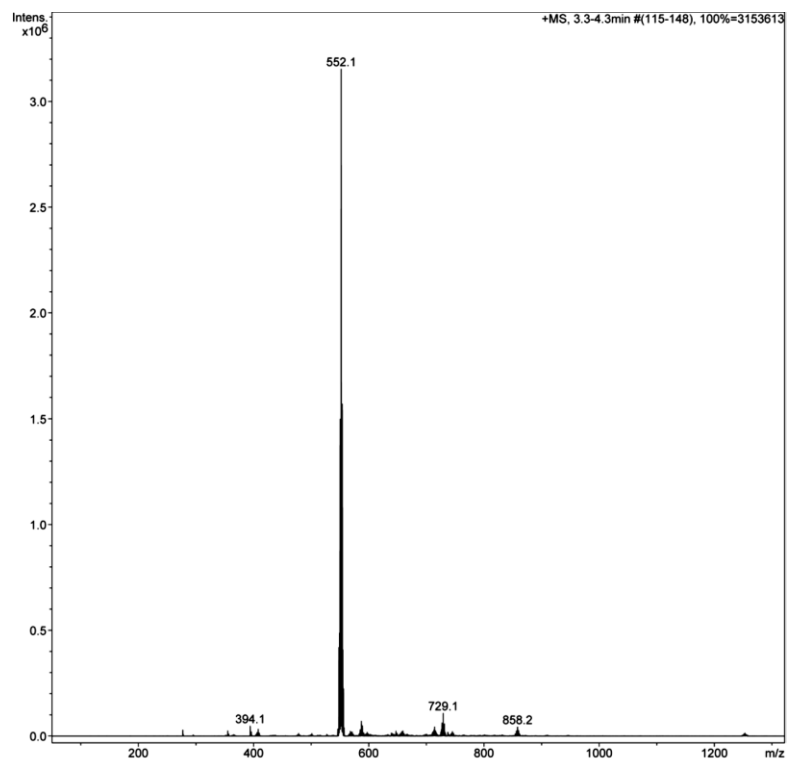
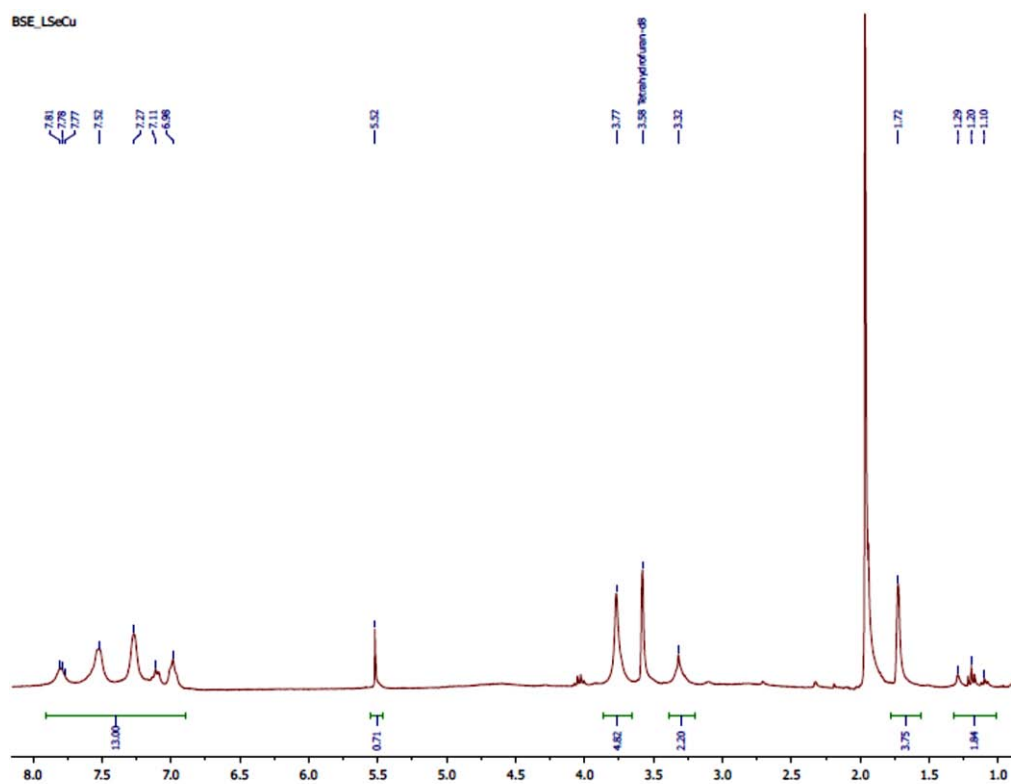


Figura A29. Espectro IR-KBr de $[\text{LSeCu}]\text{OTf}$

Figura A30. Espectro ESI-MS de [L_{se}Cu]OTf en CH₃CNFigura A31. Espectro ¹H-RMN de [L_{se}Cu]OTf en THF-*d*₈ a 25°C

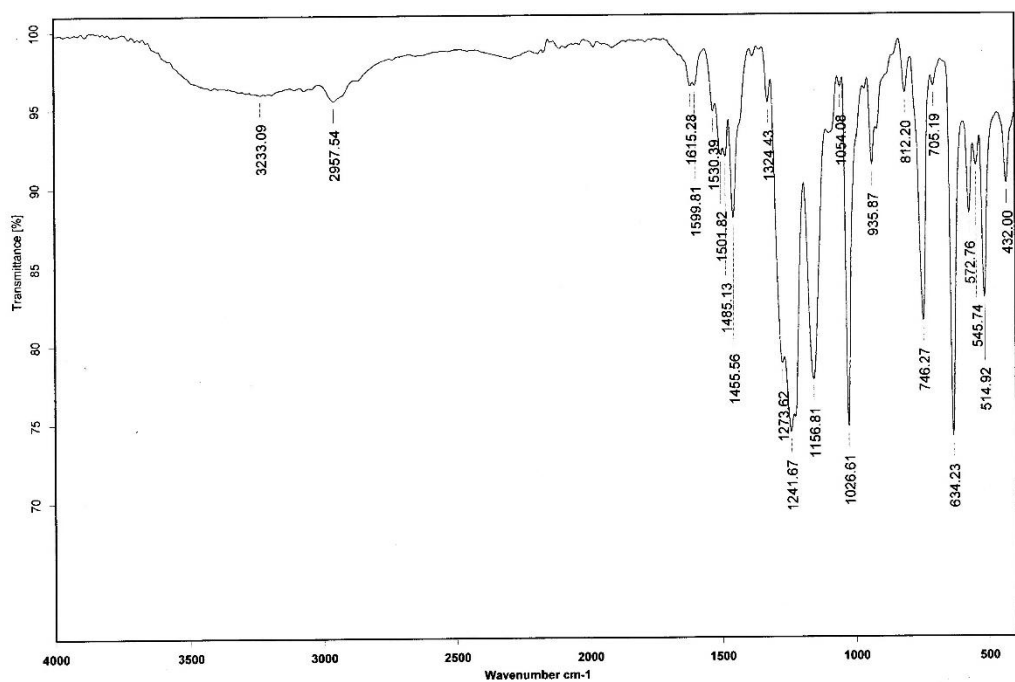


Figura A32. Espectro IR-KBr de $[L_1Cu]OTf_2$

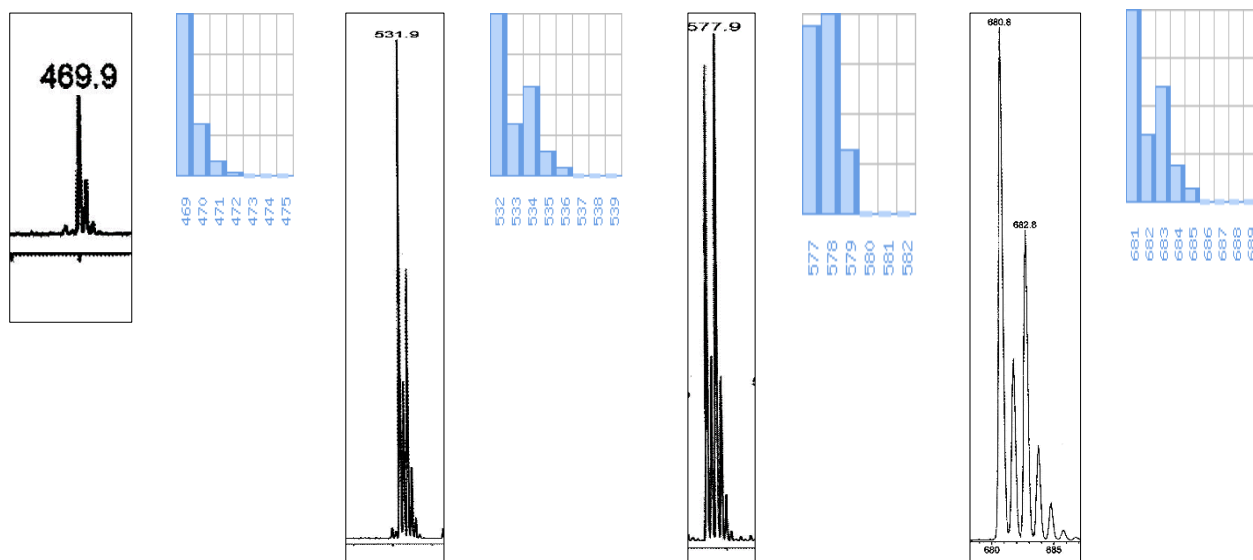


Figura A33. Espectro ESI-MS de $[L_1Cu]OTf_2$ en CH_3CN

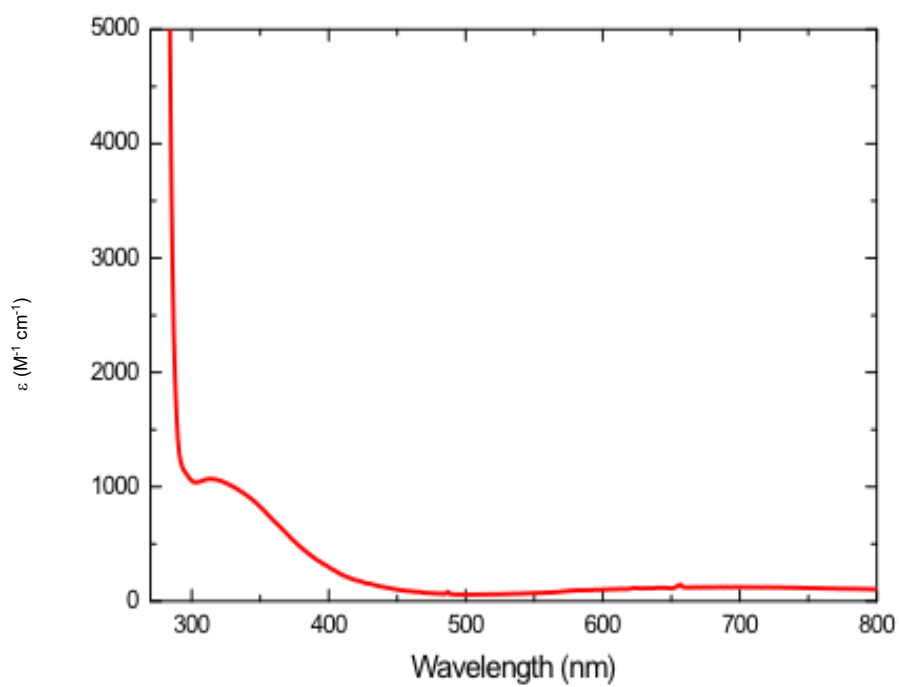


Figura A34. Espectro UV-vis de $[L_1Cu]OTf_2$ en CH_3CN a t.a.

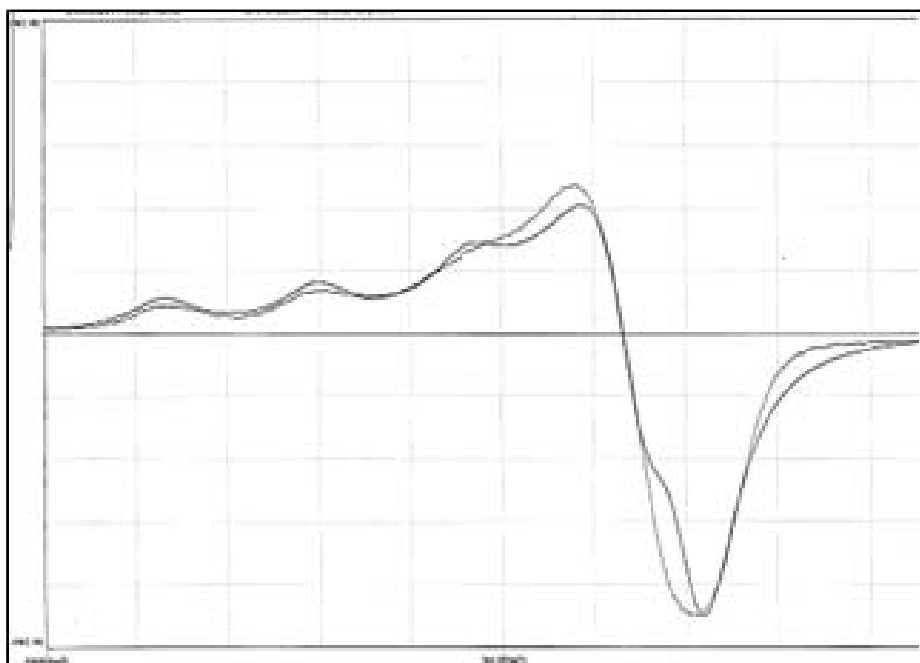


Figura A35. Espectro y simulación RPE de $[L_1Cu]OTf_2$ en CH_3CN a 77 K

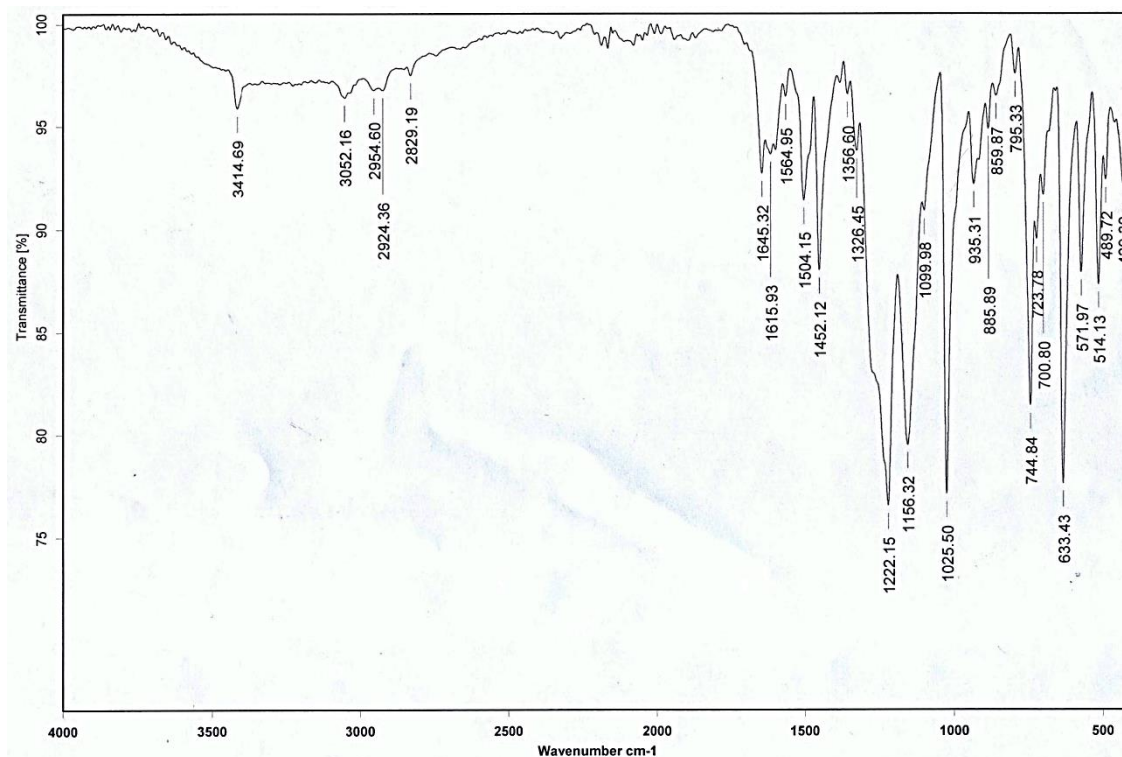


Figura A36. Espectro IR-KBr de $[L_3Cu]OTf_2$

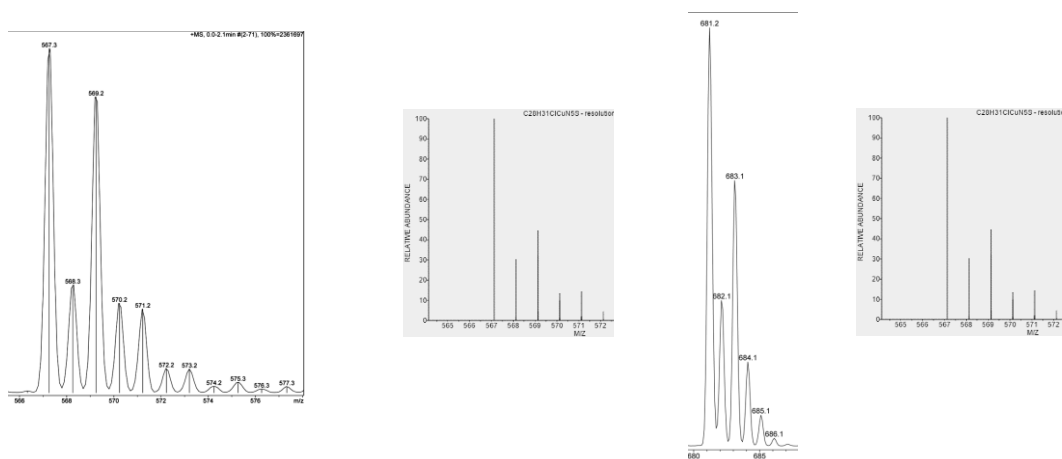
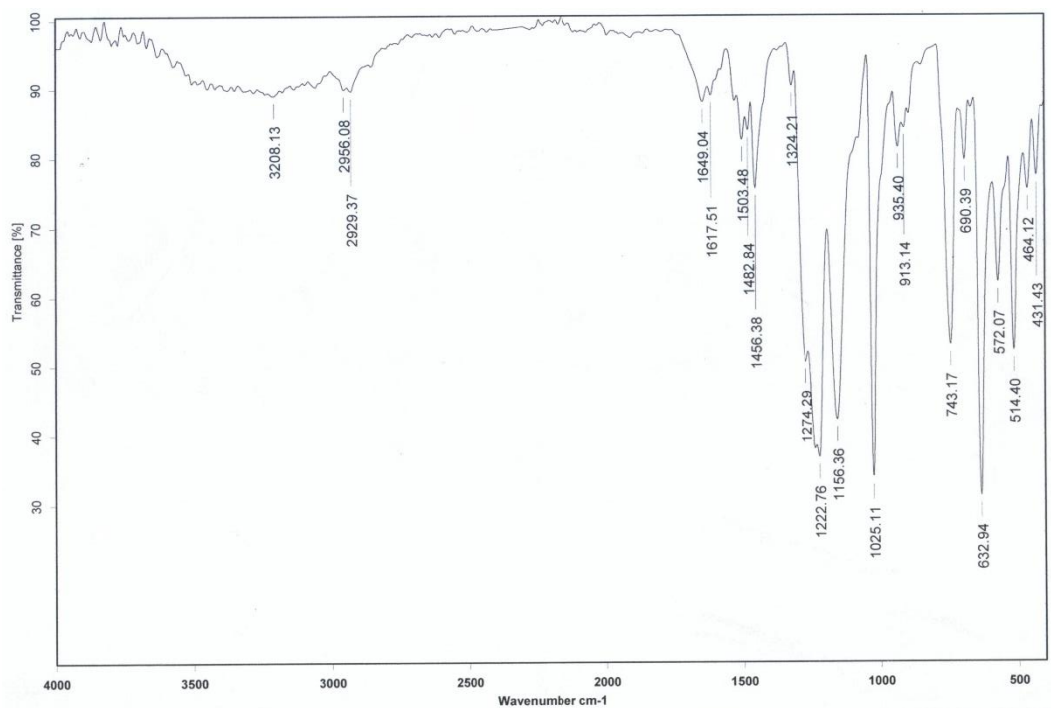


Figura A37. Espectro ESI-MS y simulación de $[L_3Cu]OTf_2$ en CH_3CN

Figura A38. Espectro UV-Vis de $[\text{L}_3\text{Cu}]\text{OTf}_2$ en CH_3CN a t.a.Figura A39. Espectro IR-KBr de $[\text{L}_{\text{se}}\text{Cu}]\text{OTf}_2$

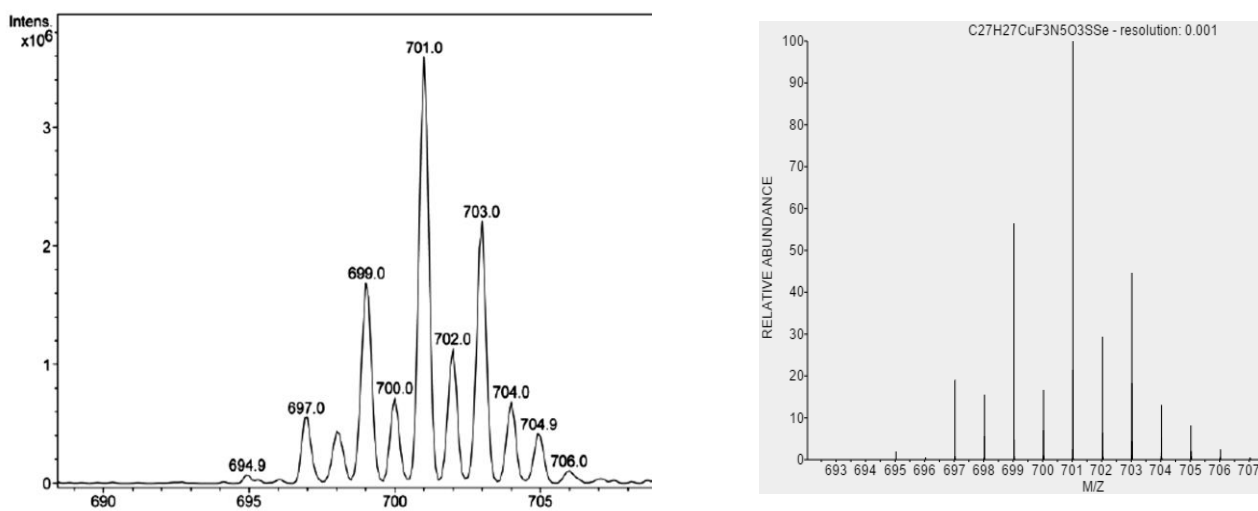


Figura A40. Espectro ESI-MS y simulación de $[\text{LseCu}]\text{OTf}_2$ en CH_3CN

Figura A41. Espectro UV-Vis de $[\text{LseCu}]\text{OTf}_2$ en CH_3CN a t.a.

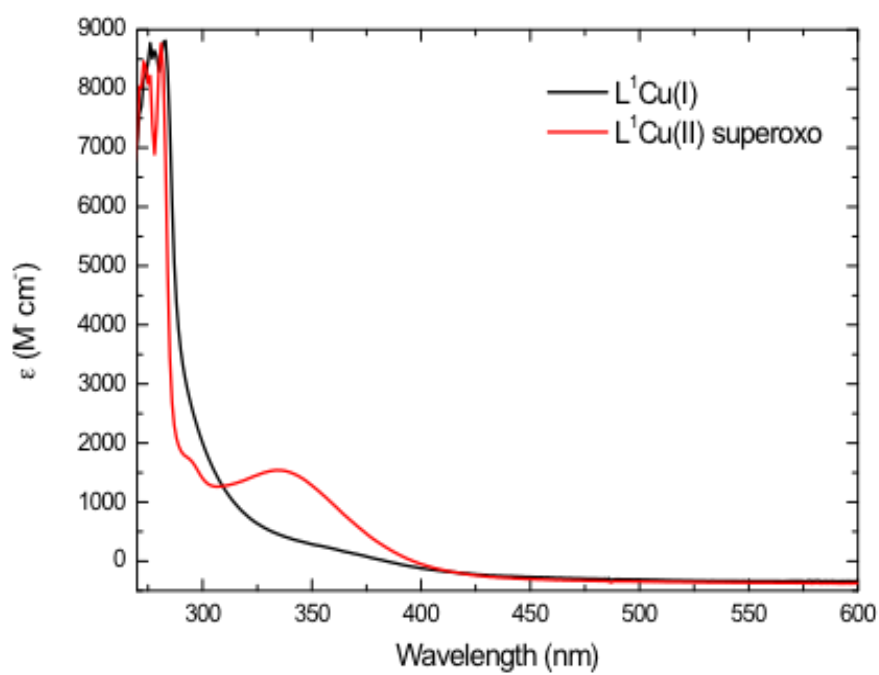


Figura A42. Espectro UV-Vis de [L₁Cu]⁺ + O₂ en THF a -80 °C

Figura A43. Espectro UV-Vis de [L₂Cu]⁺ + O₂ en THF a -80 °C

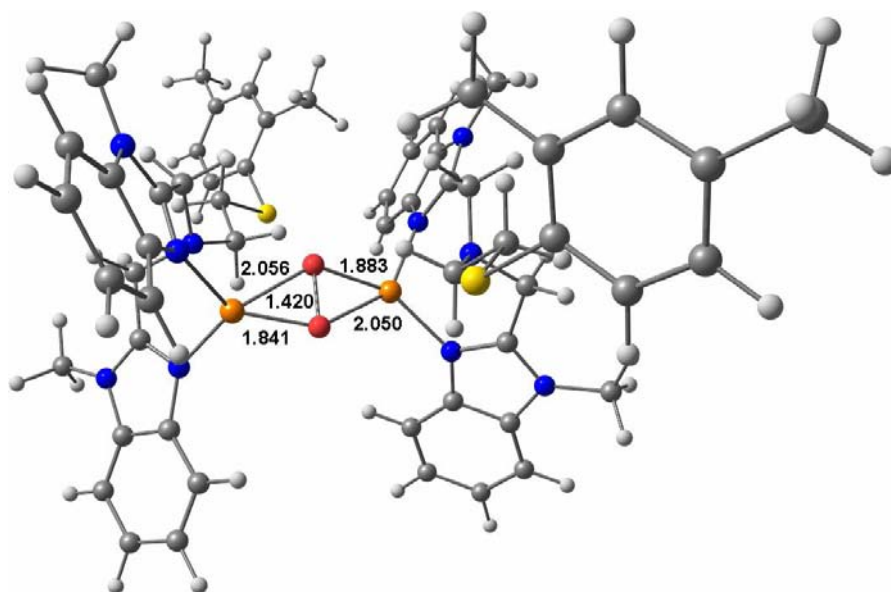


Figura A44. Estructura optimizada de $[(L_1Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ singlete (peroxo lateral, tioéter decoordinado) con distancias interatómicas

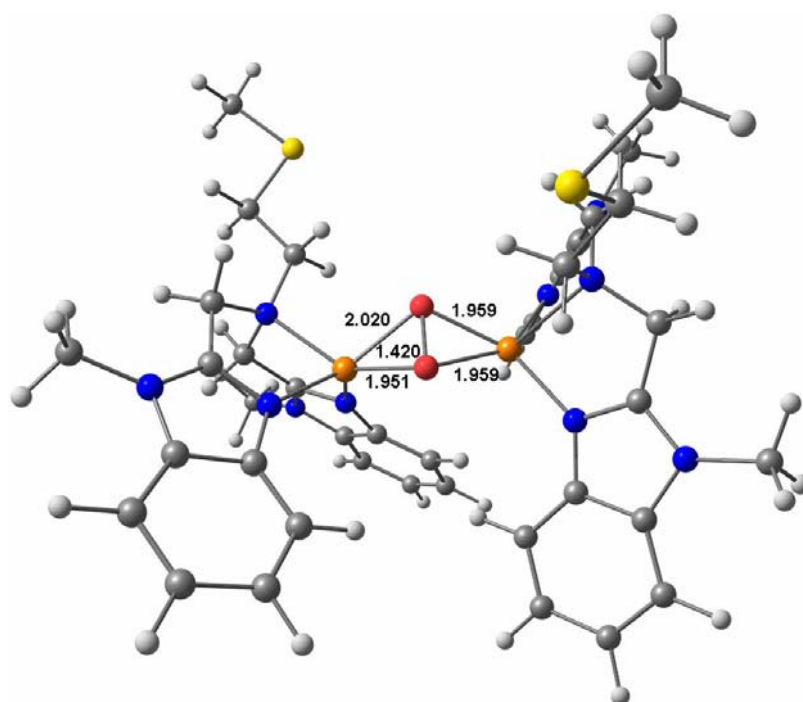


Figura A45. Estructura optimizada de $[(L_2Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ singlete (peroxo lateral, tioéter decoordinado) con distancias interatómicas

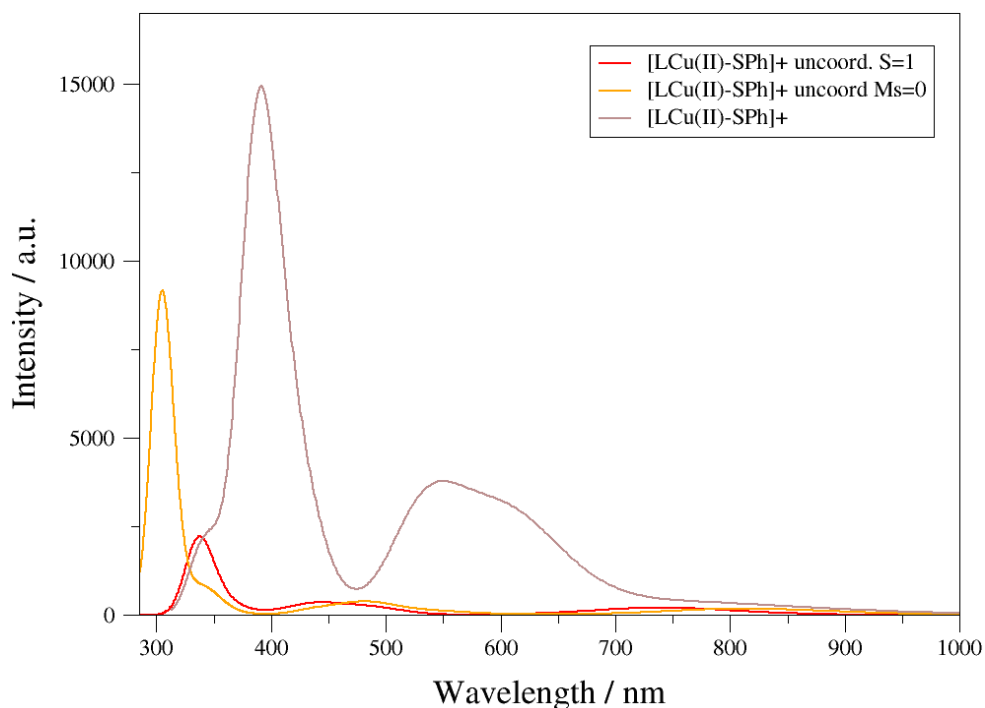


Figura A46. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter descoordinado singlete $[(L_1Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ (rosa pálido), singlete lateral $[L_1CuO_2]^+$ (amarillo), y triplete lateral $[L_1CuO_2]^+$ (rojo)

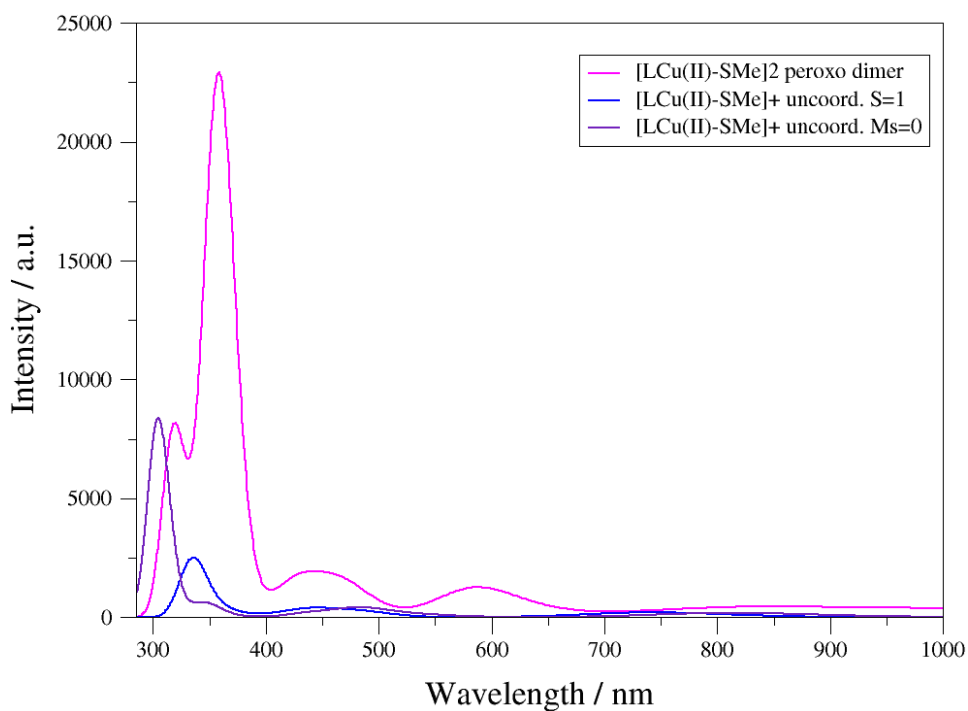


Figura A47. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter descoordinado singlete $[(L_2Cu)_2-\mu-\eta^2:\eta^2-O_2]^{2+}$ (rosa), singlete lateral $[L_2CuO_2]^+$ (morado), y triplete lateral $[L_2CuO_2]^+$ (azul)

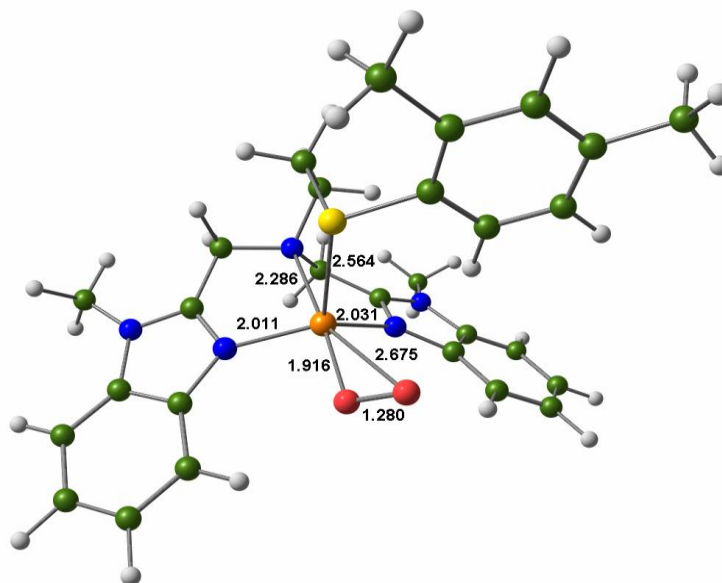


Figura A48. Estructura optimizada de $[L_1CuO_2]^+$ triplete (superoxo lateral, tioéter coordinado) con distancias interatómicas

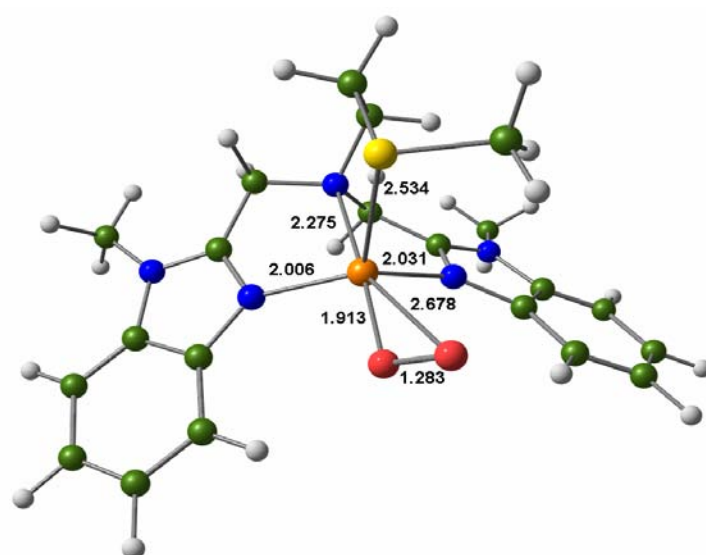


Figura A49. Estructura optimizada de $[L_2CuO_2]^+$ triplete (superoxo lateral, tioéter coordinado) con distancias interatómicas

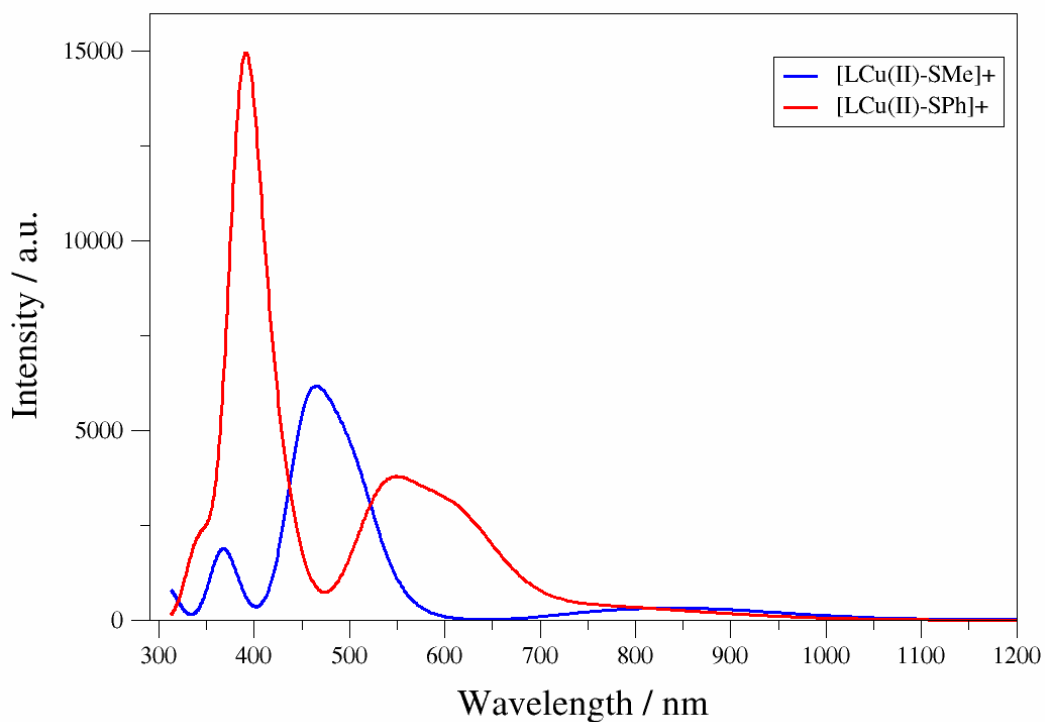


Figura A50. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter coordinado triplete $[\mathbf{L}_1\text{CuO}_2]^+$ (rojo) y triplete $[\mathbf{L}_2\text{CuO}_2]^+$ (azul)

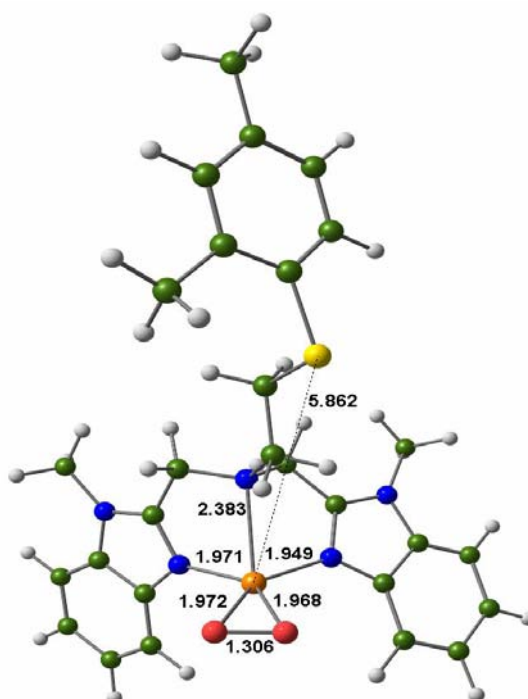


Figura A51. Estructura optimizada de $[\mathbf{L}_1\text{CuO}_2]^+$ triplete (superóxido lateral, tioéter descoordinado) con distancias interatómicas

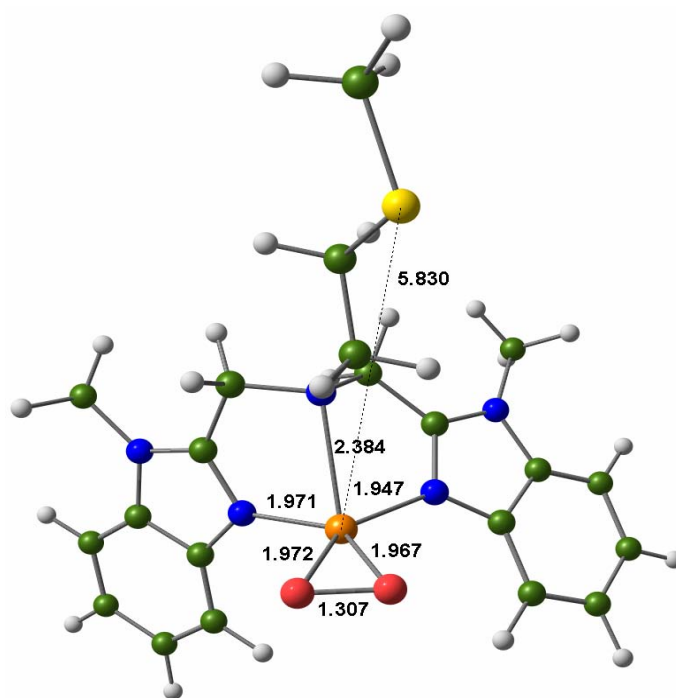


Figura A52. Estructura optimizada de $[\text{L}_2\text{CuO}_2]^+$ triplete (superóxido lateral, tioéter descoordinado) con distancias interatómicas

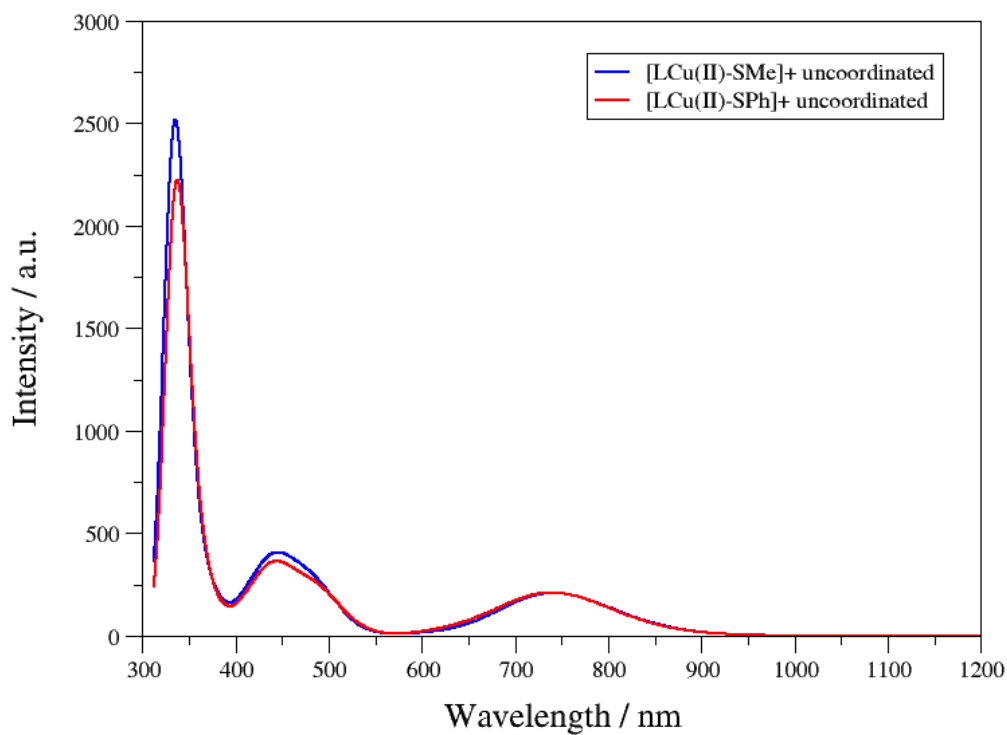


Figura A53. Espectro electrónico calculado por TD-DFT del tioéter descoordinado triplete $[\text{L}_1\text{CuO}_2]^+$ (rojo) y triplete $[\text{L}_2\text{CuO}_2]^+$ (azul)

Figura A54. Diagrama orbital-molecular del superoxo triplete lateral $[\text{L}_1\text{CuO}_2]^+$ con tioéter decoordinado. Código de colores: Cu, Amarillo oscuro; O, rojo; N, azul rey; C, verde; H, blanco

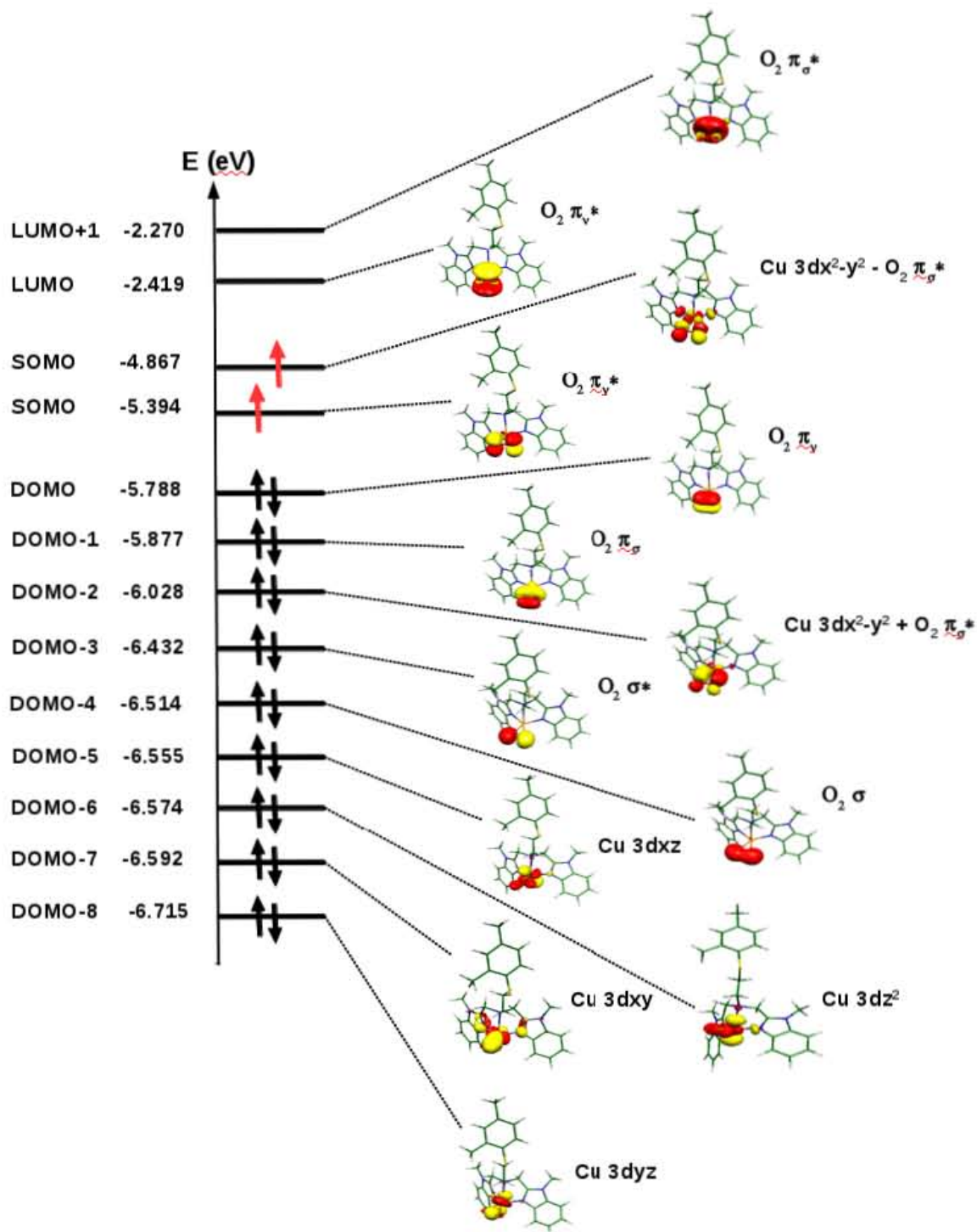


Figura A55. Diagrama orbital-molecular del superoxo triplete lateral $[\text{L}_2\text{CuO}_2]^+$ con tioéter decoordinado. Código de colores: Cu, Amarillo oscuro; O, rojo; N, azul rey; C, verde; H, blanco

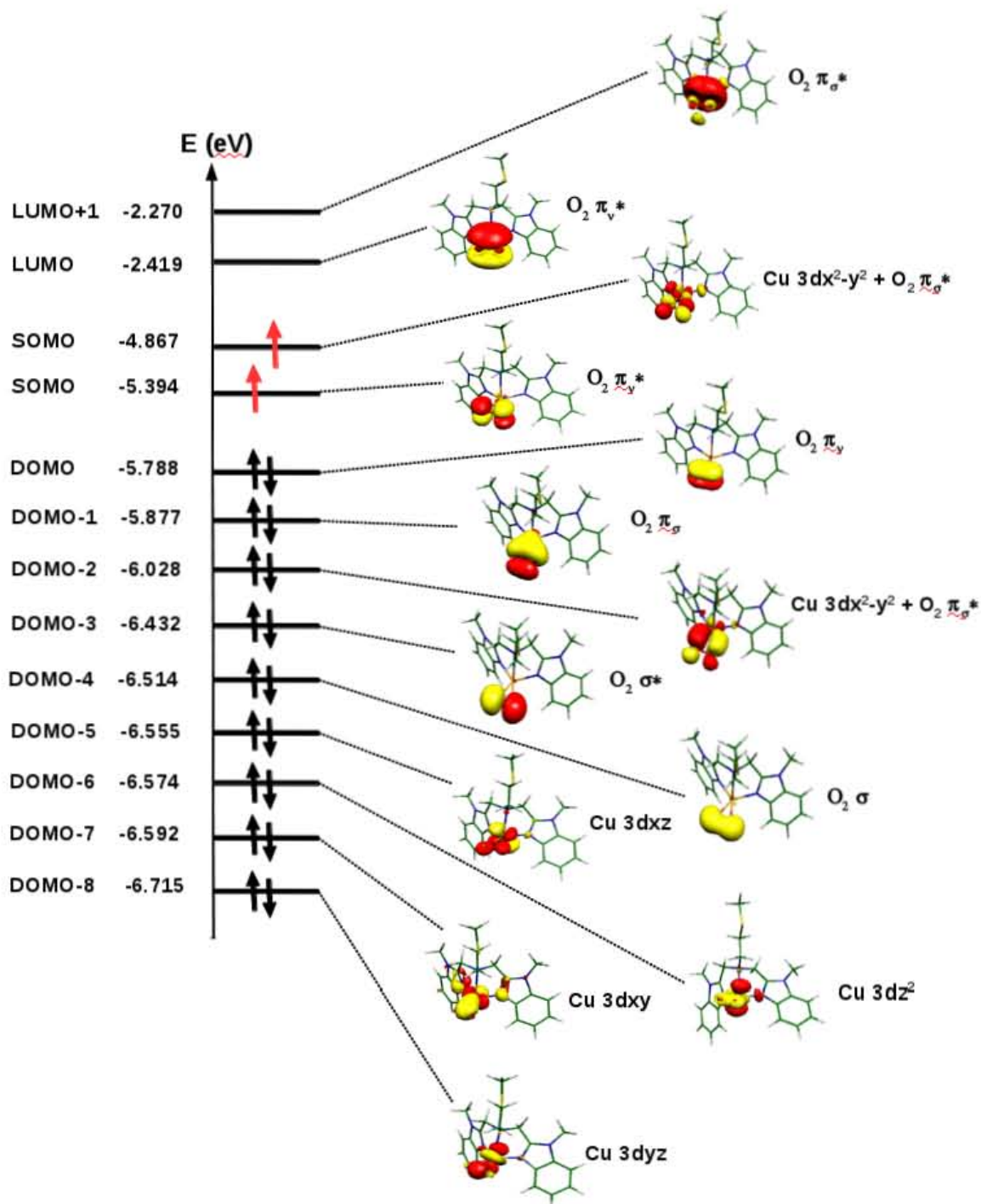


Figura A56. izq.) Espectro UV-Vis de $[\text{L}_2\text{Cu(II)}-\eta^2\text{-O}_2]^+$ en THF a $-40\text{ }^\circ\text{C}$.
 der.) Gráfica de cinética de pseudo-primerorden de la desaparición de la banda de 340 nm del
 complejo $[\text{L}_2\text{Cu(II)}-\eta^2\text{-O}_2]^+$ con THF a $-0\text{ }^\circ\text{C}$, $R = 0.98$

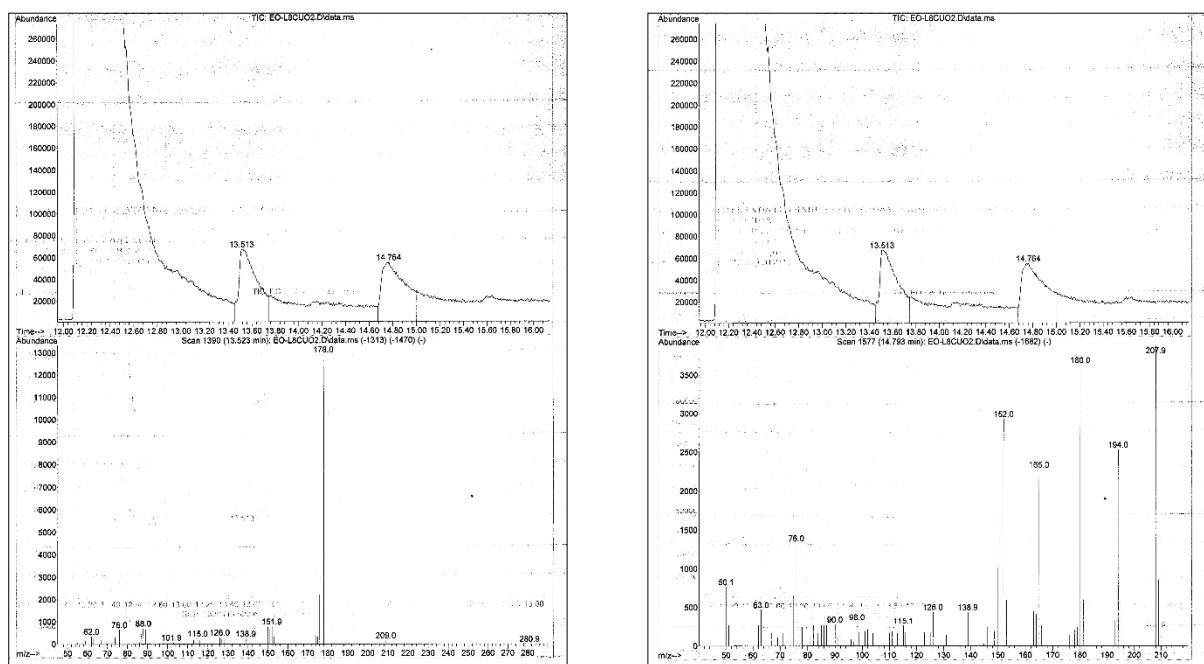


Figura A57. TIC/GC-MS del producto de reacción de $\text{L}_1\text{Cu}^{\text{II}}-\text{OO}^-$ con 9,10-DHA. Todos los espectros a la izquierda corresponden al perfil del antraceno y los de la derecha al perfil de la antraquinona

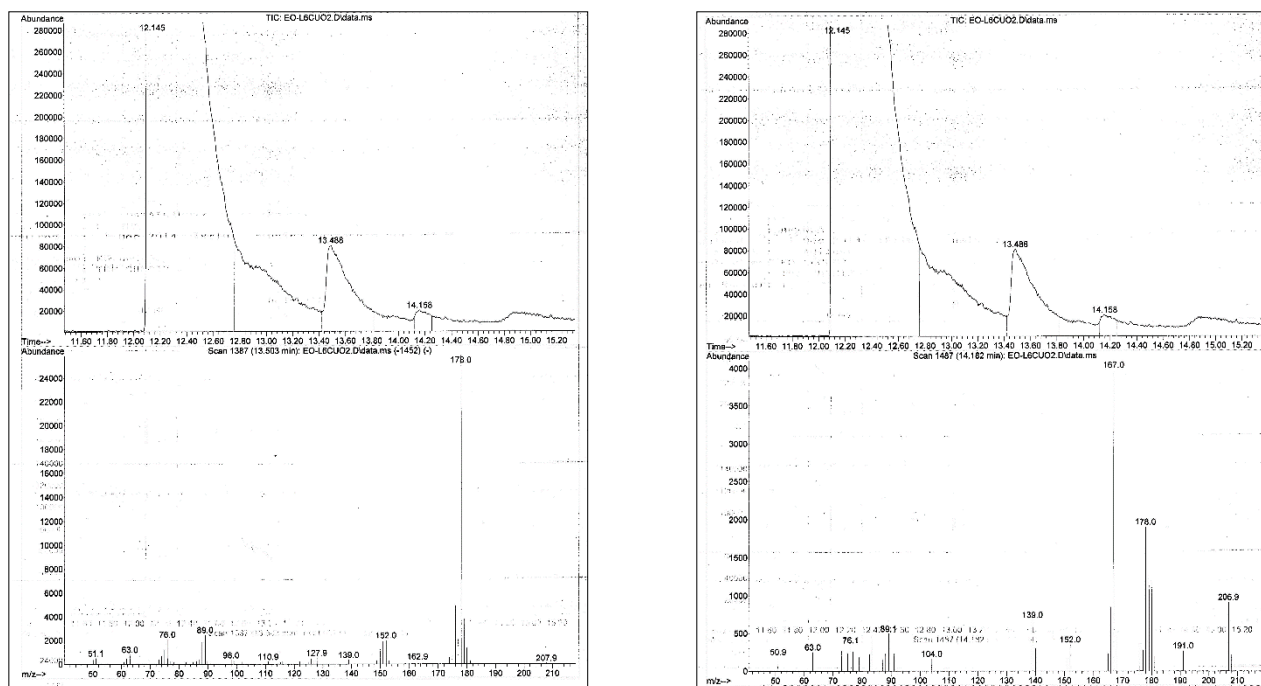


Figura A58. TIC/GC-MS del producto de reacción de $L_2Cu^{II}-OO^-$ con 9,10-DHA

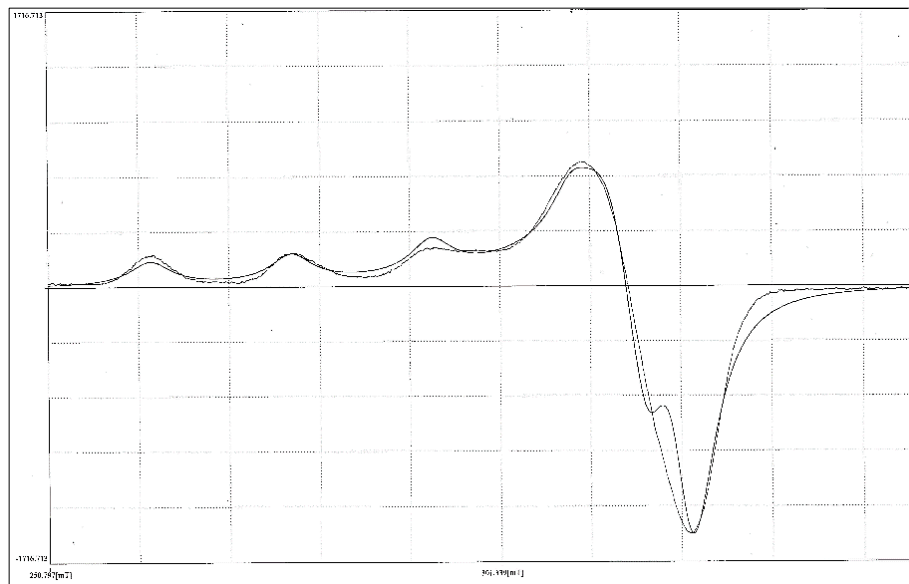


Figura A59. Espectro experimental y simulado RPE de $[L_1Cu^{II}-OOH]^+$ (Acetona, 77 K)

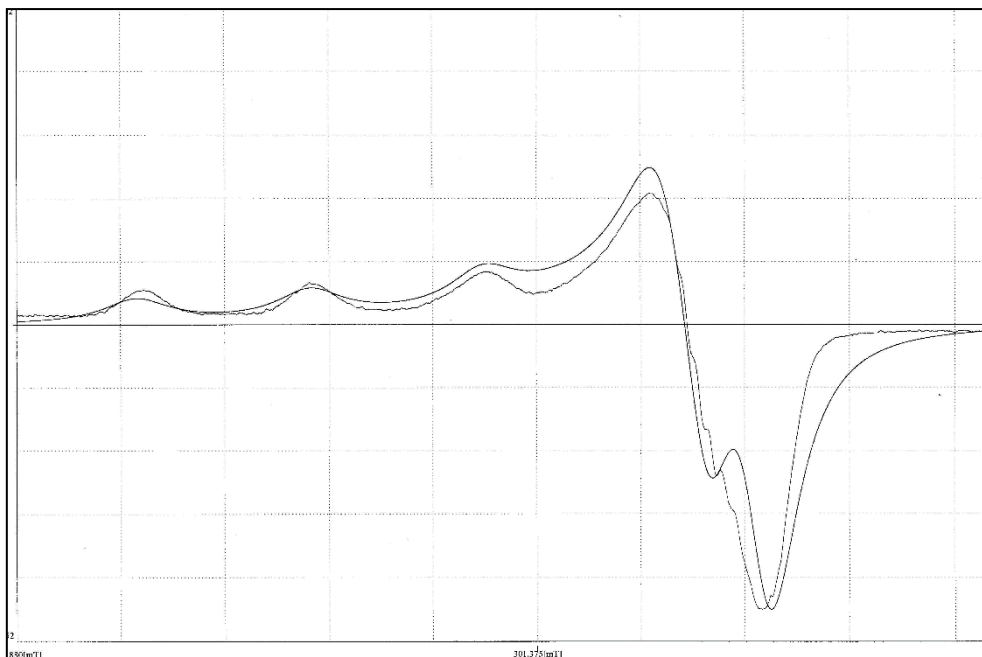


Figura A60. Espectro experimental y simulado RPE de $[\text{L}_2\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OOH}]^+$ (Acetona, 77 K)

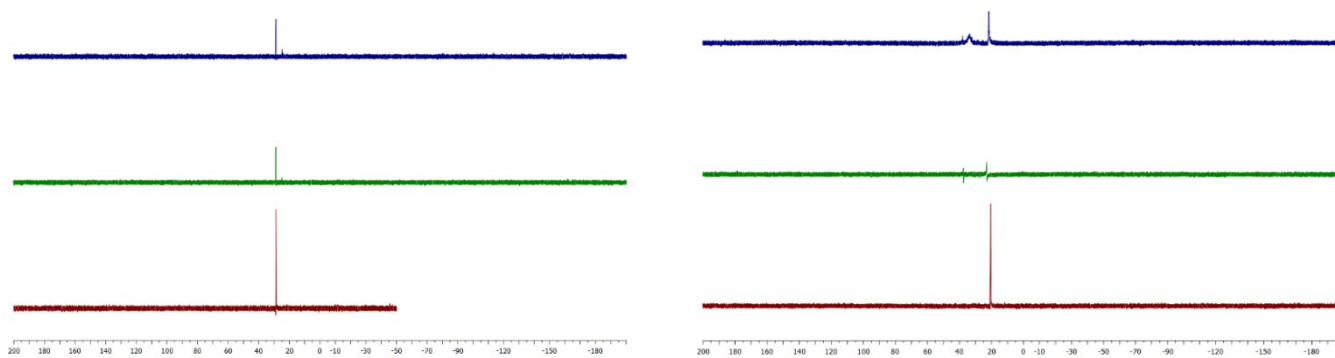


Figura A61. Izq. Espectro ^{31}P -RMN de PPh_3 , Der. ^{31}P -RMN de HPPH_2 con los complejos L_2CuOOH (azul), L_3CuOOH (verde) y blanco (rojo) en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$

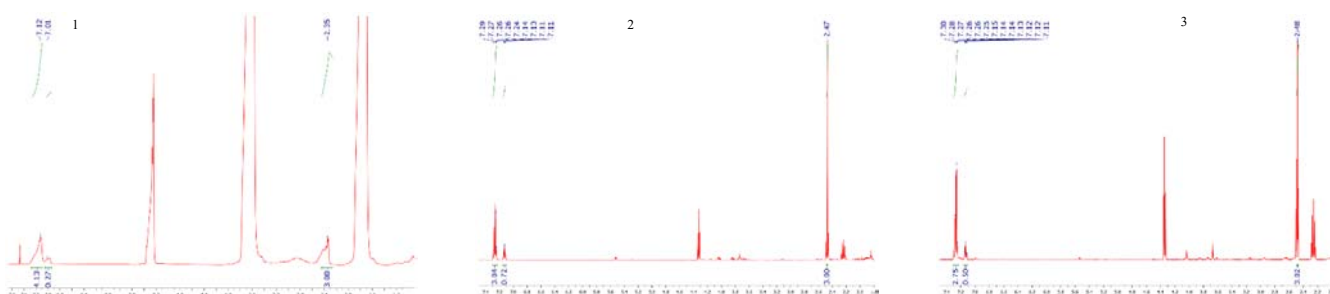


Figura A62. ^1H -RMN de tioanisol con 1) sin complejo, 2) L_2CuOOH y 3) L_3CuOOH en CDCl_3 a 25°C

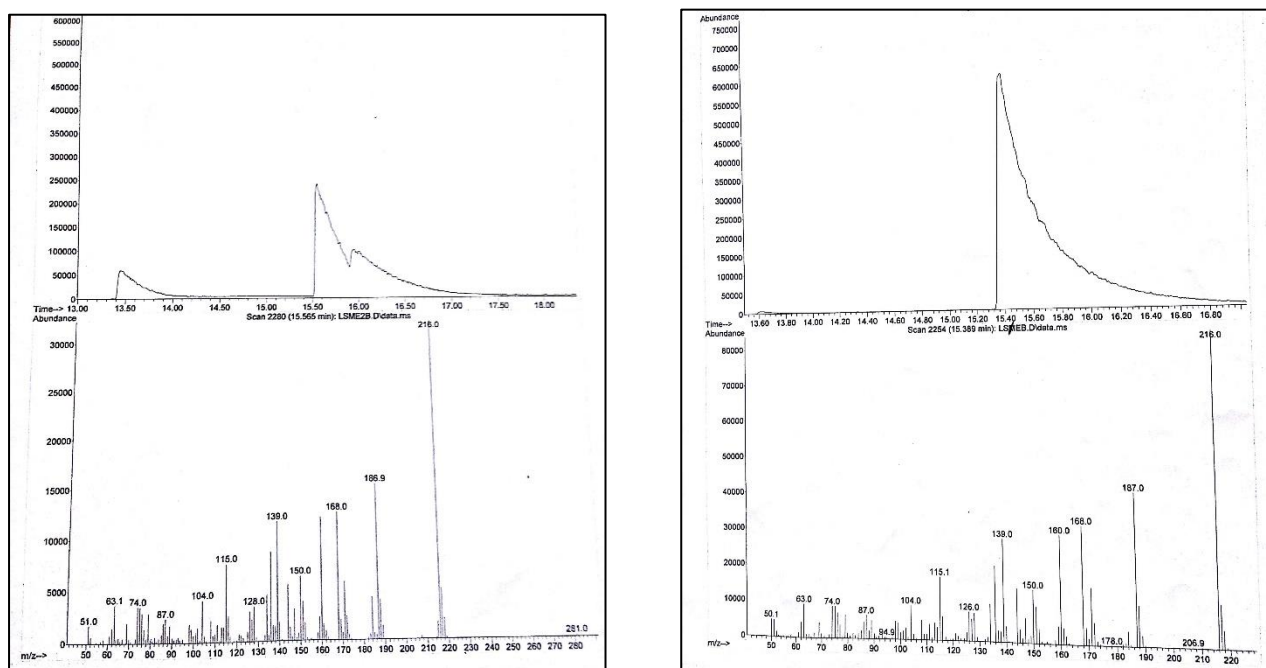
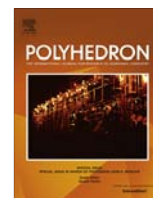


Figura A63. TIC/GC-MS del producto de reacción de izq.) $\text{L}_2\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OOH}$ y der.) $\text{L}_\text{Se}\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OOH}$ con DBT

PUBLICACIONES



Synthesis, spectroscopic, and structural characterization of mixed thioether–benzimidazole copper complexes



Ivan Castillo^{a,*}, Brenda N. Sánchez-Eguía^a, Paulina R. Martínez-Alanis^a
 Víctor M. Ugalde-Saldívar^b, Marcos Flores-Alamo^b

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, CU, México DF 04510, Mexico

^b Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, CU, México DF 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2014

Accepted 22 October 2014

Available online 30 October 2014

Keywords:

Copper
 Thioether
 Benzimidazoles
 Electrochemistry
 X-ray structures

ABSTRACT

Mixed N,S tripodal ligands bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)(2-methylbenzimidazolyl)amine **L**¹, bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)(1-methyl-2-methylbenzimidazolyl)amine **L**², and bis(1-methyl-2-methylbenzimidazolyl)(2-methylthioethyl)amine **L**³ were employed to prepare the corresponding copper complexes. **L**¹ and **L**² associate weakly with Cu²⁺, while the reaction of CuI with **L**¹ affords [**L**¹CuI]. This was characterized in the solid state by the chelating tridentate coordination mode of **L**¹, with a free thioether, and a terminal iodide, in contrast with the commonly observed Cu–I–Cu bridges. For **L**³, Cu⁺ and Cu²⁺ complexes are accessible as [**L**³Cu]PF₆, and the crystallographically characterized [**L**³CuCl]Cl. The latter has a square pyramidal coordination around the Cu²⁺ ion, with the thioether as an axial ligand that remains coordinated in solution, as evidenced by UV–Vis spectroscopy.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Generally regarded as poor donors for most transition metals, thioethers have recently been reevaluated as important ligands due to their involvement in several chemical and biological systems [1]. In the specific case of the active sites of copper-containing metalloenzymes, thioether-based donors have attracted considerable attention in the extensively studied blue copper proteins [1b,c,2], in which the combined effect of thiolates and thioethers has a key role in their characteristic fast electron-transfer kinetics. In recent years, the presence of methionine residues as thioether ligands in several types of copper monooxygenases that activate strong C–H bonds [1e,f,i,3], has further spurred the interest in copper–thioether systems [4]. In peptidylglycine hydroxylating monooxygenase (PHM), the presence of methionine donors around copper centers appears to modulate the redox potential of the Cu²⁺/Cu⁺ couple towards relatively high values. Inorganic model complexes aimed at emulating thioether-rich active sites can achieve some degree of electrochemical modulation based on the choice of nitrogen-based heterocyclic donor [4], and additionally by varying the ring size of the chelates [1c]. In this context, we recently reported a series of five- and six-member chelating tripodal ligands, with the six-member thioether–amine copper chelates

displaying reactivity patterns indicative of an incipient sulfur radical cation character during oxidation of the cuprous complexes [5]. As an extension to this work, we herein present the electrochemical and structural characterization of the thioether rich mixed-donor N₂S₂ and N₃S ligands (**L**¹–**L**³ in Scheme 1), and compare it with the previously reported **L**⁴ [6].

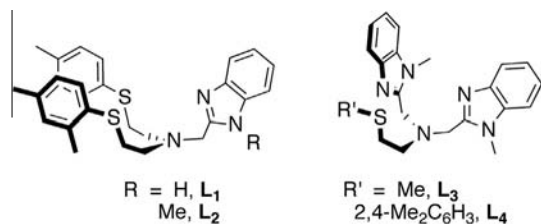
2. Experimental

2.1. Materials and methods

Air-sensitive compounds were manipulated under an atmosphere of dinitrogen in a glovebox or by vacuum-line and Schlenk techniques. Solvents were dried by standard methods and distilled under N₂ prior to use. CuI, [Cu(CH₃CN)₄]PF₆, [Cu(CH₃CN)₄]OTf, Cu(ClO₄)₂·6H₂O, CuCl₂·2H₂O, Cu(OAc)₂·H₂O, 2-(methylthio)ethylamine, and 2,4-dimethylthiophenol, were used as received from commercial suppliers (*Warning!* Metal perchlorates are potentially explosive and should be handled with extreme care). Melting points were determined on an Electrothermal Mel-Temp apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with a Bruker Tensor 27 spectrophotometer in the 4000–400 cm⁻¹ region as KBr disks. UV–Vis spectra were recorded on a Shimadzu UV-160U spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a JEOL Eclipse 300 spectrometer in CDCl₃ with tetramethylsilane as an internal standard, or in CD₃CN referenced relative to the residual solvent pro-

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56224449; fax: +52 55 56162217.

E-mail address: joseivan@unam.mx (I. Castillo).



Scheme 1. Thioether–benzimidazole ligands $\text{L}^1\text{--L}^4$.

tons at 300 (^1H) or 75 MHz (^{13}C). Mass spectra were obtained on a JEOL JMS-SX-102A mass spectrometer at an accelerating voltage of 10 kV, with a nitrobenzyl alcohol matrix and Xenon atoms at 6 keV (FAB⁺), or a Bruker Daltonics Esquire 6000 spectrometer with ion trap (Electrospray). Elemental analyses were performed at the microanalytical facility of the Instituto de Química.

2.2. X-ray crystallography

Single crystals were mounted on a Bruker Smart diffractometer equipped with an Apex CCD area detector, or an Oxford Diffraction Gemini “A” diffractometer with a CCD area detector. Frames were collected by omega scans, and integrated with the Bruker SAINT software package using the appropriate unit cell in the case of the former diffractometer [7], and the CRYSLISPRO and CRYSLIS RED software packages for data collection and data integration with the latter [8]. The structures were solved using the SHELXS-97 program [9], and refined by full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-97 [10]. Weighted R -factors, R_w , and all goodness of fit indicators, S , were based on F^2 . The observed criterion of ($F^2 > 2\sigma F^2$) was used only for calculating the R -factors. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters in the final cycles of refinement. Hydrogen atoms were placed in idealized positions, with C–H distances of 0.93 Å and 0.98 Å for sp^2 and sp^3 hybridized carbon atoms, respectively. The isotropic thermal parameters of the hydrogen atoms were assigned the values of $U_{\text{iso}} = 1.2$ times the thermal parameters of the parent non-hydrogen atom. Selected crystallographic data are presented in Table 1. In the structure of [L^3CuCl]Cl·EtOH· H_2O , the molecules of ethanol and water were

Table 1
Crystallographic data.

	[L^1Cu]	[L^3CuCl]Cl·EtOH· H_2O
Empirical formula	$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{CuN}_3\text{S}_2$	$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{CuN}_5\text{O}_2\text{S}$
Formula weight	666.13	575.02
Temperature /K	140(2)	298(2)
Crystal system	triclinic	trigonal
Space group	$P1$	$R\bar{3}$
Crystal size (mm)	$0.40 \times 0.50 \times 0.58$	$0.05 \times 0.07 \times 0.22$
a (Å)	8.5453(13)	34.5000(14)
b (Å)	9.3772(11)	34.5000(14)
c (Å)	10.1043(10)	11.9367(10)
α (°)	98.380(9)	90
β (°)	102.018(11)	90
γ (°)	113.669(13)	120
V (Å ³)	701.13(15)	12304.2(12)
Z	1	8
μ (Mo- K_α) (mm ⁻¹)	2.050	1.099
θ range	3.64–26.05	1.84–25.37
hkl range	$-10 \leq h \leq 9$ $-10 \leq k \leq 11$ $-12 \leq l \leq 11$	$-41 \leq h \leq 41$ $-41 \leq k \leq 41$ $-14 \leq l \leq 14$
D_{calc} (kg m ⁻³)	1.578	1.397
Refine parameters	323	366
Total reflections	4608	34252
Unique reflections	3646	5012
R_1 [$I > 2\sigma(I)$]	0.0311	0.0587
wR_2	0.0764	0.1500
Goodness of fit (GOF)	1.042	0.801

disordered. The former was modeled over two positions with approximately 50% occupancy each; the water molecule was split over two locations with 50% occupancy corresponding to O2 and O3, and each one was modeled over two slightly different positions corresponding to O2A and O3A.

2.3. EPR spectroscopy

EPR measurements were made at room temperature or 77 K in quartz tubes with a Jeol JES-TE300 spectrometer operating at X band frequency (9.4 GHz) at 100 kHz field modulation, with a cylindrical cavity (TE₀₁₁ mode); spectra were acquired in frozen acetonitrile solution. The external measurement of the static magnetic field was made with a precision gaussmeter Jeol ES-FC5. Spectral acquisition, manipulations, and simulations were performed using the ESPRIT-382, v1.916 software.

2.4. Electrochemistry

Cyclic voltammetry measurements were made under N_2 in anhydrous acetonitrile with a potentiostat–galvanostat EG&G PAR model 263A with a glassy carbon working electrode and a platinum wire auxiliary electrode. Potentials were recorded versus a pseudo-reference electrode of AgCl(s)–Ag(wire) immersed in a 0.1 M $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NCl}$ acetonitrile solution. All voltammograms were started from the current null potential ($E_{i=0}$) and were scanned in both directions, positive and negative, and obtained at a scan rate of 0.200 V s⁻¹. In agreement with IUPAC convention, the voltammogram of the ferricinium–ferrocene (Fc^+/Fc) system was obtained to establish the values of half wave potentials ($E_{1/2}$) from the expression $E_{1/2} = (E_{\text{ap}} + E_{\text{cp}})/2$. To obtain the normalized current for each complex, the measured current was divided by the exact molar concentration of the electroactive species.

2.5. Synthetic procedures

2.5.1. Bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)(1-methyl-2-methylbenzimidazolyl)amine (L^2)

1-Methyl-2-chloromethylbenzimidazole (407 mg, 2.26 mmol), bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)amine (784 mg, 2.28 mmol), potassium carbonate (940 mg, 6.81 mmol), and sodium iodide (40 mg, 0.27 mmol) were placed in 10 mL CH_3CN in a round bottom flask, and the mixture was heated to reflux for 8 h. The mixture was then filtered through Celite, concentrated to dryness, and washed with 10 mL of diethylether. 403 mg of L^2 was obtained as a pale yellow solid (37%). Mp: 109–112 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.83 (m, 1H, BzIm), 7.54 (m, 3H, BzIm), 7.08 (d, $^3J = 8.0$ Hz, Ar), 6.89 (s, 2H, $^4J = 1.5$ Hz, Ar), 6.80 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, Ar), 4.79 (s, 2H, BzImCH₂), 4.20 (s, 3H, NCH₃), 3.11 (m, 2H, SCH₂), 3.03 (t, 2H, $^3J = 6.6$ Hz, NCH₂), 2.23 (s, 6H, ArCH₃), 2.20 (s, 6H, ArCH₃) ppm. FAB⁺ MS: m/z 490 [$\text{L}^2 + \text{H}$]⁺. Anal. Calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{S}_2$ (489.74): C, 71.12; H, 7.20; N, 8.58. Found: C, 70.72; H, 6.79; N, 8.97%.

2.5.2. Bis(1-methyl-2-methylbenzimidazolyl)(2-methylthioethyl)amine (L^3)

1-Methyl-2-chloromethylbenzimidazole (1.12 g, 6.20 mmol), 2-methylthioethylamine (0.57 g, 6.47 mmol), potassium carbonate (1.79 g, 12.9 mmol), and sodium iodide (20 mg, 0.14 mmol) were placed in 15 mL CH_3CN in a round bottom flask, and the mixture was heated to reflux for 5 h. The solution was then filtered through Celite, concentrated to dryness, and extracted with 3×10 mL of dichloromethane; the solution was concentrated to ca. 5 mL, and acetonitrile was added until it became turbid. Cooling to -20 °C afforded 0.64 g of L^3 as a colorless solid (55%). Mp: 175–177 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.83 (m, 2H, BzIm), 7.20 (m, 6H, BzIm), 3.94 (s, 4H, BzImCH₂), 3.60 (s, 6H, NCH₃), 2.87 (t, 2H,

$^3J = 6.9$ Hz, NCH_2), 2.54 (t, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, SCH_2), 1.76 (s, 3H, SCH_3) ppm. FAB⁺ MS: m/z 307 [$L^3 - (CH_2CH_2SMe) + H$]⁺. Anal. Calc. for $C_{21}H_{25}N_5S$ (379.52): C, 66.46; H, 6.64; N, 18.45. Found: C, 66.75; H, 6.80; N, 17.98%.

2.5.3. $[Cu(C_{28}H_{33}N_3S_2)] [L^1Cu]$

To a solution of L^1 (105 mg, 0.22 mmol) in 5 mL CH_3CN was added CuI (42 mg, 0.22 mmol), and the mixture was stirred under N_2 for 3 h. A colorless solid started to deposit, and addition of 2 mL of diethylether and filtration afforded 122 mg (83%) of $[L^1Cu]$ as colorless microcrystals. Mp: 151–153 °C. 1H NMR (300 MHz, CD_3CN): $\delta = 10.69$ (s, 1H, NH), 7.63 (m, 2H, BzIm), 7.36 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, Ar), 7.29 (m, 2H, BzIm), 7.05 (s, 2H, Ar), 6.86 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, Ar), 4.03 (s, 2H, BzIm CH_2), 3.11 (m, 4H, SCH_2), 2.90 (m, 4H, NCH_2), 2.39 (s, 6H, $ArCH_3$), 2.24 (s, 6H, $ArCH_3$) ppm. Anal. Calc for $C_{28}H_{33}CuIN_3S_2$ (666.16): C, 50.48; H, 4.99; N, 6.31. Found, C, 50.08; H, 5.00; N, 6.27%.

2.5.4. $[Cu(O_2CCH_3)_2(C_{29}H_{35}N_3S_2)] [L^2Cu(OAc)_2]$

To a solution of L^2 (200 mg, 0.42 mmol) in 10 mL methanol was added $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ (76 mg, 0.42 mmol), and the mixture was heated to reflux for 4 h. A turquoise solid started to deposit, the volume was reduced to ca. 3 mL under reduced pressure, and addition of 2 mL of diethylether and filtration afforded 129 mg (49%) of $[L^2Cu(OAc)_2]$ as turquoise microcrystals. Mp: 124–127 °C (dec). IR (KBr): $\nu = 2924, 1708, 1671, 1582, 1478, 1397, 1333, 1293, 1244, 1153, 1125, 1053, 1009, 931, 878, 813, 743, 675, 619, 548, 500, 435$ cm^{-1} . Anal. Calc for $C_{33}H_{41}CuN_3O_4S_2$ (671.37): C, 59.04; H, 6.16; N, 6.26; Found, C, 59.19; H, 6.54; N, 6.18%. UV–Vis (MeOH, λ_{max} , r.t.) 683 nm, $104 M^{-1} cm^{-1}$ ($d-d$ transition), 400 nm (shoulder), $\sim 150 M^{-1} cm^{-1}$ ($S \rightarrow Cu$ LMCT).

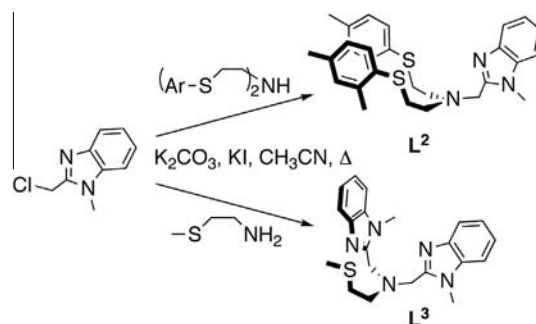
2.5.5. $[CuCl(C_{21}H_{25}N_5S)]Cl [L^3CuCl]Cl$

To a solution of L^3 (125 mg, 0.33 mmol) in 8 mL methanol was added $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (56 mg, 0.33 mmol), and the mixture was heated to reflux for 4 h. Volatile materials were then evaporated under vacuum, and the blue oil obtained was triturated with 5 mL diethylether, washed with an additional 5 mL of diethylether, and filtered to afford 137 mg (78%) of $[L^3CuCl]Cl$ as blue microcrystals. Mp: 199–202 °C. IR (KBr): $\nu = 2931, 2896, 1613, 1515, 1496, 1403, 1360, 1331, 1270, 1237, 1147, 1064, 1028, 979, 877, 754, 640, 572, 515, 437$ cm^{-1} . Anal. Calc for $C_{21}H_{25}Cl_2CuN_5S \cdot 2H_2O$ (531.99): C, 47.41; H, 5.12; N, 13.16; Found, C, 47.78; H, 5.28; N, 13.99%. UV–Vis (MeOH, λ_{max} , r.t.) 644 nm, $116 M^{-1} cm^{-1}$ ($d-d$ transition), 304 nm, $941 M^{-1} cm^{-1}$ ($S \rightarrow Cu$ LMCT).

3. Results and discussion

3.1. Ligand synthesis

Previously, we reported the synthesis of bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)(2-methylbenzimidazolyl)amine (L^1), which features a N_2S_2 set defined by two arylthioethers, a benzimidazole, and a tertiary amine donors [5b]. Its cuprous and cupric complexes were characterized spectroscopically, with the latter derivatives being unsuitable for diffraction analyses, as evidenced by the recovery of starting Cu^{2+} salts (perchlorate, triflate, acetate) in all attempts to obtain single crystals. The *N*-methyl-benzimidazole analog of L^1 , namely bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)(1-methyl-2-methylbenzimidazolyl)amine (L^2), was prepared by employment of 1-methyl-2-(chloromethyl)benzimidazole as starting material in the reaction with bis(2,4-dimethylphenylthioethyl)amine (Scheme 2). L^2 was spectroscopically analyzed, and as expected its IR and 1H NMR features are very similar to those of L^1 : in the 1H NMR spectrum of L^2 in $CDCl_3$, two singlets corresponding to



Scheme 2. Ligand synthesis.

the methyl groups on the 2 and 4 positions of the aromatic rings are present at δ 2.20 and 2.23 ppm (δ 2.24 and 2.34 ppm for L^1), as well as the additional *N*-methyl-benzimidazole singlet at δ 4.20 ppm. Positive-ion fast atom bombardment mass spectrometry (FAB⁺ MS) confirmed the identity of L^2 , with peak corresponding to the molecular ion observed at $m/z = 490$ [L^2]⁺ (Fig. S1 in Appendix A).

In addition to the N_2S_2 donors L^1 and L^2 , we prepared the N_3S ligand L^3 based on the coordination environment provided for copper in the active site of PHM. Its preparation is analogous to its arylthioether analog L^4 , which we reported recently [6]. It consists of the reaction of (2-methylthio)ethylamine with two equiv. of 1-methyl-2-(chloromethyl)benzimidazole in the presence of base, as depicted in Scheme 2. L^3 was satisfactorily characterized by standard spectroscopic techniques: 1H NMR spectroscopy in $CDCl_3$ reveals the presence of two singlets corresponding to the *S*-methyl and *N*-methyl-benzimidazole groups at δ 1.76 and 3.60 ppm, respectively; micro-analysis was also consistent with its proposed structure. FAB⁺ MS of L^3 shows a fragmentation peak at $m/z = 307$, consistent with the loss of the thioether arm $-CH_2CH_2SMe$ (Fig. S2), which may occur in the ionization chamber.

3.2. Copper complexes

As previously established with related thioether-rich ligands, preparation of cuprous complexes is straightforward, although single crystals suitable for X-ray crystallography are difficult to access when weakly coordinating anions are employed [5,11]. Thus, the use of $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$, $[Cu(CH_3CN)_4]ClO_4$, and $[Cu(CH_3CN)_4]OTf$ ($OTf = SO_3CF_3$) as Cu^+ sources in the reactions with L^1 – L^3 resulted in microcrystalline materials. These were characterized in acetonitrile solution by electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) as monomeric species, as previously determined for complex $[L^1Cu]ClO_4$ [5b]. Likewise, reaction of equimolar amounts of L^2 and $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$ in acetonitrile gave rise to a peak at $m/z = 552$, assigned to the species $[L^2Cu]^+$ (Fig. S3). In the case of L^3 , reaction with Cu^+ salts of weakly coordinating anions resulted in a monomeric species in acetonitrile solution as well, as evidenced by the peak at $m/z = 442$ corresponding to $[L^3Cu]^+$ in ESI MS (Fig. S4). Further characterization of the putative $[L^2Cu]PF_6$ complexes was precluded possibly by the labile nature of the Cu^+ centers, which may give rise to aggregates with different ligand to metal ratios, thus resulting in mixtures of complexes in the solid state. Nonetheless, structural characterization of the cuprous complex of L^1 was achieved by employing CuI.

X-ray quality crystals of $[L^1Cu]$ were obtained from the reaction of equimolar amounts of L^1 and CuI by slow evaporation of acetonitrile in the triclinic space group *P1*. The monomeric complex features a N_2S donor set provided by the tripodal ligand, with only one of the arylthioether groups coordinated to the Cu^+ center (Fig. 1). A highly distorted trigonal pyramidal geometry around the copper ion is defined in the trigonal plane by the benzimidazole N1

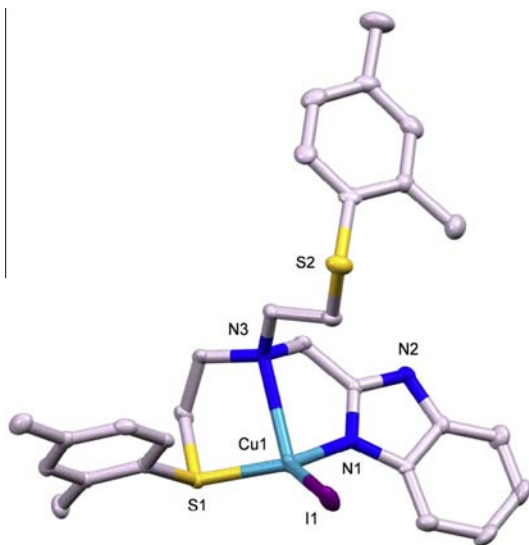


Fig. 1. Mercury diagram of $[\text{L}^1\text{CuI}]$ at the 50% probability level, hydrogen atoms were removed for clarity; color code: C, light gray; N, blue; S, yellow; I, purple; Cu, turquoise. (Color online.)

atom, the arylthioether S2 donor at a typical distance of 2.2318(14) Å [11,12], and a terminal iodo ligand at a Cu1–I1 distance of 2.5383(7) Å. This bond length is in the short end of terminal Cu–I distances, which have been reported in the range of 2.52–2.73 Å [11,13]. Although the long Cu1–N3 distance of 2.593(5) Å to the tertiary amine N3 donor in the apical site can be considered long relative to that in related complexes (2.21–2.41 Å) [11,13b,14], it is not unusual with this type of tripodal ligands, most of which lack a Cu–N(amine) interaction [6]. The angles between the donor atoms and the Cu^+ center on the trigonal plane are close to 120°, as expected. In contrast, the bond angles involving the apical N3 atom deviate considerably from the value of 90° for an idealized trigonal pyramid (Table 2).

In acetonitrile solution, $[\text{L}^1\text{CuI}]$ appears to have a fluxional behavior, based on the broad resonances observed for the arylthioether and benzimidazole groups in its ^1H NMR spectrum (Fig. S5). The low solubility of $[\text{L}^1\text{CuI}]$ in CD_3CN did not allow us to study this phenomenon in detail, but a combination of factors can reasonably account for the observed spectrum: the iodo ligand may dissociate to some extent in the polar solvent, thus favoring the coordination of both thioether groups that results in the equiv-

Table 2
Selected bond lengths (Å) and angles (°).

$[\text{L}^1\text{CuI}]$			
Cu1–I1	2.5383(7)	I1–Cu1–S1	122.59(4)
Cu1–S1	2.2318(14)	I1–Cu1–N1	113.35(12)
Cu1–N1	1.976(4)	I1–Cu1–N3	125.3(1)
Cu1–N3	2.593(5)	S1–Cu1–N1	122.24(13)
		S1–Cu1–N3	82.8(1)
		N1–Cu1–N3	76.2(2)
$[\text{L}^3\text{CuCl}]\text{Cl}$			
Cu–S	2.6881(17)	S–Cu–Cl1	100.60(7)
Cu–Cl1	2.2381(18)	S–Cu–N1	101.80(12)
Cu–N1	1.964(4)	S–Cu–N11	88.66(13)
Cu–N11	1.957(5)	S–Cu–N12	84.73(13)
Cu–N12	2.125(4)	Cl1–Cu–N1	96.90(16)
		Cl1–Cu–N11	98.41(16)
		Cl1–Cu–N12	174.67(14)
		N1–Cu–N11	159.5(2)
		N1–Cu–N12	81.61(19)
		N11–Cu–N12	81.9(2)

alence of their corresponding resonances. Additionally, the NH proton of the benzimidazole group of L^1 may exchange between the two nitrogen atoms, either in an intra- or intermolecular process, by initial rupture of the Cu–N bond; this may account for the very broad aromatic resonances observed at δ 7.29 and 7.63 ppm, and the peak corresponding to the NH proton at 10.69 ppm.

Reactions of L^1 and L^2 with Cu^{2+} sources resulted in most cases in ill-defined mixtures, particularly when weakly coordination anions were employed. For L^1 , a CuCl_2 adduct was previously characterized [5b]. In the case of L^2 , only the reaction with $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ afforded a tractable product formulated as $[\text{L}^2\text{Cu}(\text{OAc})_2]$ based on combustion analysis. UV–Vis and EPR data are consistent with Cu^{2+} ions in an axial coordination environment [one $d-d$ band at 683 nm ($\epsilon = 104 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); $g_{\parallel} = 2.28$ ($A_{\parallel} = 286 \text{ G}$) and $g_{\perp} = 2.07$]. L^3 afforded better results in its reaction with $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, which resulted in the crystalline product $[\text{L}^3\text{CuCl}]\text{Cl}$. X-ray quality crystals of this complex were obtained by slow evaporation of a concentrated ethanolic solution in the trigonal space group $R\bar{3}$. The solid state structure is similar to that determined for the related complex $[\text{L}^4\text{CuCl}]\text{ClO}_4$ [6], with a square pyramidal coordination geometry around the cupric ion (Fig. 2). The base of the pyramid is defined by N1, N11, and N12 from the benzimidazole and tertiary amine donors, as well as one chloro ligand. The Jahn–Teller distorted geometry around Cu^{2+} is complemented by an axial thioether ligand at a Cu–S distance of 2.6881(17) Å; this bond length is shorter than those in related complexes, likely due to the more electron rich nature of the arylthioether, compared to the arylthioether chelating ligands reported by us and others [6,15].

All other metric parameters, including bond angles around the copper center, are comparable to those in the aforementioned cupric complexes (Table 2). In acetonitrile or methanolic solutions, we have previously reported that the presence of the Cu–S(thioether) bond may be determined based on the observation of a $\text{S} \rightarrow \text{Cu}$ ligand to metal charge transfer band (LMCT) [15a,16], which in the case of $[\text{L}^3\text{CuCl}]\text{Cl}$ was measured at 304 nm ($\epsilon = 941 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in its UV–Vis spectrum; additionally, a $d-d$ band at 644 nm ($\epsilon = 116 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) consistent with an axial environment around Cu^{2+} was also observed. The $\text{S} \rightarrow \text{Cu}$ LMCT is blueshifted relative to that reported for $[\text{L}^4\text{CuCl}]\text{ClO}_4$ (411 nm, $\epsilon = 408 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) possibly due to electronic delocalization of the arylthioether donor orbital involved in the transition in L^4 [16].

3.3. Electrochemical studies

Further probing of the electronic properties of the copper complexes was undertaken by electrochemical studies. Cyclic voltammetry of the putative $[\text{L}^n\text{Cu}]\text{OTf}$, generated *in situ* by mixing equimolar amounts of L^n and $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{OTf}$ in acetonitrile afforded the half wave potentials for the $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ couples; the corresponding values for the copper complexes of L^1 and L^4 have

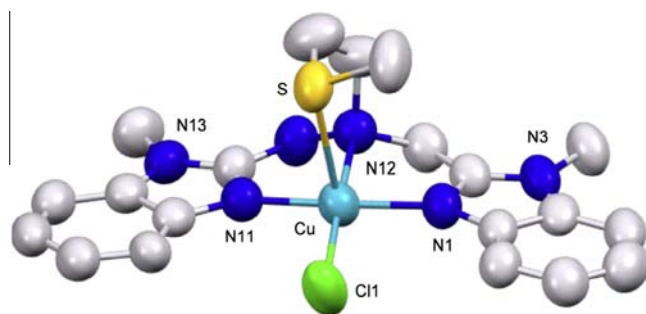


Fig. 2. Mercury diagram of $[\text{L}^3\text{CuCl}]\text{Cl}$ at the 50% probability level, hydrogen atoms, an outer-sphere chloride, and solvent molecules were removed for clarity.

Table 3
Redox data of copper complexes (at 100 mV s⁻¹ scan rate).

Complex	Redox potentials (V vs. Fc ^{+/0} -Fc)			
	<i>E</i> _{ap}	<i>E</i> _{cp}	<i>E</i> _{1/2}	Δ <i>E</i>
[L ¹ Cu]OTf	0.23	0.13	0.18	0.10
[L ² Cu]OTf	0.21	0.70	0.14	0.14
[L ³ Cu]OTf	-0.11	-0.24	-0.18	0.18
[L ⁴ Cu]ClO ₄	-0.06	-0.26	-0.16	0.20

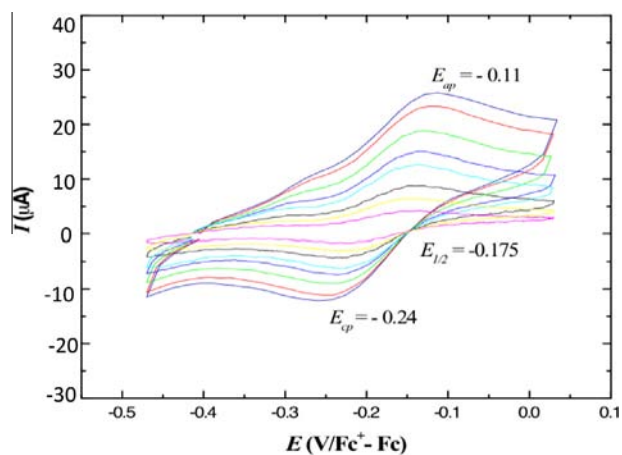


Fig. 3. Representative cyclic voltammograms of 1 mM solutions of complex [L³Cu]OTf obtained with a glassy carbon electrode in 0.1 M Bu₄NPF₆ in acetonitrile at 20, 50, 100, 200, 300, 500, 800 and 1000 mV s⁻¹ scan rates.

previously been informed by our group [5b,6]. The new data obtained for the L² and L³ analogs yield values of *E*_{1/2} = 0.14 and -0.18 V at a scan rate of 100 mV s⁻¹, respectively, see Table 3. The complexes have quasi-reversibly behavior, with slight variations in peak separation at different scan rates as shown in Fig. 3, thus allowing the determination of the anodic, cathodic, and half-wave potentials (*E*_{1/2} relative to the ferricinium–ferrocene [Fc^{+/0}-Fc] couple, see also Fig. S6). These values confirm that the inclusion of nitrogen-based donors in the chelating ligands facilitate oxidation of Cu⁺–Cu²⁺ as reflected in [L³Cu]OTf and [L⁴Cu]OTf; in contrast, the high redox potential determined for [L¹Cu]OTf and [L²Cu]OTf reflect the stabilization of Cu⁺ in a thioether-rich coordination environment. Comparison of the slightly higher *E*_{1/2} value for [L¹Cu]OTf relative to that of [L²Cu]OTf is in line with our previous observations that benzimidazoles with *N*-methyl substituents give rise to lower redox potentials. In the case of the values for the structurally related [L³Cu]OTf and [L⁴Cu]OTf with N₃S donor sets, the more electron-rich methylthioether in [L³Cu]OTf gives rise to a Cu⁺ center that is more easily oxidized than that of the arylthioether in [L⁴Cu]OTf by approximately 20 mV. Regarding their oxidative reactivity, the high redox potentials of the cuprous complexes of L¹ and L² precluded reactions with dioxygen when exposed to air, either in solution or in the solid state. In contrast, colorless acetonitrile or THF solutions of [L³Cu]OTf turn blue within minutes. This behavior towards O₂ is reminiscent of that of the closely related analog [L⁴Cu]ClO₄, which gives rise to superoxide anions in solution and the cupric hydroxo complex [L⁴CuOH]ClO₄ as the final product [6], presumably via a Cu²⁺-superoxo adduct.

4. Conclusions

In summary, N₂S₂ and N₃S ligands L¹–L³ represent a versatile platform for the preparation of cupric and cuprous complexes with

thioether ligation. L¹ and L² with their N₂S₂ donor sets are amenable for studies of the electronic and spectroscopic properties of their Cu⁺ complexes, since the thioether-rich coordination environment provides oxidatively tolerant metal complexes [5,6,11]. The N₃S donor set of L³ resembles the coordination environment present in the active site of PHM, and we are currently studying its reactivity towards relevant substrates.

Acknowledgments

The authors thank Simón Hernández-Ortega for crystallographic work, Rocío Patiño Maya for IR spectroscopic measurements, Carmen Márquez and Luis Velasco for mass spectrometry data, and María de la Paz Orta for combustion analyses; Conacyt (BNSE Beca 254496, proyecto 151837) and DGAPA-PAPIIT (IN210214) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Electronic Supplementary Information (ESI) available: Additional spectroscopic, cyclic voltammetry, and mass spectrometry data. CCDC 9993324 and 999326 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2014.10.022>.

References

- (a) L.A. Finney, T.V. O'Halloran, *Science* 300 (2003) 931;
(b) E.I. Solomon, R.K. Szilagy, S.D. George, L. Basumallick, *Chem. Rev.* 104 (2004) 419;
(c) D.B. Rorabacher, *Chem. Rev.* 104 (2004) 651;
(d) E.A. Lewis, W.B. Tolman, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1047;
(e) S.T. Prigge, B.A. Eipper, R.E. Mains, L.M. Amzel, *Science* 304 (2004) 864;
(f) J.P. Klinman, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3013;
(g) J. Shearer, P. Soh, S. Lentz, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 2103;
(h) A.V. Davis, T.V. O'Halloran, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 148;
(i) S.I. Chan, S.S.-F. Yu, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 969;
(j) R.A. Himes, K.D. Karlin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 119.
- (a) J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.* 115 (2012) 182;
(b) K. Paraskevopoulos, M. Sundarajan, R. Surendran, M.A. Hough, R.R. Eady, I.H. Hillier, S.S. Hasnain, *Dalton Trans.* (2006) 3067;
(c) R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2239.
- (a) S.T. Prigge, A.S. Kolkehar, B.A. Eipper, R.E. Mains, L.M. Amzel, *Science* 278 (1997) 1300;
(b) S.T. Prigge, R.E. Mains, B.A. Eipper, L.M. Amzel, *Cell. Mol. Life Sci.* 27 (2000) 1236;
(c) S.I. Chan, V.C.-C. Wang, J.C.-H. Lai, S.S.-F. Yu, P.P.-Y. Chen, K.H.-C. Chen, C.-L. Chen, M.K. Chan, *Angew. Chem., Int. Ed.* 46 (2007) 1992.
- (a) T. Osako, Y. Ueno, Y. Tachi, S. Itoh, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 6516;
(b) R.C. Pratt, L.M. Mirica, T.D.P. Stack, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 8030;
(c) C. Belle, W. Rammal, J.-L. Pierre, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1929;
(d) N.W. Aboelella, B.F. Gherman, L.M.R. Hill, J.T. York, N. Holm, V.G. Young Jr., C.J. Cramer, W.B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3445;
(e) L.Q. Hatcher, D.-H. Lee, M.A. Vance, A.E. Milligan, R. Sarangi, K.O. Hodgson, B. Hedman, E.I. Solomon, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 10055;
(f) L. Zhou, K.M. Nicholas, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 4356;
(g) G.Y. Park, Y. Lee, D.-H. Lee, J.S. Woertink, A.A. Narducci Sarjeant, E.I. Solomon, K.D. Karlin, *Chem. Commun.* (2010) 91.
- (a) R. Huerta, A. Flores-Figueroa, V.M. Ugalde-Saldívar, I. Castillo, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 9510;
(b) P.R. Martínez-Alanis, B.N. Sánchez Eguía, V.M. Ugalde-Saldívar, I. Regla, P. Demare, G. Aullón, I. Castillo, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 6067.
- I. Castillo, V.M. Ugalde-Saldívar, L.A. Rodríguez Solano, B.N. Sánchez Eguía, E. Zeglio, E. Nordlander, *Dalton Trans.* 41 (2012) 9394.
- Bruker AXS, SAINT Software reference manual v. 6.23C, Madison, Wisconsin, USA, 2002.
- CRYSTALIS CCD and CRYSTALIS R, Oxford Diffraction, Abingdon, UK, 2009.
- G.M. Sheldrick, SHELXS-97, Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Germany, 1990.
- G.M. Sheldrick, SHELXL-97, Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.

- [11] P.R. Martínez-Alanis, V.M. Ugalde-Saldívar, I. Castillo, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2011) 212.
- [12] (a) B. Norén, Å. Oskarsson, *Acta Chem. Scan. A* 41 (1987) 12;
(b) J. Ramos, V.M. Yartsev, S. Golhen, L. Ouahab, P. Delhaes, *J. Mater. Chem.* 7 (1997) 1313;
(c) H.W. Yim, D. Rabinovich, K.-C. Lam, J.A. Golen, A.L. Rheingold, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* E59 (2003) m556;
(d) M. Heller, W.S. Sheldrick, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 630 (2004) 1869;
(e) W. Lu, Z.-M. Yan, J. Dai, Y. Zhang, Q.-Y. Zhu, D.-X. Jia, W.-J. Guo, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 2339;
(f) T.H. Kim, Y.W. Shin, S.S. Lee, J. Kim, *Inorg. Chem. Commun.* 10 (2007) 11;
(g) T.H. Kim, Y.W. Shin, J.H. Jung, J.S. Kim, J. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (2008) 685;
(h) M. Jo, J. Seo, M.L. Seo, K.S. Choi, S.K. Cha, L.F. Lindoy, S.S. Lee, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 8186.
- [13] (a) Recent examples: O. Evngelinou, A.G. Hatzidimitriou, E. Velali, A.A. Pantazaki, N. Voulgarakis, P. Aslanidis, *Polyhedron* 72 (2014) 122;
(b) A. Covaci, R. Mitea, I. Hosu, A. Silvestru, *Polyhedron* 72 (2014) 157;
(c) Q.-M. Qiu, M. Liu, Z.-F. Li, Q.-H. Jin, X. Huang, Z.-W. Zhang, C.-L. Zhang, Q.-X. Meng, *J. Mol. Struct.* 1062 (2014) 125;
(d) W.-X. Zhou, B. Yin, J. Li, W.-J. Sun, F.-X. Zhang, *Inorg. Chim. Acta* 408 (2013) 209.
- [14] (a) Examples: Y. Shimazaki, T. Nogami, F. Tani, A. Odani, O. Yamauchi, *Angew. Chem., Int. Ed.* 40 (2001) 3859;
(b) H.J. Kim, Y. Jin, J. Seo, J.-E. Lee, J.Y. Lee, S.S. Lee, *Inorg. Chem. Commun.* 9 (2006) 1040;
(c) R.D. Kohn, L.T. Laudo, Z. Pan, F. Speiser, G. Kociok-Kohn, *Dalton Trans.* (2009) 4556.
- [15] (a) M. Koderá, T. Kita, I. Miura, N. Nakayama, T. Kawata, K. Kano, S. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 7715;
(b) D.-H. Lee, L.Q. Hatcher, M.A. Vance, R. Sarangi, A.E. Milligan, A.A. Narducci Sarjeant, C.D. Incarvito, A.L. Rheingold, K.O. Hodgson, B. Hedman, E.I. Solomon, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 6056;
(c) Y. Lee, D.-H. Lee, G.Y. Park, H.R. Lucas, A.A. Narducci Sarjeant, M.T. Kieber-Emmons, M.A. Vance, A.E. Milligan, E.I. Solomon, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* 49 (2010) 8873.
- [16] L.A. Rodríguez-Solano, I. Aguiñiga, M. López Ortiz, R. Tiburcio, A. Luviano, I. Regla, E. Santiago-Osorio, V.M. Ugalde-Saldívar, R.A. Toscano, I. Castillo, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2011) 3454.



Cite this: *Chem. Commun.*, 2015, 51, 11134

Received 19th March 2015,
Accepted 28th May 2015

DOI: 10.1039/c5cc02332g

www.rsc.org/chemcomm

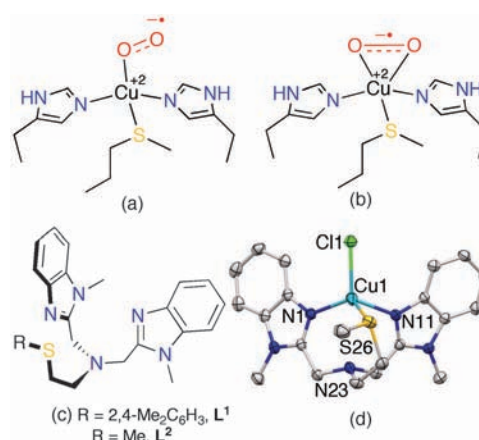
Side-on cupric–superoxo triplet complexes as competent agents for H-abstraction relevant to the active site of PHM†

B. N. Sánchez-Eguía,^a M. Flores-Alamo,^b M. Orio^{cd} and I. Castillo^{a*}

Copper complexes with N₃S donors mimic the Cu_M site of copper monooxygenases and react with O₂ affording side-on cupric–superoxo complexes capable of H-abstraction from dihydroanthracene and THF. Spectroscopic and DFT data of the Cu–superoxos support a spin triplet ground state for the side-on complexes, as well as a hemilabile thioether.

Dioxygen activation by earth-abundant copper in chemical and biochemical systems is an intense area of research due to its relevance in the functionalisation of a wide range of substrates:¹ understanding the intimate details of O₂ activation at copper centres may lead to the efficient use of dioxygen in selective oxidative transformations. In copper enzymes, the readily accessible Cu²⁺/Cu⁺ redox couple is involved in the selective oxidation of hydrocarbons,^{1d} including the hydroxylation of methane.² Intriguingly, some of the active sites of copper monooxygenases that activate strong aliphatic C–H bonds³ feature methionine-derived sulfur donors in addition to the ubiquitous imidazole donors from histidine residues (His₂Met). These thioether donors present in the Cu_M sites of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (PHM), dopamine β -monooxygenase (D β M), and tyramine β -monooxygenase (T β M)⁴ appear to modulate the redox potential of the Cu²⁺/Cu⁺ couple. Nonetheless, a detailed understanding of the electronic influence of thioethers to selectively hydroxylate unactivated C–H bonds remains elusive. An additional question that arises in these systems is the inertness of the thioether moiety towards oxidation during catalytic turnover conditions that could potentially result in the corresponding sulfoxide or sulfone.

The formation of a precatalytic end-on cupric superoxo complex [Cu_M²⁺– η^1 -O₂^{•-}] has been established by X-ray crystallography (Scheme 1a),^{3a} although side-on η^2 -O₂-bound complexes have also been evaluated as viable intermediates responsible for C–H activation (Scheme 1b).⁵ Model complexes have been designed based on the His₂Met active sites of Cu–monooxygenases to gain insight into the properties of [Cu–O₂] adducts, particularly cupric superoxos. Efforts have been focused on tripodal ligands with tetradentate N₃S donor sets,⁶ including a recent report on a pyridine-supported, thioether-containing [Cu²⁺– η^1 -O₂^{•-}] complex.^{6d} Benzimidazole-based N₃S–copper complexes mimic specific aspects of monooxygenase enzymes: oxygenation of [L¹Cu]ClO₄ resulted in electrocatalytic O₂^{•-} formation, presumably *via* a putative Cu²⁺–superoxo.⁷ This reactivity is related to the strong σ -donor properties of benzimidazoles, which place them as closer analogues of histidine than pyridine and amine derivatives, based on the pK_a and K_{ass}



Scheme 1 (a) Precatalytic end-on Cu–superoxo [Cu²⁺– η^1 -O₂^{•-}] in PHM; (b) the side-on Cu–superoxo [Cu²⁺– η^2 -O₂^{•-}] analogue; (c) ligands employed; (d) mercury diagram of L²CuCl at the 50% probability level; H-atoms omitted for clarity. Selected bond distances (Å): Cu1–N1 2.053(2), Cu1–N11 2.027(2), Cu1–S26 2.691(1), Cu1–Cl1 2.350(1); angles (°): N1–Cu1–N11 116.35(7), N1–Cu1–S26 123.65(5), N11–Cu1–S26 86.86(5), N1–Cu1–Cl1 112.47(5), N11–Cu1–Cl1 114.36(5), S26–Cu1–Cl1 100.29(2).

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, CU, México DF, 04510, Mexico. E-mail: joseivan@unam.mx

^b Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, México DF, 04510, Mexico

^c Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR CNRS 8516, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^d Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, ISM2 UMR 7313, 13397, Marseille, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Full experimental, crystallographic, and computational details. CCDC 999325, 1036422, 1036423 and 1053447. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c5cc02332g

with Cu^{2+} .^{7a,8} To further establish the capability of benzimidazole-based platforms to emulate histidine donors in copper monooxygenases, we herein report a detailed study of the reactivity of O_2 with $[\text{L}^1\text{Cu}]^+$ and the related $[\text{L}^2\text{Cu}]^+$, featuring a methylthioether group to more closely approach the methionine donor in PHM (L^1 , L^2 : $[\text{N-Me-2-CH}_2(\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2)]_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SR}$, Scheme 1c).

Comparison of the coordination environment provided by L^2 with the His_2Met donor set in PHM was allowed by the solid-state structure of L^2CuCl (and its Cu^{2+} analogue, Fig. S2 in the ESI†). The complexes were obtained from the reaction of equimolar amounts of L^2 and the appropriate copper salt. The Cu^+ centre in L^2CuCl is in a distorted tetrahedral environment defined by benzimidazole N, thioether S, and Cl atoms, with the tertiary amine at a non-bonding distance of 2.819(2) Å (Scheme 1d). The average Cu–N bond length of 2.04 and the Cu–S distance of 2.691(1) Å are comparable to the corresponding Cu–N and Cu–S distances of 2.03 and 2.68 Å in PHM.⁹ Both L^1 and L^2 give rise to thioether-bridged Cu^+ dimers in the solid state when non-coordinating counterions are employed ($[\text{L}^n\text{Cu}]_2\text{X}_2$, $\text{X}^- = \text{ClO}_4^-$,^{7a} CF_3SO_3^- (OTf^-); Cu··Cu distances 5.407(1) and 5.055(2) Å, Fig. S3 in the ESI†).

$[\text{L}^n\text{Cu}]_2\text{OTf}_2$ are nonetheless monomeric in THF solution, as corroborated by ^1H NMR spectroscopy: both complexes give rise to a single set of relatively sharp resonances for the equivalent benzimidazole groups in THF- d_8 , even at -40°C (Fig. S5, ESI†), consistent with monomeric $[\text{L}^n\text{Cu}]^+$ formulations. The presence of aggregates would likely result in more than the two multiplets observed for the $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ linkers between δ 3.3 and 3.5 ppm.^{10d} Furthermore, DOSY NMR confirmed the monomeric nature of the complexes (Fig. S6, ESI†).

Bubbling O_2 into THF solutions of $[\text{L}^n\text{Cu}]^+$ at -80°C resulted in ESR-silent species after 15 min, with very similar optical features for both L^1 and L^2 -complexes that are stable for at least 2 h (L^1 : $\lambda = 336, 614$ nm, $\epsilon \sim 1500, 285$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; L^2 : $\lambda = 339, 609$ nm, $\epsilon \sim 2300, 119$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Fig. 1 and Fig. S12, ESI†). High energy charge transfer bands have been associated to dimeric side-on bridging peroxo complexes $[\text{Cu}^{2+}_2-\mu-\eta^2:\eta^2-\text{O}_2]$

with extinction coefficients $> 20\,000$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.^{11,12} Although incomplete oxygenation could account for the low apparent ϵ values, addition of chelating anions such as PhCO_2^- or CH_3SO_3^- that favour the formation of side-on peroxo dimers did not have an effect on O_2 -saturated solutions of $[\text{L}^n\text{Cu}]^+$ (Fig. S15 and S16, ESI†).^{13,14} A better fit of the observed optical features corresponds to side-on cupric-superoxo species $[\text{Cu}^{2+}-\eta^2-\text{O}_2^{\bullet-}]$ that lack thioether bonding, similar to those reported by Tolman and coworkers (see DFT studies below).¹⁰ Confirmation of the proposed mononuclear $[\text{L}^n\text{Cu}^{2+}-\eta^2-\text{O}_2^{\bullet-}]$ formulations by resonance Raman spectroscopy was likely precluded by the photosensitivity of frozen solutions (liquid N_2 , λ_{ex} 335 nm) at -125 or -80°C in 2-MeTHF or THF, respectively. Nonetheless, the reaction of $[\text{L}^1\text{Cu}]\text{OTf}$ with O_2 in THF- d_8 at -80°C was monitored by ^1H NMR spectroscopy ($[\text{L}^2\text{Cu}]\text{OTf}$ is considerably less soluble at this temperature). The spectrum in Fig. S12 (ESI†) reveals a single set of paramagnetically broadened signals reminiscent of the ESR-silent $[\text{Cu}(\text{HIPT}_3\text{tren})\text{O}_2]^+$ reported by the group of Itoh,¹⁵ and assigned as a spin triplet by Karlin, Solomon, and coworkers.¹⁶ Signal broadening by thioether-bridged dimer formation appears to be restricted to Cu^+ complexes.^{10d}

To gain insight into the bonding and electronic properties of $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$, DFT studies were carried out using the ORCA software package.¹⁷ Di- and monocopper species, with and without S-bonding (N_3S vs. N_3 donor sets), were considered in both singlet and triplet states. Experimental data were confronted with theoretical calculations by comparing UV-vis spectra with TD-DFT results. Geometry optimisation of side-on bridging peroxos $[\text{Cu}^{2+}_2-\mu-\eta^2:\eta^2-\text{O}_2]$ resulted in S-uncoordinated (N_3) singlet species that gave rise to UV-vis spectra drastically different from the experimental ones (Fig. S17 and S18, ESI†), with very intense bands predicted at ca. 410 and 550 nm for L^1 , and 370 and 450 nm for L^2 complexes, respectively (Fig. S19 and S20, ESI†). Optimisation of monomeric thioether-bonded complexes (N_3S) resulted in triplet end-on cupric-superoxos (Fig. S21 and S22), the singlets being higher in energy by 17 kJ mol^{-1} as expected.¹⁶ The TD-DFT calculated data for the triplet end-on $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ species differ considerably from the experimental UV-vis spectra, with absorbances at ca. 400 and 550 nm for $[\text{L}^1\text{CuO}_2]^+$, and 475 nm for $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ (Fig. S23, ESI†). Monomeric complexes with uncoordinated thioethers result in side-on structures that were analysed as singlets and triplets (Fig. 1 and Fig. S24 and S25). A better match of electronic spectra is obtained for the triplet states with respect to the experimental ones, with a strong band predicted around 340 nm, and a $d-d$ band at ca. 740 nm (Fig. 1, red trace, and Fig. S26, ESI†); in contrast, the calculated UV-vis spectra of the singlets predict intense transitions around 300 nm (Fig. 1, blue trace). For $[\text{L}^1\text{CuO}_2]^+$ an exchange coupling constant $J = +250$ cm^{-1} (spatial overlap $S = 0.568$) was obtained from BS-DFT calculations (Fig. S29, ESI†). This value shows that the two unpaired electrons of the complex are strongly ferromagnetically coupled, consistent with a triplet ground spin state that is stabilised by 6.0 kJ mol^{-1} with respect to the singlet. Similar results were obtained for $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ with a calculated exchange coupling constant of $+237$ cm^{-1} (spatial overlap $S = 0.570$) consistent with a strong ferromagnetic interaction. The triplet is also the favoured ground spin state by 5.7 kJ mol^{-1} (Fig. S30 and Table S4, ESI†).

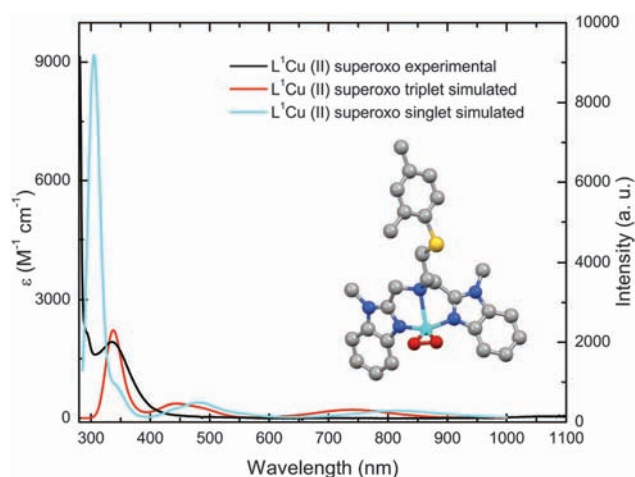


Fig. 1 Experimental UV-vis spectrum of $[\text{L}^1\text{Cu}]^+$ after bubbling O_2 in THF at -80°C (intensity in ϵ), and simulated spectra for triplet and singlet S-uncoordinated side-on optimised $[\text{L}^1\text{Cu}-\eta^2-\text{O}_2]^+$ (intensity in a.u.). Inset: optimised structure of the triplet.

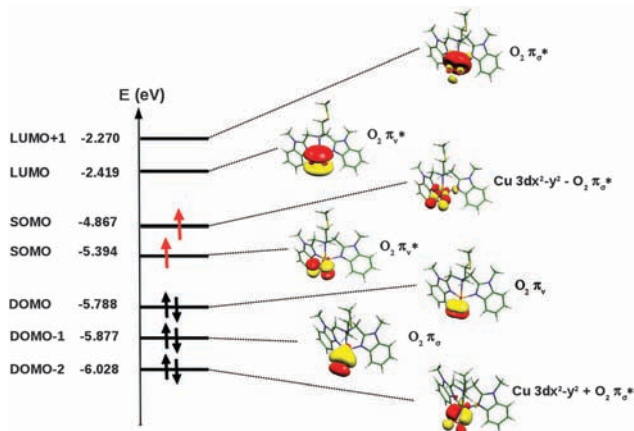


Fig. 2 Molecular orbital diagram of triplet side-on superoxo $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ with uncoordinated methylthioether.

For both side-on $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ complexes a ferromagnetic interaction is expected from an MO analysis due to the orthogonality of the two magnetic orbitals depicted in Fig. S31 and S32 (ESI[†]). The first one is an almost pure superoxide-centred π_v^* orbital perpendicular to the Cu–OO plane, while the second one corresponds to the antibonding interaction between the Cu $d_{x^2-y^2}$ and the π_o^* orbitals (Fig. 2 and Fig. S33 and S34). Although side-on coordination of the superoxide anion to the Cu^{2+} centres has been associated with singlet ground states,¹⁶ it is noteworthy in the case of $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ that the long, calculated Cu–O distances of 1.97 Å imply a relatively weak bond (experimental av. Cu–O distance for side-on cupric-superoxo complexes 1.84 Å).^{10,18} Consequently, the bonding–antibonding interaction between the Cu $d_{x^2-y^2}$ orbitals and the superoxo π_o^* orbitals in $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ is weaker than the spin-pairing energy (likely intermediate in magnitude between canonical side-on and end-on Cu–O₂ interactions previously described),¹⁶ resulting in a triplet ground state. The geometry around the Cu^{2+} centres is square pyramidal, with the O and N-atoms from benzimidazole donors in the basal positions (Cu–N average distance 1.96 Å), and the tertiary amine in the apical positions at a considerably longer distance (2.38 Å), defining N₃ donor sets from L^n (calculated Cu···S distances 5.86 and 5.83 Å, respectively). The weak Cu–O interactions predicted for $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ may be ascribed to the strongly σ -donating benzimidazoles, consistent with the Natural Bond Order (NBO) analysis. The calculated Wiberg index for the Cu–N bonds is indeed larger (0.83) than that for the Cu–O bonds (0.73).¹⁹ As a consequence, the superoxo moieties in the optimised square pyramidal triplet complexes bear a considerable amount of spin density, which may predispose them to H-abstraction.

In this context, attempts to isolate $[\text{L}^n\text{CuO}_2]\text{OTf}$ from reactions of $[\text{L}^n\text{Cu}]\text{OTf}$ and O₂ in THF at –78 °C resulted in the commonly observed bridging hydroxo complexes, evidencing solvent C–H activation by the triplet side-on superoxos. Blue crystals of $[\text{L}^1\text{Cu}(\mu\text{-OH})_2]\text{OTf}_2$ were obtained after a week, with symmetry-related Cu^{2+} centres in square pyramidal N₃O₂ coordination environments (Cu···S distance 6.01 Å, Fig. 3).

The dimers are insoluble in THF at –80 °C, with the solid-state UV-vis spectra distinct from those of $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$, lacking the intense absorption at ~340 nm (Fig. S42, ESI[†]). H-abstraction from THF by $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ was confirmed by UV-vis spectroscopy at –40 °C ($k = 1.78 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $t_{1/2} = 3894 \text{ s}$, Fig. S44 and S45, ESI[†]). The capability for C–H activation was further evaluated using 9,10-dihydroanthracene (DHA) as a H-donor. The intensity of the charge transfer band at ~340 nm diminished over an hour with pseudo first-order behaviour upon addition of a 10-fold molar excess (3 mM solution of DHA in THF) to 0.3 mM solutions of $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ at –60 °C (for L^2 , $k = 0.002 \text{ s}^{-1}$; $t_{1/2} = 315 \text{ s}$, Fig. S45 and S46, ESI[†]). Dilution of the samples with 3 mL of CH₂Cl₂, followed by quenching with 0.5 M aqueous Na₂EDTA, evidenced the presence of anthracene and anthraquinone as oxidation products. In the case of $[\text{L}^1\text{CuO}_2]^+$ the products were obtained in a 1:1 ratio. Significantly, $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ is more selective for H-abstraction without further oxidation, affording the products in a 7:3 ratio (by GC-MS, Fig. 3 and Fig. S48 and S49, ESI[†]). Similar H-abstraction and further oxidation of DHA has been observed with $[\text{Cu}_2^{2+}\text{-}\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-O}_2]$ and $[\text{Cu}_2^{3+}(\mu\text{-O})_2]$ species, albeit with longer reaction times,^{11b} predominant formation of anthraquinone,²⁰ or the requirement for a larger excess of DHA.²¹ Among cupric-superoxo complexes, singlet side-on species do not react with C–H bonds.^{10,18} Triplet end-on superoxos perform H-abstraction, provided that the Cu^{2+} centres are in a tetragonal environment,^{6d,22} trigonal bipyramidal (TBP) complexes being less reactive.²³ This behaviour parallels the reactivity of tetragonal cupric-hydroperoxo complexes that activate C–H bonds,²⁴ compared to their relatively unreactive TBP counterparts.²⁵ Within this context, triplet side-on complexes $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ fulfill the requirements for enhanced H-abstraction ability: tetragonal geometry and a triplet ground state.

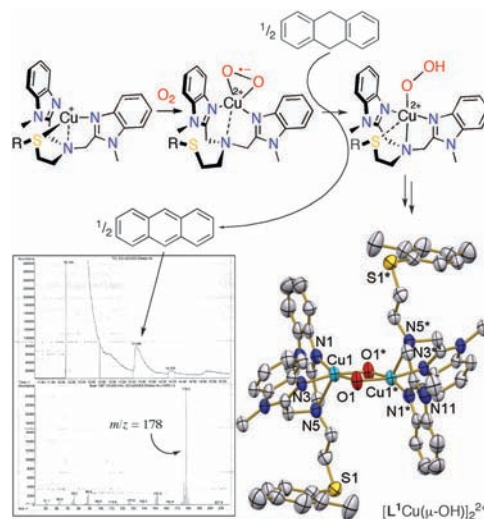


Fig. 3 Proposed reaction of $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ with DHA affording the final products anthracene and $[\text{L}^n\text{Cu}(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$; Mercury diagram of $[\text{L}^1\text{Cu}(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$ at the 50% probability level. Selected bond distances (Å): Cu1–O1 1.913(2), Cu1–O1* 1.917(3), Cu1–N1 2.006(3), Cu1–N3 1.985(2), Cu1–N5 2.460(3); angles (°): N1–Cu1–N3 96.9(1), N1–Cu1–N5 75.3(1), N3–Cu1–N5 77.0(1), N1–Cu1–O1 162.3(1), N3–Cu1–O1 93.3(1), N1–Cu1–O1* 92.3(1), N3–Cu1–O1* 168.5(1); inset: the GC-MS trace of organic products with anthracene at $m/z = 178$.

Since charge-transfer bands have been described for Cu^{2+} -hydroperoxo complexes around 360 nm,^{6a,24,25a} which may form by rapid H-abstraction from solvent, we ruled out such $[\text{L}^n\text{Cu}-\text{OOH}]^+$ species as the observed oxygenation products of $[\text{L}^n\text{Cu}]^+$. Cu^{2+} -hydroperoxides were prepared by addition of 5–10 equiv. of 1:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Et}_3\text{N}$ THF solutions to the appropriate $[\text{L}^n\text{Cu}]^{2+}$ sources. In addition to being relatively stable at room temperature and ESR-active, the electronic spectra are distinct from those of $[\text{L}^n\text{CuO}_2]^+$ (Fig. S35–S42, ESI[†]), with shoulders around 330 and 310 nm potentially due to $\text{S} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ charge-transfer bands of thioether-bound cupric-hydroperoxos.^{6a,7} Addition of DHA to solutions of $[\text{L}^n\text{Cu}-\text{OOH}]^+$ at 20–40 °C resulted in only trace amounts of oxidation products (Fig. S50 and S51, ESI[†]), excluding them as efficient H-abstraction agents.

In summary, benzimidazole-based N_3S ligands support side-on cupric-superoxo complexes as ground state triplets, in contrast to the prevalent view of side-on superoxos as singlets exclusively. The long Cu–O bonds opposite to the strong Cu–N σ -bonds in square pyramidal $[\text{L}^n\text{Cu}-\eta^2\text{-O}_2]^+$ arise from the small overlap between the Cu $d_{x^2-y^2}$ and the $\text{O}_2 \pi_g^*$ orbitals, giving rise to the triplet ground states. Despite being strong σ -donors, benzimidazoles give rise to copper complexes that are more electrophilic than their pyridine-based analogues ($E_{1/2} \sim -170$ mV vs. Fc^+/Fc for $[\text{L}^n\text{Cu}]^{+/2+7c}$, compared to -470 mV for pyridine-based N_3S systems).^{6d} This may arise from stabilisation of Cu^+ complexes by a low-lying LUMO,^{7a} setting benzimidazoles apart from related nitrogen donors, and enhancing H-abstraction. The methylthioether in $[\text{L}^2\text{CuO}_2]^+$ directs H-abstraction from DHA without further oxidation, placing it as a close analogue of the Cu_M site of PHM. In this context, the thioethers are weak donors, and may even act as hemilabile ligands. Their role in triplet side-on superoxo complexes in related chemical and biochemical systems awaits further evaluation.

We thank Prof. E. I. Solomon, J. W. Ginsbach for rR; Prof. J. J. García for GC-MS; S. Hernández-Ortega for crystallography, V. Gómez-Vidales for ESR, R. Patiño for IR, M. Orta for EA, B. Quiroz, R. Gaviño for DOSY and VT-NMR, L. Ríos for ESI-MS. Funding by Conacyt (151837, 254496), PAPIIT (IN210214), IANAS.

Notes and references

- (a) L. M. Mirica, X. Ottenwaelder and T. D. P. Stack, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 1013; (b) E. A. Lewis and W. B. Tolman, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 1047; (c) R. A. Himes and K. D. Karlin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, **13**, 119; (d) E. I. Solomon, D. E. Heppner, E. M. Johnston, J. W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M. T. Kieber-Emmons, C. H. Kjaergaard, R. G. Hadt and L. Tian, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 3659.
- R. L. Lieberman and A. C. Rosenzweig, *Nature*, 2005, **434**, 177.
- (a) S. T. Prigge, B. A. Eipper, R. E. Mains and L. M. Amzel, *Science*, 2004, **304**, 864; (b) J. P. Klinman, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 3013.
- M. Monastirioti, C. E. Linn, Jr. and K. White, *J. Neurosci.*, 1996, **16**, 3900.
- (a) P. Chen and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4991; (b) P. Chen and E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 13105.
- (a) M. Kodera, T. Kita, I. Miura, N. Nakayama, T. Kawata, K. Kano and S. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 7715; (b) L. Q. Hatcher, D.-H. Lee, M. A. Vance, A. E. Milligan, R. Sarangi, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 10055; (c) D.-H. Lee, L. Q. Hatcher, M. A. Vance, R. Sarangi, A. E. Milligan, A. A. Narducci Sarjeant, C. D. Incarvito, A. L. Rheingold, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 6056; (d) S. Kim, J. Y. Lee, R. E. Cowley, J. W. Ginsbach, M. A. Siegler, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 2796.
- (a) I. Castillo, V. M. Ugalde-Saldívar, L. A. Rodríguez Solano, B. N. Sánchez Eguía, E. Zeglio and E. Nordlander, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 9394; (b) P. R. Martínez-Alanis, B. N. Sánchez Eguía, V. M. Ugalde-Saldívar, I. Regla, P. Demare, G. Aullón and I. Castillo, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 6067; (c) I. Castillo, B. N. Sánchez-Eguía, P. R. Martínez-Alanis, V. M. Ugalde-Saldívar and M. Flores-Alamo, *Polyhedron*, 2015, **85**, 824.
- B. Ülküseven, I. Kizilcikli, A. Tavman and B. Akkurt, *Rev. Inorg. Chem.*, 2001, **21**, 369.
- S. T. Prigge, A. S. Kolhekar, B. A. Eipper, R. E. Mains and L. M. Amzel, *Science*, 1997, **278**, 1300.
- (a) D. J. E. Spencer, N. W. Aboeella, A. M. Reynolds, P. L. Holland and W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 2108; (b) N. W. Aboeella, E. A. Lewis, A. M. Reynolds, W. W. Brennessel, C. J. Cramer and W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 10660; (c) N. W. Aboeella, S. V. Kryatov, B. F. Gherman, W. W. Brennessel, V. G. Young, Jr., R. Sarangi, E. V. Rybak-Akimova, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, C. J. Cramer and W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 16896; (d) N. W. Aboeella, B. F. Gherman, L. M. R. Hill, J. T. York, N. Holm, V. G. Young, Jr., C. J. Cramer and W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3445.
- (a) M. J. Baldwin, D. E. Root, J. E. Pate, K. Fujisawa, N. Kitajima and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10421; (b) H. V. Obias, Y. Lin, N. N. Murthy, E. Pidcock, E. I. Solomon, M. Ralle, N. J. Blackburn, Y.-M. Neuhold, A. D. Zuberbühler and K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 12960; (c) E. Pidcock, H. V. Obias, M. Abe, H.-C. Liang, K. D. Karlin and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1299.
- (a) L. Santagostini, M. Gullotti, E. Monzani, L. Casella, R. Dillinger and F. Tucek, *Chem. – Eur. J.*, 2000, **6**, 519; (b) G. Battaini, M. De Carolis, E. Monzani, F. Tucek and L. Casella, *Chem. Commun.*, 2003, 726.
- X. Ottenwaelder, D. J. Rudd, M. C. Corbett, K. O. Hodgson, B. Hedman and T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9268.
- Y. Funahashi, T. Nishikawa, Y. Wasada-Tsutsui, Y. Kajita, S. Yamaguchi, H. Arai, T. Ozawa, K. Jitsukawa, T. Tosha, S. Hirota, T. Kitagawa and H. Masuda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16444.
- Y. Kobayashi, K. Ohkubo, T. Nomura, M. Kubo, N. Fujieda, H. Sugimoto, S. Fukuzumi, K. Goto, T. Ogura and S. Itoh, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, 4574.
- J. W. Ginsbach, R. L. Peterson, R. E. Cowley, K. D. Karlin and E. I. Solomon, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 12872.
- F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**, 73.
- (a) K. Fujisawa, M. Tanaka, Y. Moro-oka and N. Kitajima, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 12079; (b) P. Chen, D. E. Root, C. Campochario, K. Fujisawa and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 466.
- (a) A. E. Reed, L. A. Curtiss and F. Weinhold, *Chem. Rev.*, 1988, **88**, 899; (b) K. B. Wiberg, *Tetrahedron*, 1968, **24**, 1083.
- D. Maiti, J. S. Woertink, A. A. Narducci Sarjeant, E. I. Solomon and K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 3787.
- C. Citek, B.-L. Lin, T. E. Phelps, E. C. Wasinger and T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 14405.
- (a) A. Kunishita, M. Kubo, H. Sugimoto, T. Ogura, K. Sato, T. Takui and S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 2788; (b) R. L. Peterson, R. A. Himes, H. Kotani, T. Suenobu, L. Tian, M. A. Siegler, E. I. Solomon, S. Fukuzumi and K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 1702.
- D. Maiti, D.-H. Lee, K. Gaoutchenova, C. Würtele, M. C. Holthausen, A. A. Narducci Sarjeant, J. Sundermeyer, S. Schindler and K. D. Karlin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 82.
- T. Fujii, A. Naito, S. Yamaguchi, A. Wada, Y. Funahashi, K. Jitsukawa, S. Nagatomo, T. Kitagawa and H. Masuda, *Chem. Commun.*, 2003, 2700.
- (a) A. Wada, M. Harata, K. Hasegawa, K. Jitsukawa, H. Masuda, M. Mukai, T. Kitagawa and H. Einaga, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 798; (b) Y. J. Choi, K.-B. Cho, M. Kubo, T. Ogura, K. D. Karlin, J. Cho and W. Nam, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 2234.



Structural and functional effects of benzimidazole/thioether–copper complexes with antitumor activity on cell membranes and molecular models



Ivan Castillo ^{a,*}, Mario Suwalsky ^b, María José Gallardo ^c, Valentina Troncoso ^d, Brenda N. Sánchez-Eguía ^a, Edelmiro Santiago-Osorio ^e, Itzen Aguiñiga ^e, Ana K. González-Ugarte ^e

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D. F. 04510, Mexico

^b Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción, Chile

^c Center for Optics and Photonics, University of Concepción, Chile

^d Center of Biotechnology, University of Concepción, Chile

^e Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla del 5 de Mayo y Fuerte de Loreto, México, D. F. 09230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2015

Received in revised form 24 November 2015

Accepted 28 December 2015

Available online 30 December 2015

Keywords:

Cu complexes

Benzimidazoles

Cytotoxicity

Cell membrane

Human erythrocyte

ABSTRACT

Two cytotoxic copper(II) complexes with N–H and N-methylated benzimidazole-derived ligands (Cu-L² and Cu-L^{2Me}) were synthesized and made to interact with human erythrocytes and molecular models of their plasmatic membranes. The latter consisted in lipid bilayers of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE), lipids of the types present in the outer and inner monolayers of the human erythrocyte membrane, respectively. Initial assessment of the interaction of the complexes with DMPC and DMPE consisted of X-ray diffraction studies, which showed preferential interactions with the former. Scanning electron microscopy (SEM) of erythrocytes incubated with solutions of the Cu(II) complexes evidenced deformation of the cells to stomatocytes and knizocytes by Cu-L² and Cu-L^{2Me} due to interactions with the inner and outer leaflets of the cell membranes, respectively. This was further confirmed by real-time observation of the dose-dependent effects of the complexes on live erythrocytes by defocusing microscopy (DM). The combined observations, including the increased antiproliferative activity of the N-methylated complex Cu-L^{2Me} over that of Cu-L² is rationalized based on the higher lipophilicity of the former. This property would facilitate passive diffusion of Cu-L^{2Me} through the cell membrane, particularly in the initial stages when the DMPC-rich outer leaflet is involved. In contrast, the benzimidazole N–H groups of Cu-L² may participate in hydrogen bonding with DMPE polar groups; this result is consistent with the formation of stomatocyte induced by the latter complex.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Arresting the cell cycle with small organic molecules has been one of the main strategies for cancer therapy, with DNA as the main target biomolecule [1]. Among organic compounds, benzimidazoles are known to possess antitumor activity [2,3], in some cases displaying DNA binding capabilities. The search for novel therapeutic agents with properties not accessible to organic compounds (geometries, redox states, reactivity) led to the development of inorganic antitumor agents, with cisplatin as the most representative example [4]. This inorganic chemotherapeutic agent kills cancer cells by cross-linking DNA and inhibiting transcription, and its introduction improved the survival outlook of many patients. Despite its success, the high toxicity of cisplatin, the intrinsic

resistance in certain cancers, and the developed resistance in prolonged treatments, highlight the need for novel inorganic chemotherapeutic agents. Among transition metals, copper has become an appealing candidate to replace platinum drugs such as cisplatin based on its role in biological systems as an essential element [5,6], which could render it less toxic. The antitumor activity of copper complexes is well documented [7], and has encouraged the design of systems that may benefit from a synergistic effect by incorporating organic ligands with antiproliferative properties of their own [8,9], such as benzimidazoles. Despite the numerous cytotoxic copper complexes reported to date, the mechanisms underlying the antiproliferative activity of copper complexes reported to date are not fully established. Initial hypotheses considered analogies between Cu and Pt to propose DNA binding, intercalation, and cleavage activity. However, recent evidence of proteasome inhibition [10], oxidative damage by production of reactive oxygen species (ROS) [11,12,13,14], disruption of electron transfer processes by dehydrogenase

* Corresponding author.

E-mail address: joseivan@unam.mx (I. Castillo).

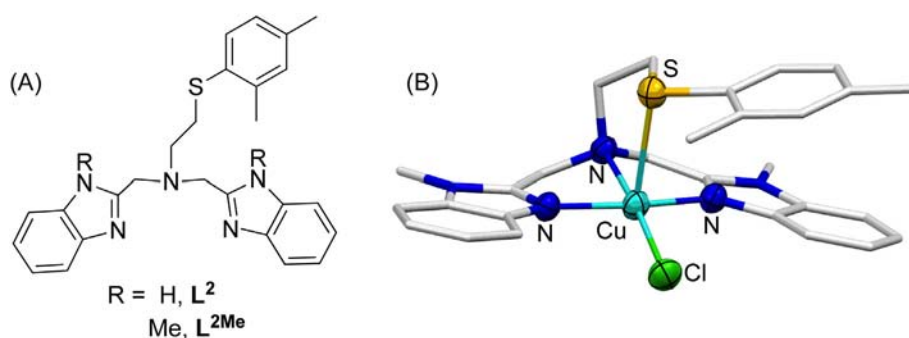


Fig. 1. (A) Structure of L^2 ($R = H$) and its methylated analog L^{2Me} ($R = Me$), (B) structure of $[CuCl-L^{2Me}]ClO_4$. H-atoms and perchlorate anion are omitted for clarity (adapted from reference [21]).

inhibition [15,16], non-apoptotic programmed cell death [17,18], and caspase inhibition leading to apoptotic cell death have been considered as viable cytotoxic routes [19]. In this context, we developed copper complexes with the chelating tetradentate ligands L^2 and L^{2Me} featuring a thioether group (Fig. 1), which proved to have antitumor activity *in vitro* [20,21]. Although the variety of cytotoxic mechanisms proposed for Cu complexes may circumvent the problem of drug resistance associated with cisplatin, further evidence is required in order to unambiguously establish their mode of action.

In this regard, we sought a better understanding of the mechanism of the interaction of the complexes with cells at the entry point, *i.e.* cell membranes, by studying the effect of copper complexes $Cu-L^2$ and $Cu-L^{2Me}$ on human erythrocytes and molecular models of their membranes. Human erythrocytes were chosen because of their sole membrane and lack of internal organelles, which constitute an ideal system for studying the interactions of chemical compounds with cell membranes [22]. On the other hand, although less specialized than many other cell membranes, they carry out enough functions in common with them such as active and passive transport, and the production of ionic and electric gradients to be considered representative of the plasma membrane in general. The molecular models of erythrocyte membranes consisted of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) bilayers, representative of phospholipid classes located in the outer and inner monolayers of cell membranes of human erythrocytes, respectively [23,24]. The capacity of the complexes to perturb the bilayer structures of DMPC and DMPE was evaluated by X-ray diffraction, while intact human erythrocytes were observed by scanning electron (SEM) and defocusing microscopy (DM). These systems and techniques have been used in our laboratories to determine the interaction and potential membrane-perturbing effects of other therapeutic compounds [25,26,27].

2. Experimental

2.1. Synthesis

The synthesis of both ligands and their complexes has previously been reported [20,21,28], along with their physical characterization. Based on the characterization, the cupric complexes are formulated as $[L^2Cu(ClO_4)_2 \cdot 2H_2O]$ (abbreviated $Cu-L^2$) and $[L^{2Me}Cu(O_3SCF_3)_2 \cdot 2H_2O]$ ($Cu-L^{2Me}$), respectively.

2.2. X-ray diffraction of phospholipid bilayers

Synthetic DMPC (lot 140PC-224, MW 677.9), and DMPE (lot 140PE-54, MW 635.9) were purchased from Avanti Polar Lipids (AL, USA). About 2 mg of each phospholipid was introduced in Eppendorf tubes and then added 200 μ L of (a) distilled water (control), and (b) aqueous solutions of the copper complexes in a range of concentrations. The samples thus prepared were then incubated for 1 h at 30 $^{\circ}C$

and 60 $^{\circ}C$ with DMPC and DMPE, respectively, and transferred into 1.5 mm diameter glass capillaries (Glas-Technik & Konstruktion, Berlin, Germany), centrifuged for 10 min at 2000 rpm and diffracted with Ni-filtered $CuK\alpha$ from a Bruker Kristalloflex 760 (Karlsruhe, Germany) X-ray generator. Sample to film distances were 8 and 14 cm, standardized by sprinkling calcite powder on the capillary surface. The relative reflection intensities were obtained in an MBraun PSD-50M linear position sensitive detector system (Garching, Germany); no correction factors were applied. The experiments were performed at 18 $^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, which is below the main phase transition temperature of both DMPC (24.3 $^{\circ}C$) and DMPE (50.2 $^{\circ}C$). Higher temperatures would have induced transitions to more fluid phases hampering the detection of structural changes; each experiment was repeated at least twice.

2.3. Scanning electron microscopy (SEM) of human erythrocytes

$Cu-L^2$ and $Cu-L^{2Me}$ were incubated *in vitro* with red blood cells obtained from a healthy human donor not receiving any pharmacological treatment. Blood was obtained by puncture of the ear lobe; 100 μ L was received in an Eppendorf tube containing 900 μ L of phosphate buffer saline solution (PBS 1 \times , pH 7.4) with 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA). The tube was centrifuged (1000 rpm \times 10 min), the supernatant discarded, and replaced by the same volume of saline solution; the whole process was repeated three times. Fractions of this stock of red blood cells suspension (RBCS) and saline solution were placed in nine Eppendorf tubes to prepare (a) the control, by mixing 100 μ L of saline solution plus 100 μ L RBCS, and (b) mixtures of 100 μ L of RBCS in saline with 100 μ L of each copper complex in a range of concentrations. All samples were then incubated in an oven at 37 $^{\circ}C$ for 1 h, in line with previous observations of visible effects of compounds on red cell shape [29,30]. Afterwards, they were fixed for 12 h at 4 $^{\circ}C$ with 500 μ L 2.5% glutaraldehyde in saline solution, reaching a final fixation concentration of about 2.4%. Finally, the previously centrifuged samples were washed in saline solution and suspended in additional 200 μ L of saline; 1 drop of each one was placed on Al glass cover stubs, air-dried at room temperature, gold coated and examined in a scanning electron microscope (JEOL JSM-6380LV, Japan), taking nine images of each concentration in order to average the count of erythrocytes; each experiment was repeated twice.

2.4. Defocusing microscopy (DM) of human erythrocytes

Defocusing microscopy (DM) is based on the visualization and analysis of contrast images of transparent objects, like biological organisms seen out of focus. Red blood cells (RBC) were obtained from a healthy donor under no pharmacological treatment and were received in PBS 1 \times pH 7.4 with 1 mg/mL of BSA. A red blood cell suspension (RBCs) was prepared diluting the washed blood 20 times in a solution of PBS and BSA. $Cu-L^2$ and $Cu-L^{2Me}$ solutions were also prepared in PBS with BSA. For analysis, RBCs diluted suspension was placed in an acrylic

cuvette and visualized in an optical microscope. After that, a morphologically normal erythrocyte was visualized and selected, and increased concentrations of each metal complex were added. The experiments were carried out in an inverted optical microscope Nikon Eclipse Ti-U, illuminated with a halogen lamp with transmission filter centered at 650 nm in order to avoid physical damage to RBC. The objective was mounted on a C-focus system (Mad City Labs, Madison, USA) for an autocorrection of the focus positioning and for a nanometric control of the focal plane position. Visualization was performed through a Retiga EXI Fast 12-BIT CCD camera (Surrey, Canada) calibrated to determine the equivalence between the gray level at the observed image, and the intensity at the image plane [31,32]. The software allowed simultaneous control of the C-focus and the nanopositioning devices, as well as the CCD camera [31]. Three-dimensional reconstructions were obtained with the software using two images captured in the defocus positions 0 and +2 μm .

2.5. Antiproliferative studies

The murine (WEHI-3) and human (HeLa, REH, K562) cell lines were acquired from ATCC (Manassas, USA). Cells were cultivated in IMDM (Gibco, BRL, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco, BRL, USA) and penicillin at 37 °C, 5% CO₂, and humidity at dew-point level. Biological assays were carried out with cells in 96 well plates, with initial densities of 5×10^3 , 3×10^4 , 1.2×10^4 , and 2.5×10^4 of WEHI-3, HeLa, REH, and K562 respectively; 5×10^5 cells/mL with phytohemagglutinin (Gibco, BRL Grand Island, NY) were also employed to induce proliferation of lymphocytes from human blood as healthy cells. **L**², **L**^{2Me}, Cu-**L**², and Cu-**L**^{2Me} were evaluated at 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5.0, 10, and 25 μM concentrations; cisplatin was used as reference. The inhibitory effect on proliferation was evaluated after 72 h by staining cell nuclei with crystal violet [33]. Data are presented as the mean value \pm the standard deviation of the proliferation percent of at least 3 independent assays, repeated four times each.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of copper complexes

Copper complexes were prepared and characterized as previously described, including solid-state structures of close analogs [20,21]; both Cu-**L**² and Cu-**L**^{2Me} gave rise to square pyramidal geometries as expected for Cu²⁺, with the weak thioether donor in the axial position. The poorly-coordinating perchlorate and trifluoromethanesulfonate anions dissociate in polar solvents, resulting in cationic [Cu-**L**ⁿ]²⁺ species that likely coordinate a molecule of H₂O in one of the equatorial positions when dissolved in water. The chloro-analog [CuCl-**L**^{2Me}]⁺ClO₄ is presented in Fig. 1. In order to compare the lipophilic properties of the complexes and their corresponding ligands, log P was calculated with the ALOGPS 2.1 software [34]. As expected, the values for the N-methylated **L**^{2Me} (5.44) and Cu-**L**^{2Me} (2.59 for the monocationic species [Cu(O₃SCF₃)-**L**^{2Me}]⁺ often detected in solution) are higher than those of the N-H analogs **L**² (5.25) and Cu-**L**² (2.45).

3.2. X-ray diffraction of DMPC and DMPE multilayers

Interactions with biological membranes are of utmost importance for drug pharmacokinetics (molecular pathway to specific receptor site) and pharmacodynamic action (specific interactions with high affinity receptor sites). These are not only relevant to the partitioning of the complexes into lipid bilayer and permeability, but also to the specificity of the therapeutic target that may in some cases be anchored to cell membranes. DMPC and DMPE bilayers were thus used as models of lipids preferentially located in the outer and inner monolayers of the human erythrocyte membrane, respectively [23,24]. They differ only in their terminal amino groups, with N(CH₃)₃⁺ for DMPC and

NH₃⁺ for DMPE. The molecules of the latter pack tighter than those of DMPC due to their smaller polar groups and higher effective charge, resulting in a very stable bilayer system held by electrostatic interactions and hydrogen bonds. Hydration of DMPC results in water filling the highly polar interbilayer spaces with a concomitant increase in their width [35], which might allow the incorporation of the copper complexes into DMPC bilayers and their consequent interaction. The capacity of the copper complexes Cu-**L**² and Cu-**L**^{2Me} to perturb the structures of DMPC and DMPE multilayers was evaluated by X-ray diffraction. As shown in Fig. 2A, water altered the structure of DMPC as its bilayer repeat (phospholipid bilayer width plus the layer of water) increased from about 55 Å in its dry crystalline form to 64.5 Å when immersed in water [35]. Consequently, the low-angle reflections (LA), which correspond to DMPC polar terminal groups, were reduced to only the first two orders of the bilayer width. On the other hand, only one strong reflection at 4.2 Å was observed in the wide-angle (WA) region that corresponds to the average distance between fully extended acyl chains organized with rotational disorder in hexagonal packing [35]. These results are indicative of a less ordered state of DMPC bilayers. As reported elsewhere, water did not significantly affect the bilayer structure of DMPE (Fig. 2B) [35]. After exposure to increasing concentrations of Cu-**L**², the diffraction patterns of both DMPC and DMPE remained practically unchanged, even with a 0.5 mM concentration as shown in Fig. 2. In contrast, exposure of DMPC to 0.5 mM of Cu-**L**^{2Me} induced a considerable reduction of the low-angle reflections (Fig. 3A). In the case of DMPE, similar but much milder effects were observed (Fig. 3B). Thus, Cu-**L**^{2Me} induced more pronounced effects on DMPC bilayers in both the polar and hydrophobic regions as evidenced by X-ray diffraction experiments. This may be attributed to a higher lipophilicity of **L**^{2Me} due to its large arylthioether substituent in combination with the benzimidazole N-methylated groups; the latter may prevent hydrogen bonding interactions with the polar end groups of the phospholipids, allowing Cu-**L**^{2Me} to diffuse into the hydrophobic region of the bilayers. Given the tight packing of DMPE bilayers, it is not surprising that no significant interactions were observed with either one of the complexes.

3.3. Scanning electron microscopy (SEM) studies of human erythrocytes

The effects of the copper complexes with human erythrocytes were evaluated *in vitro* by SEM. The resulting micrographs show that the

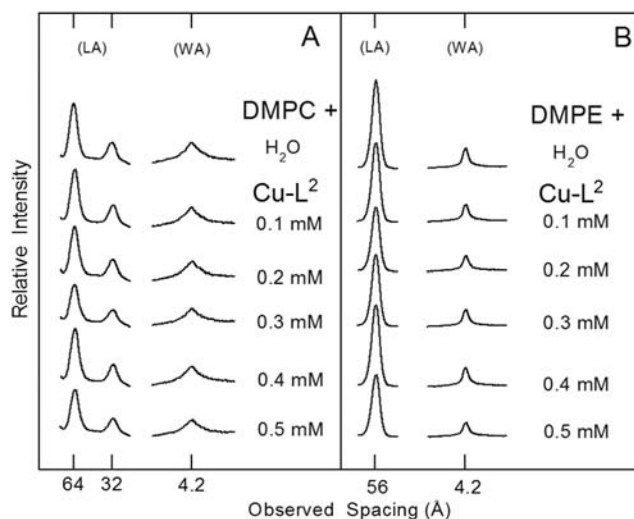


Fig. 2. Microdensitograms from X-ray diffraction patterns of (A) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and (B) dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) in water, and incubated with complex Cu-**L**²; (LA) low-angle and (WA) wide-angle reflections.

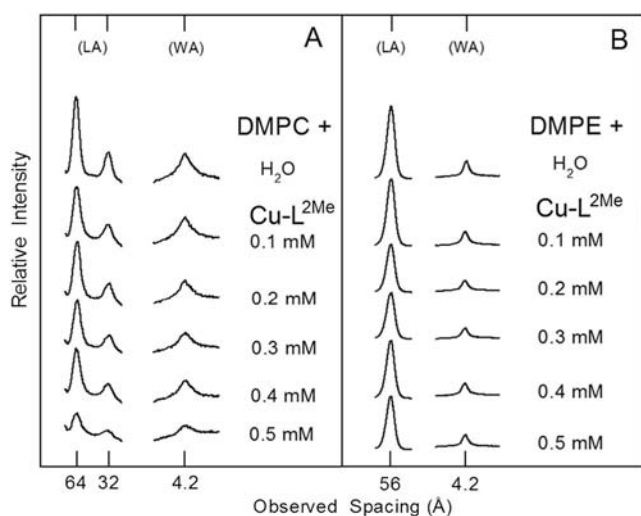


Fig. 3. Microdensitograms from X-ray diffraction patterns of (A) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and (B) dimyristoylphosphatidylethanolamine in water and incubated with complex Cu-L^{2Me}; (LA) low-angle and (WA) wide-angle reflections.

complexes induced notorious changes in the morphology of the red blood cells, deviating from their normal discoid shape. The control (erythrocytes incubated with saline solution) shows that the normal resting shape of the human erythrocyte is a flat biconcave disc (discocyte) ~8 μm in diameter, which can be observed in Figs. 4A and 5A. Morphological analysis of the results revealed that Cu-L² produced cellular polymorphism (Fig. 4B) as it induced the transformation of the normal erythrocytes into stomatocytes (cup-shaped form with evagination of one surface and a deep invagination of the opposite face), knizocytes (red blood cells with two or three concavities due to indentation in the cell membrane), and ovalocytes or elliptocytes (oblong or oval-shaped red blood cells); however, cells incubated with 0.2 mM Cu-L² showed mostly knizocytes (Fig. 4C). The results produced by Cu-L^{2Me} are shown in Fig. 5. As it can be appreciated, 0.1 and 0.15 mM concentrations induced a complete transformation of the red blood cells into echinocytes (Fig. 5B and 5C). Therefore, Cu-L^{2Me} induces the highest effect, and at lower concentrations by converting normal erythrocytes into echinocytes. According to the bilayer couple hypothesis, the shape changes induced in erythrocytes by foreign molecules are due to differential expansion of the two monolayers of the cell membrane [36,37]. Thus, stomatocytes are formed when the compound inserts into the inner monolayer, whereas spiculated-shaped echinocytes are produced when it locates into the outer moiety. The finding that low concentrations of Cu-L^{2Me} induced the formation of echinocytes indicates that they were inserted into the outer leaflet of the erythrocyte membranes.

This observation agrees with X-ray diffraction experiments with DMPC and DMPE multilayers, which showed a strong interaction with DMPC exclusively, located preferentially in the outer monolayer of human erythrocyte membranes.

3.4. Defocusing microscopy (DM) studies of human erythrocytes

The effect of the copper complexes Cu-L² and Cu-L^{2Me} on red blood cells was visualized and analyzed with defocusing microscopy (DM). This technique is a simple, accurate, and real-time method to detect alterations at a single cell level, in this case a human erythrocyte [31,32]. The cell morphology was analyzed through three-dimensional reconstructions at different concentrations of each metal complex. The results show that both complexes induced changes in the normal morphology (discocytes) of the red blood cells at micromolar concentrations. These changes include echinocytes and stomatocytes, and at higher concentrations lysis of the cells. The morphological changes induced by the complexes are presented in Figs. 6 and 7. Complex Cu-L² induced changes from the normal discoid erythrocyte shape into a cup-shaped (stomatocytic) one, as observed in the 3D reconstruction, where a flat section in the center of the cell, characteristic of a stomatocyte can be appreciated (Fig. 6B–C). At higher concentrations (0.67 mM) the cells were lysed (Fig. 6D). The results produced by Cu-L^{2Me} are shown in Fig. 7: this complex induced echinocytosis in red blood cells at higher concentrations (0.40 mM, Fig. 7D). These observations are consistent with SEM measurements, where Cu-L² induced alterations to cup-shaped stomatocytes (Figs. 4B and 6B), while Cu-L^{2Me} induced the formation of echinocytes (Figs. 5B and 7D). The more pronounced effect of Cu-L^{2Me} at lower concentrations (0.10 mM) may be attributed to the higher lipophilicity conferred by the benzimidazole N-methyl groups, which allows it to penetrate the DMPC-rich outer leaflet of the cell membranes. In the case of Cu-L², the polar NH groups in the benzimidazole moiety may not allow expedite access to the lipophilic DMPC, but their potential for hydrogen bonding is consistent with its preferential location in the DMPE-rich inner leaflet. This would result in the observed stomatocyte formation with Cu-L².

3.5. Antiproliferative studies

Due to the lipophilic arylthioether groups of Cu-L² and Cu-L^{2Me}, the aqueous solubility of the complexes is relatively low, so that stock solutions for antiproliferative studies were prepared at 0.5 mM. Addition of a few drops of acetonitrile was helpful to completely solubilize the complexes prior to reaching the desired concentration in volumetric flasks. In previous studies, Cu-L² featuring benzimidazole-NH groups was tested on murine (WEHI-3, P388, Raw 264.7) and human (K-562) leukemia cell lines, as well as on the murine lung fibrosarcoma L929 and healthy murine bone marrow

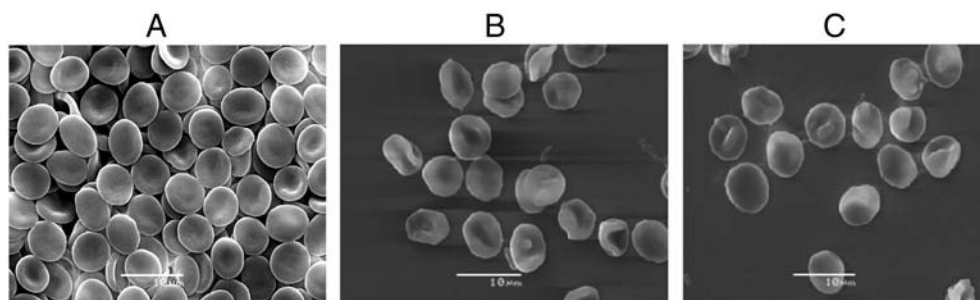


Fig. 4. Effect of the copper complex Cu-L² on the morphology of human erythrocytes. Images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of (A) control, and erythrocytes incubated with (B) 0.15 mM, and (C) 0.20 mM Cu-L².

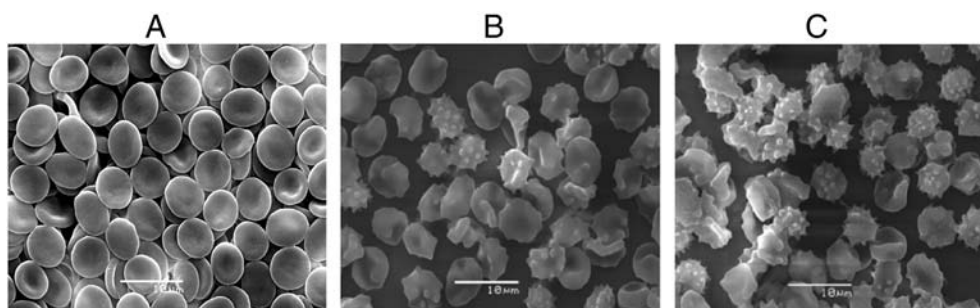


Fig. 5. Effect of the copper complex Cu-L^{2Me} on the morphology of human erythrocytes. Images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of (A) control, and erythrocytes incubated with (B) 0.10 mM, and (C) 0.15 mM Cu-L^{2Me}.

cells. While the physicochemical properties of its N-methylated congener Cu-L^{2Me} are nearly identical (including the redox potential) [20,21], an examination of the latter was needed to test whether this extends to their biological activity. Thus, the murine WEHI-3, and human HeLa, REH, and K-562 cancer cell lines, along with healthy lymphocytes, were subjected to increasing concentrations of Cu-L^{2Me}, with cisplatin as reference; the organic ligands L² and L^{2Me} were employed as controls to determine the involvement of the cupric ions in the cytotoxic activity. As evidenced by the IC₅₀ values (Table 1), the ligands have very low activity against all cell lines; in contrast, the N-methylated complex Cu-L^{2Me} has higher cytotoxicity than Cu-L² against most cell lines, indicating that methylation of the benzimidazole ligands has a significant effect. The marked increase of activity of Cu-L^{2Me} relative to Cu-L², evidenced in the almost 4-fold difference against WEHI-3, and nearly 10-fold relative to the K-562 tumor cell line is noteworthy. Moreover, Cu-L^{2Me} is more active than cisplatin against all cancer cell lines, except for HeLa, while being slightly less cytotoxic towards healthy lymphocytes. While the generation of reactive oxygen species (ROS) by Cu-L² and Cu-L^{2Me} has been proposed as a viable cytotoxic mechanism

[20], initial entry to the cell must be accounted for. Analogy with cisplatin would require the involvement of copper transporter 1 protein (CTR1) [38], while an alternative mechanism would involve passive diffusion through the hydrophobic cell membrane. The latter could initially explain the enhanced cytotoxicity of the N-methylated complex Cu-L^{2Me} due to its increased hydrophobic character, and possibly also due to the reduced ability to interact with polar groups by hydrogen bonding. Thus, Cu-L^{2Me} would have easier access to the cells by passive diffusion, as evidenced by defocusing microscopy in the specific case of erythrocytes.

4. Conclusions

The copper complexes Cu-L² and Cu-L^{2Me}, featuring mixed benzimidazole/thioether chelating ligands, have significant cytotoxic activity that may be initially mediated by their capacity to interact with cell membranes. As initially determined on lipid bilayer models DMPC and DMPE by X-ray diffraction experiments, the benzimidazole N-methylated derivative Cu-L^{2Me} appears to be more lipophilic than its NH counterpart Cu-L². This is reflected in the pronounced effect of Cu-

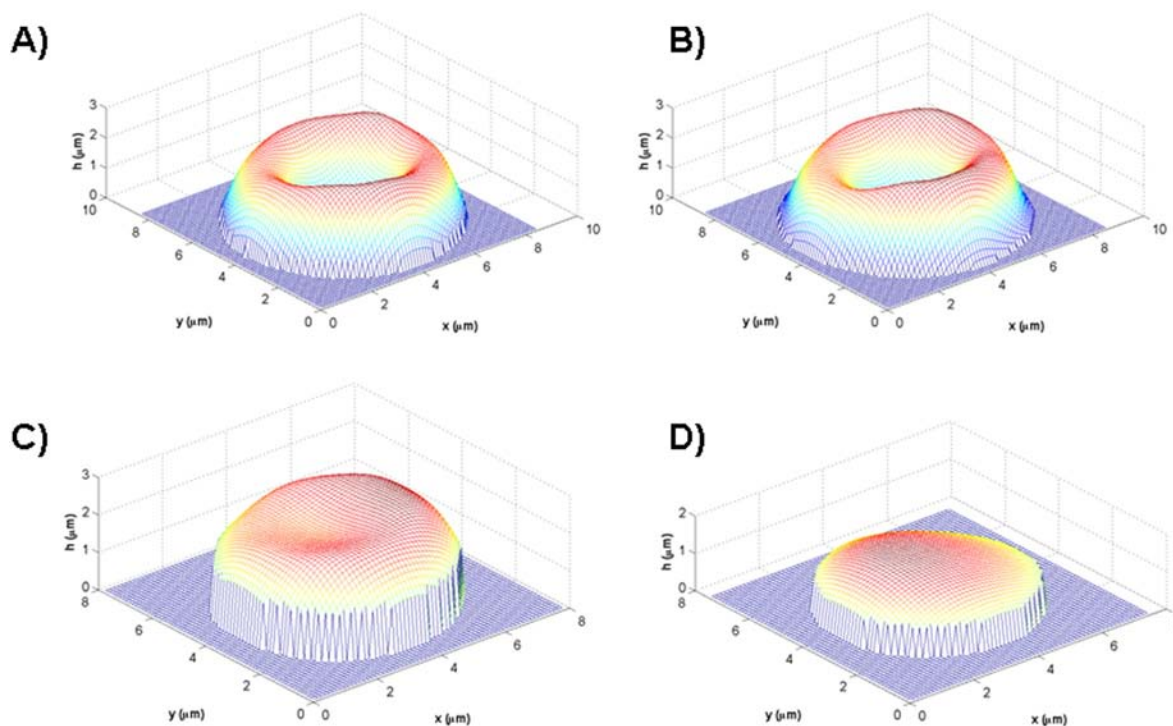


Fig. 6. Effect of the copper complex Cu-L² on the morphology of human erythrocytes. Three-dimensional reconstructions obtained by defocusing microscopy of (A) control, (B) erythrocytes incubated with 0.28 mM, (C) 0.50 mM, and (D) 0.67 mM Cu-L².

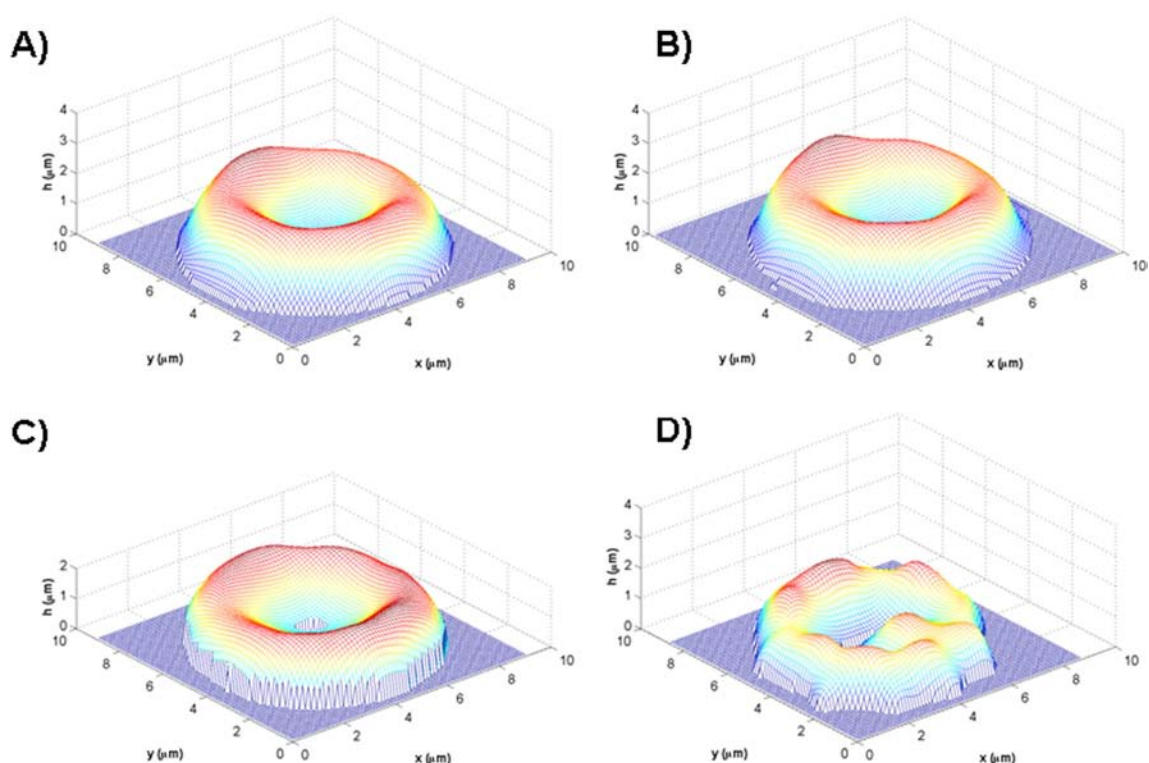


Fig. 7. Effect of the copper complex $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ on the morphology of human erythrocytes. Three-dimensional reconstructions obtained by defocusing microscopy of (A) control, (B) erythrocytes incubated with 0.10 mM, (C) 0.30 mM, and (D) 0.40 mM $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$.

$\text{L}^{2\text{Me}}$ on the bilayer structure of DMPC at low concentrations. While neither Cu-L^2 nor $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ have a strong effect on the bilayer structure of the more tightly packed DMPE, a class of lipid preferentially located in the inner leaflet of the human erythrocyte membrane, the former complex seems to interact more favorably with this phospholipid as evidenced by the stomatocyte shapes observed by SEM with Cu-L^2 . In contrast, $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ is preferably hosted in the PC-rich outer leaflet of the erythrocyte membranes, based on the echinocyte shapes determined by SEM. These findings were confirmed in single erythrocytes observed by defocusing microscopy, whereby increasing concentrations of Cu-L^2 caused deformation to a cup-shaped stomatocyte, whereas $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ resulted in echinocytes. In all the experiments $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ has a more pronounced effect at lower concentrations than those required with Cu-L^2 , including its antiproliferative activity. Taking into account that the redox properties of both complexes are comparable, and thus capable of generating ROS as a potential cytotoxic pathway, the increased lipophilicity of $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ may account for its higher antiproliferative activity by passive diffusion through cell membranes. The antiproliferative assays indicate that the organic ligands L^2 and $\text{L}^{2\text{Me}}$ have a significantly lower activity against tumor cell lines compared to both copper complexes. On the other hand, previous studies have shown that Cu^{2+} ions also interact with DMPC bilayers and human erythrocyte

membranes but at about ten times lower concentration than the complexes reported herein [39]. Nonetheless, the lipophilic character of $\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$ appears to allow an easier entry into cells to exert its cytotoxic effect selectively.

Acknowledgments

The authors thank CONACYT (Project 188724, fellowship 254496), CONICYT (Projects PCCI 12013, PIA PFB0824) and FONDECYT (Projects 1130143, 3140167) for financial support.

References

- [1] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R.A. Sharma, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 193–204.
- [2] P. Singla, V. Luxami, K. Paul, *RSC Adv.* 4 (2014) 12422–12440.
- [3] Y. Bansal, O. Silakari, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 6208–6236.
- [4] J.J. Wilson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4470–4495.
- [5] T. Wang, Z. Guo, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 525–537.
- [6] M.C. Linder, *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, 1991.
- [7] C. Santini, M. Pellei, V. Gandini, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815–862.
- [8] M. Devereaux, M. McCann, D.O. Shea, R. Kelly, D. Egan, C. Deegan, K. Kavanagh, V. McKee, G. Finn, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1023–1031.
- [9] M. Devereaux, D.O. Shea, A. Kelleth, M. McCann, M. Walsh, D. Egan, C. Deegan, K. Kedziora, G. Rosair, H. Müller-Bunz, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 881–892.
- [10] S.S. Hinda, M. Frezza, D. Tomco, M.J. Heeg, L. Hryhorczuk, B.R. McGarvey, Q.P. Dou, C.N. Verani, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4353–4361.
- [11] T.B. Thederahn, M.D. Kuwabara, T.A. Larsen, D.S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 4941–4946.
- [12] M. Pitie, C. Boldron, G. Pratiel, *Adv. Inorg. Chem.* 58 (2006) 77–130.
- [13] N. Aliaga-Alcalde, P. Marqués-Galleo, M. Kraaijkamp, C. Herranz-Lancho, H. den Dulk, H. Gerner, O. Roubeau, S.J. Teat, T. Weyhermuller, *J. Reedijk, Inorg. Chem.* 49 (2010) 9655–9663.
- [14] S.S. Bhat, A.A. Kumbhar, H. Heptullah, A.A. Khan, V.V. Gobre, S.P. Gejji, V.G. Puranik, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 545–558.
- [15] K.Y. Djoko, P.S. Donnelly, A.G. McEwan, *Metallomics* 6 (2014) 2250–2259.
- [16] K.Y. Djoko, B.M. Paterson, P.S. Donnelly, A.G. McEwan, *Metallomics* 6 (2014) 854–863.

Table 1

Antiproliferative activity (IC_{50} in μM concentrations).

Compound	WEHI-3 IC_{50} (μM)	HeLa	REH	K-562	lymphocytes
L^2	53 ± 6	80 ± 5	N/D ^b	N/D ^b	N/D ^b
$\text{L}^{2\text{Me}}$	N/D ^b	44 ± 8	N/D ^b	53 ± 9	N/D ^b
Cu-L^2	21 ± 3^a	25 ± 4	19 ± 2	46 ± 1^a	8 ± 1
$\text{Cu-L}^{2\text{Me}}$	6 ± 1	10 ± 1	7 ± 2	5 ± 1	21 ± 3
Cisplatin	16 ± 6	8 ± 3	18 ± 5	18 ± 2	16 ± 1

^a From reference [20].

^b $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$.

- [17] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 185–211.
- [18] S. Tardito, L. Marchiò, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1325–1348.
- [19] S. Tardito, I. Bassanetti, C. Bignardi, L. Elviri, M. Tegoni, C. Mucchino, O. Bussolati, R. Franchi-Gazzola, L. Marchiò, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 6235–6242.
- [20] L.A. Rodríguez Solano, I. Aguiñiga, M. López-Ortiz, R. Tiburcio, A. Luviano, I. Regla, E. Santiago-Osorio, R.A. Toscano, I. Castillo, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2011) 3454–3460.
- [21] I. Castillo, V.M. Ugalde-Saldívar, L.A. Rodríguez Solano, B.N. Sánchez Eguía, E. Zeglio, E. Nordlander, *Dalton Trans.* 41 (2012) 9394–9404.
- [22] J.Y. Chen, W.H. Huestis, *Biochim. Biophys. Acta* 1323 (1997) 299–309.
- [23] J.M. Boon, B.D. Smith, *Med. Res. Rev.* 22 (2000) 251–281.
- [24] P.F. Devaux, A. Zachowsky, *Chem. Phys. Lipids* 73 (1994) 107–120.
- [25] M. Suwalsky, J. Belmar, F. Villena, M.J. Gallardo, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, *Arch. Biochem. Biophys.* 539 (2013) 9–19.
- [26] M. Suwalsky, M. Jemiola-Rzeminska, M. Altamirano, F. Villena, N. Dukes, K. Strzalka, *Biophys. Chem.* 202 (2015) 13–20.
- [27] M. Suwalsky, P. Zambrano, F. Villena, M. Manrique-Moreno, M.J. Gallardo, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, S. Mennickent, N. Dukes, *J. Membr. Biol.* 248 (2015) 683–693.
- [28] P.R. Martínez-Alanis, M. López Ortiz, I. Regla, I. Castillo, *Synlett* (2010) 423–426.
- [29] B. Zimmermann, D.M. Soumpasis, *Cell Biophys.* 7 (1985) 115–127.
- [30] S.V.P. Malheiros, M.A. Brito, D. Brites, M.N. Correa, *Chem. Biol. Interact.* 126 (2000) 79–95.
- [31] S. Etcheverry, M. Gallardo, P. Solano, M. Suwalsky, O.N. Mesquita, C.J. Saavedra, *J. Biomed. Opt.* 17 (2012) (106013–1–106013–6).
- [32] L.G. Mesquita, U. Agero, O.N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett.* 88 (2006) 133901–133903.
- [33] R. Gillies, N. Didier, M. Denton, *Anal. Biochem.* 159 (1986) 109–113.
- [34] I.V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V.A. Palyulin, E.V. Radchenko, N.S. Zefirov, A.S. Makarenko, V.Y. Tanchuk, V.V. Prokopenko, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 19 (2005) 453–463.
- [35] M. Suwalsky, *Phospholipid Bilayers*, in: J.C. Salamone (Ed.) *Polymeric Materials Encyclopedia*, 7, CRC, Boca Raton, FL 1996, pp. 5073–5078.
- [36] M.P. Sheetz, S.J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 (1974) 4457–4461.
- [37] G. Lim, M. Wortis, R. Mukhopadhyay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 16766–16769.
- [38] F. Arnesano, G. Natile, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 2070–2081.
- [39] M. Suwalsky, B. Ungerer, L. Quevedo, F. Aguilar, C.P. Sotomayor, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 233–238.