



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE COMPLEJOS DE COBRE CON LIGANTES DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL INSPIRADOS EN EL SITIO ACTIVO DE LAS ENZIMAS POLISACÁRIDO MONOOXIGENASAS AA9, AA10 Y AA11

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.A Andrea Carolina Neira Desalvador

TUTOR: **Dr. Ivan Castillo Pérez**

Instituto de Química, UNAM

México D.F, Junio 2015

Jurado Evaluador

Presidente:

Dr. Alberto Rojas Hernández

UAM-Iztapalapa

Vocal:

Dr. Ernesto Rivera García

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Vocal:

Dr. José Guadalupe López Cortés

Instituto de Química, UNAM

Vocal:

Dr. José Luis Medina Franco

Facultad de Química, UNAM

Secretario:

Dra. Susana Porcel García

Instituto de Química, UNAM

Tutor de tesis:

Dr. Ivan Castillo Pérez

Instituto de Química, UNAM

Agradecimientos

Al Dr. Ivan Castillo Pérez por aceptarme e integrarme en su grupo de investigación, por su orientación activa en mi formación académica y por su apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría (293842), así como al proyecto 151837 por el financiamiento.

A DGAPA-PAPIIT (IN210214) por financiamiento adicional al proyecto de investigación.

Al Instituto de Química y en especial al personal técnico que labora en el mismo. Al personal académico y administrativo.

Al Dr. Víctor Ugalde por su asesoría en el estudio electroquímico.

A mis sinodales: Dra. Susana Porcel García, Dr. José Luis Medina Franco, Dr. José Guadalupe López Cortés, Dr. Ernesto Rivera García, Dr. Alberto Rojas Hernández.

A quienes me ofrecieron una amistad sincera y me acompañaron cuando más lo necesité y menos lo esperé: Claudia Vences, Cecilia Meza, Nidia Barragán, Silvestre Mendoza, Rebeca Osorio, Martha Mayorquin, Manuel Ramos y Angélica López. Los quiero muchísimo.

A mis maestros y compañeros de clase, por compartir su sabiduría conmigo.

A mis compañeros del laboratorio 4C por sus valiosos aportes.

A mis seres amados por ser mi inspiración: Mis padres María Elsa y Fabio Eberto, mis hermanos John Freddy y Harbey, mis sobrinitos Daniel, Camilo y Santiago y a mi "Poki".

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 4C de Química Inorgánica y Supramolecular del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Publicación

Castillo, I.; Neira, A. C.; Nordlander E.; Zeglio E. Bis(benzimidazolyl)amine copper complexes with a synthetic ‘histidine brace’ structural motif relevant to polysaccharide monooxygenases. *Inorg. Chim. Acta* 422, 2014, 152–157.

Presentación en eventos

Universidad Nacional Autónoma de México. QUIMIUNAM 2015, Modalidad presentación oral: “Benzimidazole-copper complexes inspired on the active site of polysaccharide monooxygenase enzymes AA9, AA10 and AA11”. Ciudad Universitaria, D.F. Abril 23 de 2015.

Simposio Interno del Instituto de Química 2015. Póster: “Benzimidazole-copper complexes inspired on the active site of polysaccharide monooxygenase enzymes AA9, AA10 and AA11”. Ciudad Universitaria, D.F. Junio 8-10 de 2015.

Abreviaturas y símbolos

Ar	Aromático
br	Señal ancha RMN
(d)	Banda de Infrarrojo con intensidad débil
EM	Espectrometría de masas
ESI	Electrospray ionization
(f)	Banda de Infrarrojo con intensidad fuerte
FAB	Fast atom bombardment
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
LPMO's	Enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos
(m)	Banda de Infrarrojo con intensidad media
M	Molar
MHz	Megahertz
mL	Mililitro

mmol	Milimoles
mM	Milimolar
m	multiplete
mT	militeslas
m/z	Relación masa-carga
OTf	Triflato
PMO's	Polisacárido Monooxigenasas
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPE	Resonancia paramagnética electrónica
s	singulete
t	triplete
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

Contenido

Abreviaturas y símbolos	6
Resumen.....	10
I. Antecedentes	14
Generalidades de las metaloenzimas.....	15
El cobre y sus ligantes en metaloenzimas	18
Activación de oxígeno por complejos mononucleares de cobre	23
Polisacárido monooxigenasas de cobre AA9, AA10, AA11. Hacia los biocombustibles	25
II. Hipótesis.....	37
III. Objetivos	39
Objetivo General.....	40
Objetivos Específicos	40
IV. Resultados y discusión	41
4.1. Síntesis y caracterización	42
4.1.1. Ligante.....	42
4.1.2. Complejos cúpricos	45
4.1.3. Complejo cuproso.....	57
4.2. Estudio electroquímico	59
4.3. Estudios de reactividad frente a Oxígeno	62
V. Conclusiones	64
VI. Parte Experimental	67
6.1. Reactivos y técnicas.....	68
6.2. Procedimientos trabajo en ambiente anhidro	69
6.3. Espectroscopia RPE.....	69
6.4. Cristalografía de rayos X.....	70
6.5. Procedimientos sintéticos	70
6.5.1. Síntesis del ligante 2BB: bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina ...	70

6.5.2. Síntesis de los complejos de Cu ²⁺	71
6.5.3. Síntesis de los complejos de Cu ⁺	73
Anexos	74
Anexo I: Datos Cristalográficos	75
Anexo II: Espectros de Infrarrojo.....	79
Anexo III: Espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica.....	82
Anexo IV: Espectros de RMN ¹³ C.....	86
Anexo V: Espectros UV-Visible.....	87
Anexo VI: Artículo publicado.....	90
Bibliografía.....	96

Resumen

El presente trabajo de investigación muestra la síntesis, caracterización (por técnicas espectroscópicas y estructurales) y estudio de la reactividad de complejos de coordinación de cobre en sus estados de oxidación comunes (I y II), con el ligante bencimidazólico N-metilado bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina (**2BB**) como una primera aproximación para modelar sistemas inspirados en los sitios activos mononucleares de enzimas Polisacárido Monooxigenasas dependientes de Cobre (PMO's).

Estos modelos moleculares biomiméticos contienen en su esqueleto átomos donadores N de grupos bencimidazol con disposición similar a los sitios activos de las metaloenzimas PMO's AA9, AA10 y AA11, lo cual tiene como finalidad obtener información sobre el modo de degradación oxidativa de los polisacáridos que ellas ejercen. Cabe resaltar que dichas metaloenzimas se perfilan como potenciadoras de degradación enzimática, abriendo nuevas posibilidades para la conversión de biomasa recalcitrante -la cual al día de hoy es abundante y renovable- en biocombustibles de segunda generación.

Experimentalmente se observó que como resultado de la reacción de sales de Cu^{2+} con el ligante **2BB**, se obtienen complejos mono- o bimetálicos. La caracterización espectroscópica y en estado sólido reveló geometrías de coordinación piramidal de base cuadrada o bipiramidal trigonal alrededor de los iones cúpricos. En $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})\}_2](\text{BF}_4)_2$, la estructura de dicobre es determinada por la naturaleza puente de los ligantes fluoruro, los cuales complementan la disposición en forma de T de los donadores N_3

proporcionada por **2BB** para definir una geometría de coordinación tipo pirámide cuadrada (o tetraédrica distorsionada con una cara ocluida). Los complejos mononucleares de cobre **2BBCuCl₂** y **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂** se caracterizan por una geometría bipiramidal trigonal tanto en disolución como en el estado sólido. En el caso del complejo cuproso **[2BBCuCl]•(CH₃CN)₃**, se observó formación de complejo monometálico por evidencia espectroscópica, la cual a falta de información cristalográfica no establece la geometría alrededor de los iones Cu⁺.

En todos los complejos caracterizados en estado sólido, la forma de T del conjunto de donadores N₃ de **2BB** es análoga a la del entorno de coordinación de los iones cobre proporcionados por un “abrazo de histidina” y un imidazol de histidina adicional en los sitios activos de las metaloenzimas polisacárido monooxigenasas.

Del estudio electroquímico que se hizo para los complejos de Cu(I) formados con el ligante descrito, se observó un proceso oxidativo reversible para el par **[2BBCu]⁺/[2BBCu]²⁺**, cuyo potencial de media onda es $E_{1/2} = -138$ mV vs el par ferricinio/ferroceno (Fc⁺/Fc) como referencia, lo cual se atribuye a la capacidad del N de estabilizar especies de Cu(II).

El posterior estudio de reactividad frente a O₂ a través de espectroscopía UV-visible a baja temperatura del complejo de cobre(I) formado *in situ* a partir del ligante descrito y triflato de cobre no permitió evidenciar especies activas de oxígeno. Sin embargo, el estudio de reactividad frente a celobiosa como

modelo de la celulosa, mostró a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas un pico con relación $m/z = 239$, que corresponde al producto doblemente oxidado de la gluocsa $[\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_2\text{O}_7]^+$, congruente con una ruptura de disacárido en las posiciones C1 y C4.

I. Antecedentes

Generalidades de las metaloenzimas

La base de la catálisis es el incremento en la velocidad de una reacción debida a una sustancia que no cambia a lo largo de este proceso, el catalizador. En la naturaleza, diversas proteínas llevan a cabo eficientemente una gran variedad de procesos y se conocen específicamente como enzimas, las cuales son moléculas relativamente flexibles (internamente móviles), restringidas a disoluciones acuosas alrededor de un $\text{pH} = 7$, que tienen la función de rearrreglar o mover átomos o electrones de los reactivos ligados a sus sitios activos para generar los productos respectivos, a una velocidad mayor comparada con la velocidad que se alcanzaría en su ausencia. En otros términos, las enzimas reducen la barrera de energía de activación que rige una reacción dada.^[1] Se calcula que de una mitad a un tercio de las enzimas requiere un ión metálico para el plegamiento correcto o la función catalítica y a este tipo particular de enzimas se les denomina metaloenzimas.^[2]

Las características que confieren a las metaloenzimas poder catalítico surgen de la forma en que las estructuras y la energética de los iones metálicos seleccionados han sido manipulados durante la evolución por sus ligantes. La secuencia de aminoácidos que conforma a las enzimas ha sido seleccionada evolutivamente por mutaciones, de modo que al ión se le da (1) un conjunto adecuado de ligantes, (2) una estructura, cerrada para la transferencia de electrones pero con una cara abierta para el ataque del sustrato, (3) una estructura circundante que involucra la exposición de una parte razonable de

la proteína que contenga el sitio del ión metálico y permita una pequeña variación dicho sitio (la movilidad), para que coincida con una sucesión de estados intermediarios, (4) un sitio selectivo de unión al sustrato, (5) una energía de enlace del sustrato que involucre grupos vecinos (asistencia en catálisis del sitio adyacente), (6) en los casos de reacciones redox, un potencial de media onda adecuado para una energía de relajación controlada. Cabe resaltar que las metaloenzimas están posicionadas en compartimentos y membranas celulares, por lo cual son solamente accesibles para sustratos específicos.^[2,3]

En general, un sitio de unión proteína-metal consiste de uno o más iones metálicos y la cadena lateral de la proteína, además de ligantes puentes y terminales que definen la primera esfera de coordinación de cada ión metálico. Tales sitios pueden ser clasificados en cinco tipos básicos según las funciones indicadas:

- a) Estructural: configuración (en parte) de las estructuras terciarias y/o cuaternarias de la proteína.
- b) Almacenamiento: recepción, enlace y liberación de metales en forma soluble.
- c) Transferencia de electrones: recepción, liberación y almacenamiento de electrones.
- d) Enlace a oxígeno: Coordinación y liberación Metal-O₂.
- e) Catalítico: enlace al sustrato, activación y reinicio. Según el tipo de reacción catalizada por la enzima se encuentran las: dismutasas,

oxidasas y oxigenasas, nitrogenasas e hidrogenasas, oxotransferasas, hidrolasas, entre otras.^[4]

Dentro de los metales que se encuentran formando parte de los diferentes tipos de enzimas se incluyen magnesio, calcio, todos los miembros de la primera serie de transición (excluyendo titanio, vanadio y cromo) y molibdeno, tungsteno. Estos metales y sus ligantes constituyen grupos prostéticos que usualmente se hallan unidos de forma covalente a la cadena polipeptídica por ligantes endógenos provistos de cadenas laterales de aminoácidos. Podríamos llamar a las metaloenzimas son complejos metálicos muy elaborados.^[5]

Ejemplos de catálisis y sitios activos de metaloenzimas son: la hidrólisis ácido-base que lleva a cabo la anhidrasa carbónica (Zn), la transferencia de electrones por los citocromos (Fe, Fe-Hemo, Cu), la oxidación por el citocromo P-450 (Fe, Fe-Hemo, Cu), la formación de hidrógeno por las hidrogenasas (Ni, Fe), la transferencia de grupos $-\text{CH}_3$ por la metilmalonato isomerasa $[\text{Co}(\text{B}_{12})]$, la transferencia de grupos $-\text{OPO}_3^{2-}$ por las cinasas (Mg) y la transferencia de grupos CO por la acetilsintetasa Ni(F-430).^[4]

El cobre y sus ligantes en metaloenzimas

El cobre es un metal que probablemente no se encontraba disponible cuando surgió la vida en la tierra, pero se convirtió en fundamental para la evolución de los organismos complejos.^[6] Durante el período de la abiogénesis, los océanos de la Tierra carecían de oxígeno y eran ricos en H₂S. Como resultado, el cobre habría existido principalmente en forma de sulfuros cuprosos extremadamente insolubles, pero el surgimiento de bacterias fotosintéticas productoras de oxígeno alteró dramáticamente la composición en metales de los océanos primigenios, y con el nuevo entorno oxidativo se alteró la solubilidad, y por ende la disponibilidad de iones metálicos.^[7]

El cobre en los seres vivos se encuentra coordinado principalmente por tres tipos de ligantes: los aminoácidos histidina, cisteína y metionina de las cadenas laterales; este hecho está relacionado con los principios de ácidos duros y blandos, ya que aplicándolos al metal de interés, vemos que el Cu(I) es un ácido blando, mientras que Cu(II) está en el límite (Tabla 1). Por ello, esperaríamos que los sitios de unión de cobre sean dominados por las cadenas laterales que contienen aminoácidos capaces de actuar como ligantes blandos o en el límite. Los aminoácidos con átomos donadores nitrógeno y azufre, histidina, cisteína y metionina, respectivamente, serían por lo tanto los preferidos sobre los aminoácidos con grupos hidroxilo, carboxilo, o cadenas laterales de amina primaria como se encuentran en serina y tirosina, aspartato y glutamato y asparagina, glutamina y arginina, respectivamente.

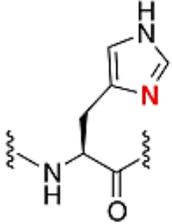
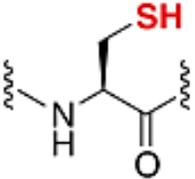
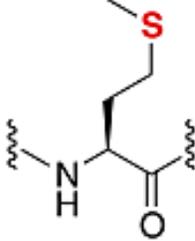
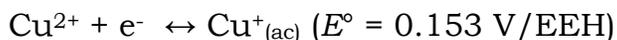
Aminoácido	Propiedades
 <p data-bbox="456 552 586 583">Histidina</p>	<p data-bbox="932 300 1263 331">Preferencia hacia Cu²⁺,</p> <p data-bbox="980 354 1214 386">Enlazante fuerte</p> <p data-bbox="889 409 1305 441">Donador de protones (pKa~6)</p> <p data-bbox="971 464 1224 495">Neutro o aniónico</p> <p data-bbox="1024 518 1170 550">Hidrofilico</p>
 <p data-bbox="464 905 581 936">Cisteína</p>	<p data-bbox="943 642 1252 674">Preferencia hacia Cu⁺</p> <p data-bbox="980 697 1214 728">Enlazante fuerte</p> <p data-bbox="889 751 1305 783">Donador de protones (pKa~8)</p> <p data-bbox="1036 806 1166 837">Aniónico</p> <p data-bbox="1024 861 1170 892">Hidrofilico</p> <p data-bbox="959 915 1235 947">Fácilmente oxidado</p>
 <p data-bbox="451 1293 591 1325">Metionina</p>	<p data-bbox="943 1033 1252 1064">Preferencia hacia Cu⁺</p> <p data-bbox="987 1087 1208 1119">Enlazante débil</p> <p data-bbox="927 1142 1268 1173">No donador de protones</p> <p data-bbox="1049 1197 1146 1228">Neutro</p> <p data-bbox="1016 1251 1179 1283">Hidrofóbico</p>

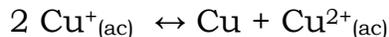
Tabla 1. Resumen de las propiedades químicas provistas por histidina, cisteína y metionina de las cadenas laterales, relevantes para el enlace al cobre.^[8]

La diversidad proporcionada sólo por estos tres ligantes, ofrece opciones de selectividad: nitrógeno frente a azufre, especies neutras vs. cargadas o hidrófilicas vs. hidrofóbicas, susceptibilidad a la oxidación, entre otras. Las

especies de cobre biológicamente importantes corresponden al par redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, el cual posee un potencial de reducción $E^\circ = 0.153 \text{ V}$:



El ión Cu^+ dismuta debido a su inestabilidad en disolución acuosa:



Cabe señalar que en los organismos vivos (animales, plantas, bacterias y hongos) la especie de Cu^+ se estabiliza por efecto de la naturaleza protéica del entorno. Al igual que otros metales, el cobre exhibe preferencias en la geometría de unión basado en su número de electrones de valencia d y el número y tipo de ligantes, como se explica a través de los principios de la teoría del campo ligante,^[9] por lo cual es de esperar diferencias en las preferencias geométricas para Cu(I) y Cu(II) .

Cu(I) corresponde a un sistema d^{10} , por tanto no tiene preferencias geométricas basadas en la energía de estabilización del campo ligante. Se encuentra a menudo coordinado por 2, 3, 4 o ligantes en geometrías: lineal, plana trigonal, o tetraédrica, respectivamente.

Cu(II) es un sistema d^9 que exhibe preferencias geométricas basadas en parte en la energía de estabilización del campo ligante. A menudo se encuentra coordinado por 4, 5 o 6 ligantes, en geometrías: plana cuadrada, piramidal cuadrado u octaédricos distorsionados axialmente, respectivamente, siendo este último el resultado de la distorsión de Jahn-Teller.^[10, 11]

Las enzimas y proteínas que utilizan cobre como cofactor cuentan con sitios de alta afinidad de números de coordinación 4-5 que previenen la pérdida del metal durante el ciclo redox.^[12] Los centros de cobre presentes en los sitios activos de las cuproproteínas se clasifican en tres tipos a partir de sus características espectroscópicas UV-visible, de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) y de coordinación (Tabla 2);^[13, 14, 15]

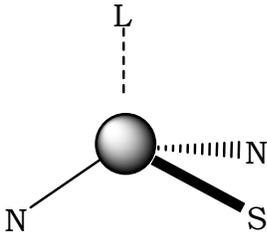
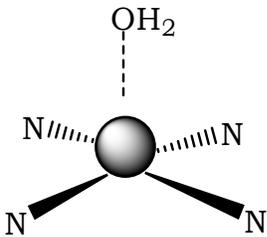
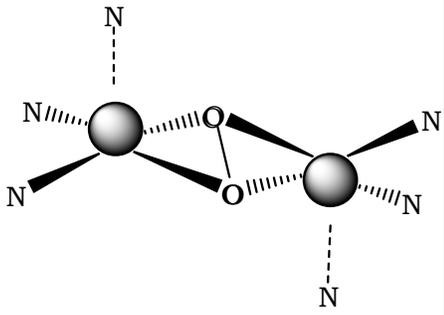
Tipo de Cu Función (ejemplo)	Entorno del Cu	UV-Vis EPR
<p><i>Tipo I</i> (mononuclear), llamadas también proteínas azules</p> <p>Transporte de electrones (Plastocianina)</p>		<p>-Absorción intensa en la región visible ($\lambda_{\max} \sim 600 \text{ nm}$; $\epsilon > 3,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)</p> <p>-Desdoblamiento hiperfino pequeño en la región $g \parallel$</p>
<p><i>Tipo II</i> (binuclear con centros no acoplados o mononuclear)</p> <p>Catálisis, redox (Cu, Zn-SOD)</p>		<p>-Prácticamente incolores, débil espectro de absorción (sólo transiciones prohibidas)</p> <p>-Espectro RPE presenta parámetros normales para Cu^{2+}</p>
<p><i>Tipo III</i> (binuclear). Transporte de O_2 (Hemocianina)</p>		<p>-Absorciones intensas en UV cercano ($\lambda_{\max} \sim$ 300 nm)</p> <p>-RPE silencioso por acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones Cu^{2+}.</p>

Tabla 2. Tipos de centros de cobre. [13, 14, 15]

Activación de oxígeno por complejos mononucleares de cobre

Se ha centrado un gran esfuerzo en la comprensión de los mecanismos de activación de oxígeno de enzimas monooxigenasa con sitios mononucleares, ya sea que contengan o no como ligantes grupos hemo.[16, 17] Como fruto de dichos estudios se ha planteado una hipótesis mecanística general para la activación de oxígeno a través de metales:

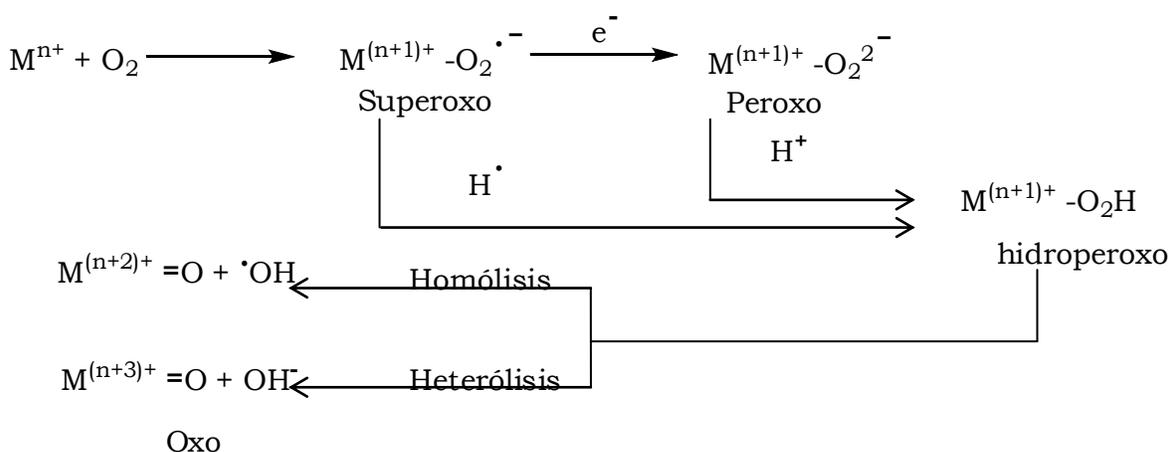


Figura 1. Activación de oxígeno a través de metales.[18]

Como se observa en la Fig. 1, el oxígeno se une a los centros metálicos de los sitios activos para formar el intermediario metal-superoxo, llevando de este modo el estado fundamental triplete cinéticamente inerte a un estado doblete más reactivo como es el anión superóxido $O_2^{\cdot -}$, lo cual resulta en la reacción directa con sustratos orgánicos (como singuletes en estado fundamental.[19] La Fig. 2 muestra el diagrama de orbitales moleculares para O_2). De esta manera, la especie generada metal-superoxo toma un electrón (formando un intermediario metal-peroxo) y un protón para formar un intermediario metal-hidroperoxo, el cual se somete a escisión O-O para permitir la formación de una

especie metal-oxo de alto estado de oxidación. Alternativamente, las especies metal-superoxo pueden abstraer un átomo de hidrógeno del sustrato para formar la especie de metal-hidroperoxo.

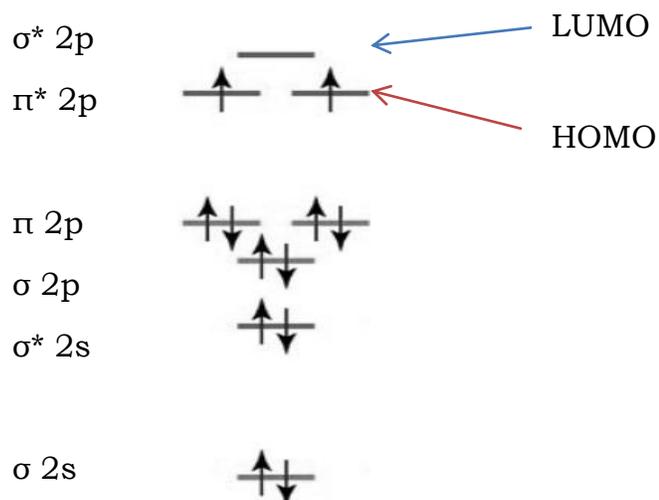


Figura 2. Diagrama de orbitales moleculares para el O_2 .

(HOMO = orbital molecular ocupado de más energía, LUMO = orbital molecular desocupado de menor energía. En otras especies moleculares tipo radicales libres medio llenos, el estado ocupado por el electrón desapareado se denomina SOMO = orbital molecular ocupado por un solo electrón)

Polisacárido monooxigenasas de cobre AA9, AA10, AA11. Hacia los biocombustibles

Con el paso de los años, el aumento en la demanda de energía y de la preocupación por la abundante emisión de gases de efecto invernadero durante su obtención ha hecho de vital importancia social encontrar formas eficientes para mejorar los métodos de uso para los recursos energéticos actuales, o desarrollar otros nuevos que sean económicos y sustentables. Dentro de los recursos energéticos alternativos se incluyen los biocombustibles de segunda generación, disponibles a partir de biomasa, la cual al día de hoy es abundante y renovable.^[20] Muchos biopolímeros como la celulosa, la quitina, la lignina y los almidones proporcionan fuentes potenciales de materia prima principal en la producción de combustibles.^[21]

Avances recientes han revelado nuevas clases de enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO's) con sitios activos mononucleares de cobre,^[22,23] incluyendo la familia de enzimas dependientes de cobre conocida como actividad auxiliar (AA) designadas AA9, (proveniente de los hongos *Thermoascus aurantiacus* o *Neurospora crassa*), AA10 (proveniente de bacterias como *Bacillus amyloliquefaciens* o *Enterococcus faecalis*) y AA11 (del hongo *Aspergillus oryzae*) (Fig. 3). Estas cuentan con un sitio de unión tipo 2 mononuclear de cobre conservado, con un conjunto de donaciones N₃ definido por dos imidazoles de histidina (una de las cuales es una histidina N-terminal con un grupo τ -N-metilado inusual), así como una amina perteneciente a uno de dichos residuos de histidina, en el motivo estructural conocido como el

'abrazo de histidina' (Fig. 4); como se puede apreciar, el ión de cobre se liga en una configuración en forma de T a los tres átomos de nitrógeno. Dichas enzimas generan la ruptura de biopolímeros a través de química oxidativa (celulosa por AA9 y AA10 y quitina por AA11).[24-26]

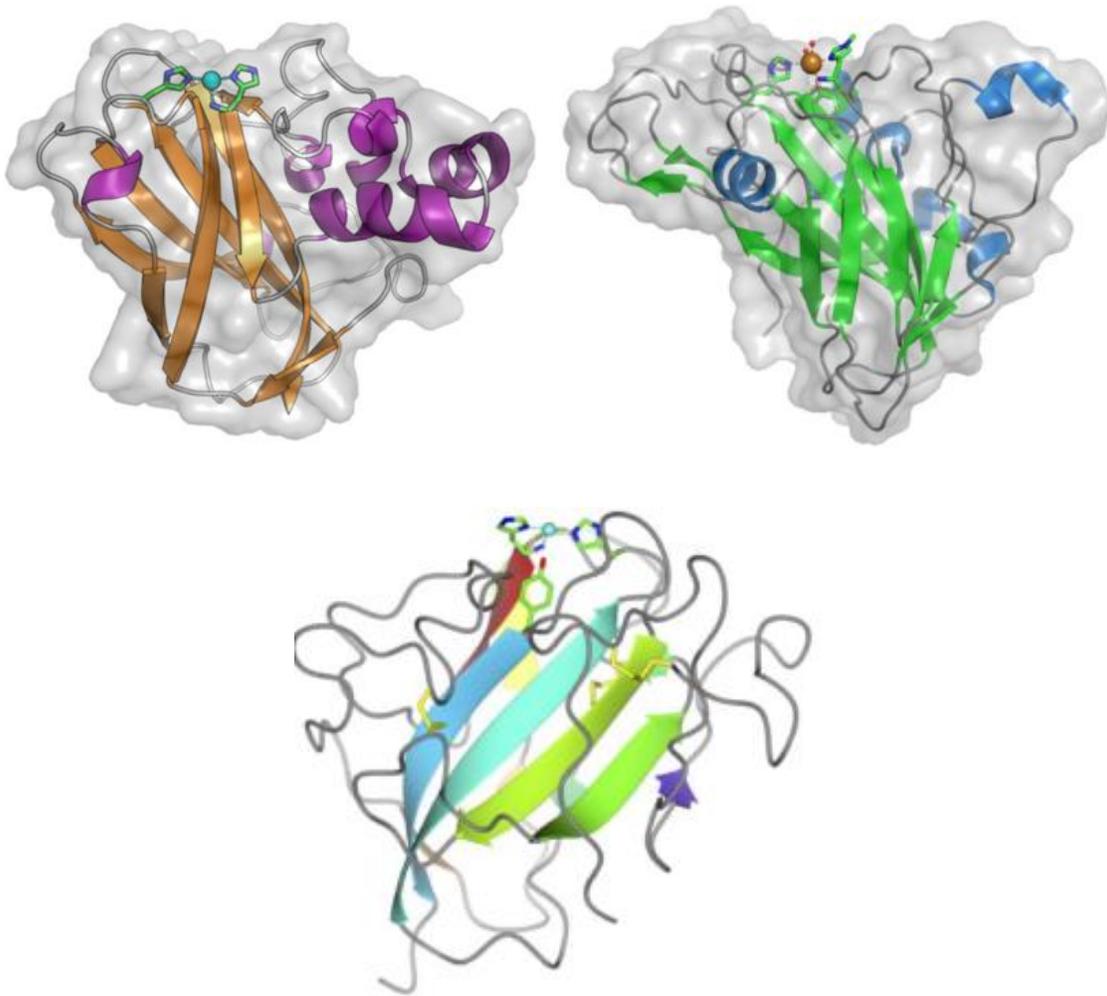


Figura 3. Estructura general de las enzimas: AA9 de *T. aurantiacus* (superior izquierda), AA10 de *B. amyloliquefaciens* (superior derecha), AA11 de *A. oryzae* (inferior).[24-26]

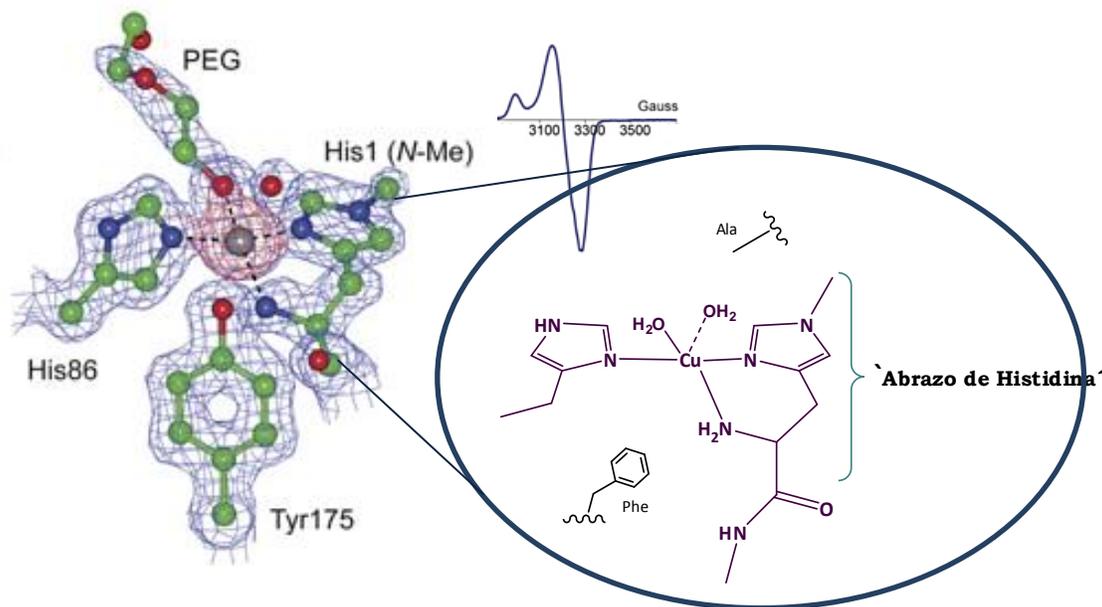


Figura 4. Estructura del sitio activo de AA9: Mapa de densidad electrónica de la enzima, espectro de EPR y abrazo de histidina con nitrógeno imidazólico metilado.[24]

Si bien se ha logrado la caracterización estructural y espectroscópica de las enzimas de cobre descritas, no se ha logrado establecer su forma de acción en la degradación de los polisacáridos recalcitrantes, aunque se sabe que escinden oxidativamente los enlaces glucosídicos en presencia de oxígeno molecular.

Beeson y colaboradores propusieron en 2011[23] una ruta para la escisión de celulosa para diferentes PMO's aisladas de *Neurospora crassa* (Fig. 5) tras la adición de O₂, para generar celodextrinas oxidadas (mezclas de compuestos con peso molecular mayor que el de los oligosacáridos) tras la incubación con celulosa y celobiosa deshidrogenasa, reportando que en el producto final es la 4 cetoaldosa. El mecanismo involucra la inserción del oxígeno molecular en los enlaces C-H adyacentes al enlace glucosídico, conduciendo a la eliminación de

la fracción de hidratos de carbono. Se describen dos clases de PMO's: unas que oxidan a C1, probablemente en la forma inicial de lactona, la cual posteriormente se hidroliza espontánea o enzimáticamente, para dar lugar a un ácido aldónico, y el segundo grupo de enzimas que generan productos oxidados en el extremo no reducido, formando de una 4-cetoaldosa, que podría resultar de la escisión oxidativa por el mismo mecanismo general propuesto para la oxidación a C1.

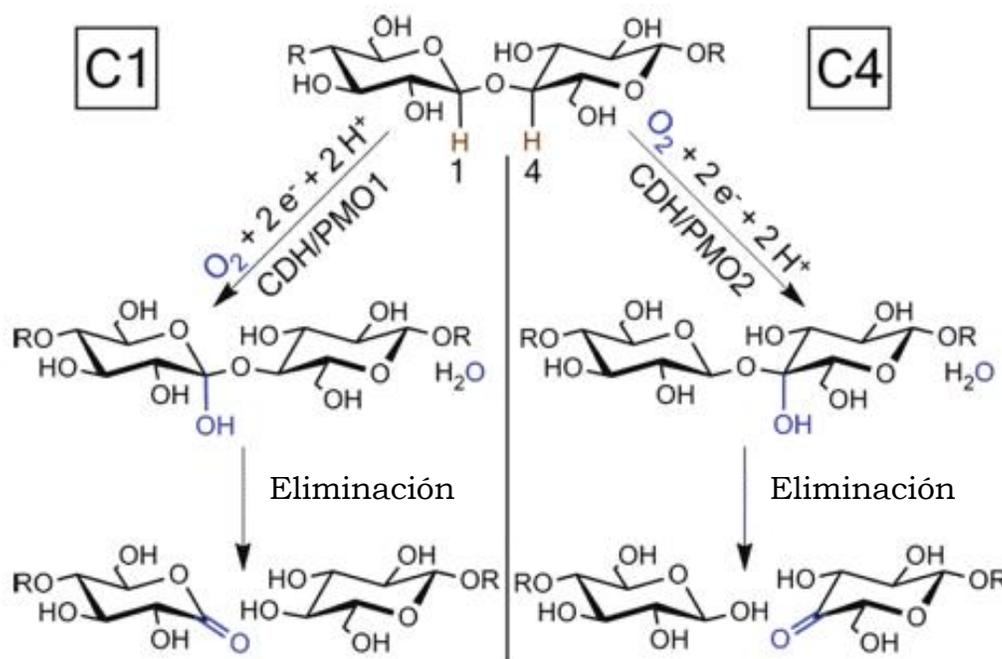


Figura 5. Ruta para la escisión oxidativa de celulosa por las PMO's.^[23]

Otro reporte del grupo de Quinlan y colaboradores,^[24] quienes trabajaron con *Thermoascus aurantiacus*, también sugiere oxidación en C1 y en el C6 terminal no reducido (Figura 6).

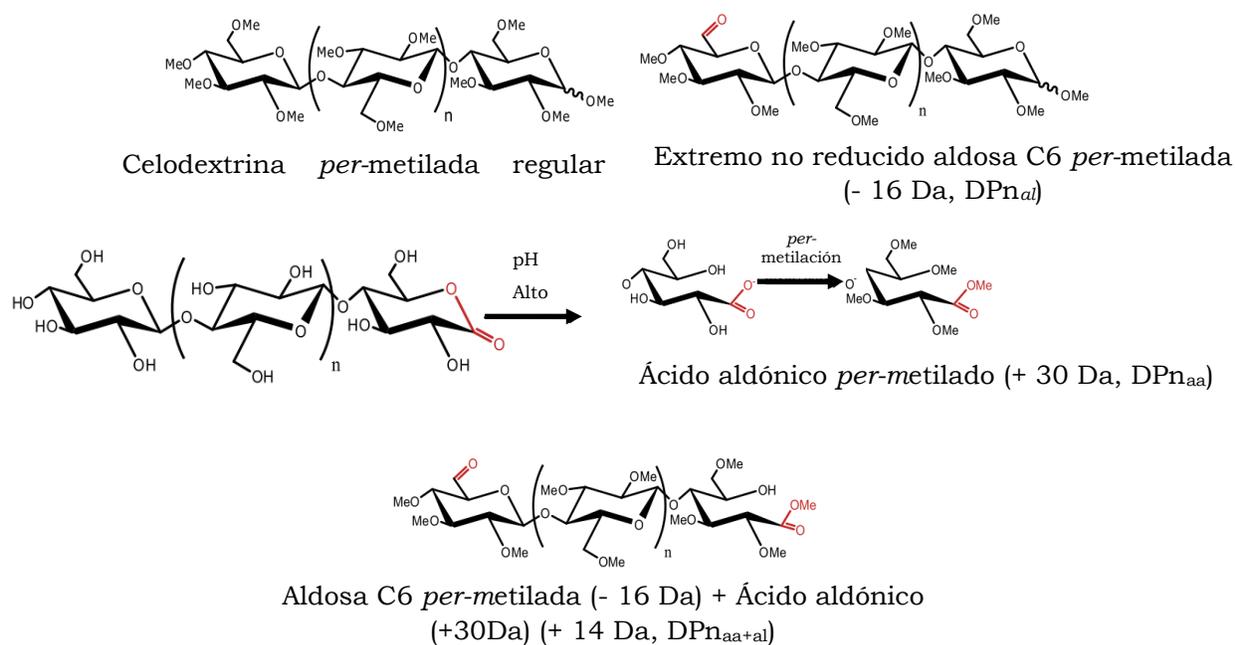


Figura 6. Propuesta degradación celulosa por PMO's.^[24]

Adicionalmente, el grupo encabezado por Phillips^[22] reportó que la celobiosa deshidrogenasa (CDH) incrementa la degradación de celulosa por acoplamiento de la oxidación de celobiosa a la activación reductiva de las PMO's dependientes de cobre que catalizan la inserción en los enlaces C-H adyacentes al enlace glucosídico. Se evidenció la formación de celodextrinas doblemente oxidadas, probablemente en C6, donde la hidroxilación podría dar lugar a la ruptura del enlace glucosídico via eliminación para formar un aldehído 4,5-insaturado. Se plantea que la oxidación en la posición 4 podría permitir la ruptura del enlace glucosídico vía el mismo mecanismo descrito para C1 descrito por Beeson. En concordancia con lo anteriormente expuesto, Phillips concluye que el posible mecanismo de acción de las polisacárido monooxigenasas requiere la transferencia de electrones de CDH para romper la celulosa de una forma

oxígeno-dependiente, donde el primer paso consiste en la reducción en un electrón de PMO-Cu(II) a PMO-Cu(I) por el grupo hemo de la CDH, seguida por la unión a oxígeno y la transferencia interna de electrones para formar el intermediario cobre superoxo. Posteriormente, tiene lugar la abstracción de hidrógeno por el cobre-superoxo en las posiciones 1 o 4 de un carbohidrato interno, generando un intermediario cobre-hidroperoxo y un sustrato radicalario. El segundo electrón de CDH facilita entonces la ruptura del enlace O-O liberando H₂O y un radical cobre-oxo que se acopla con el sustrato radicalario, hidroxilando así el polisacárido en las posiciones 1 o 4. El átomo de oxígeno adicional desestabiliza el enlace glucosídico, permitiendo la liberación del glucano adyacente y la formación de una lactona o una cetoaldosa (Fig. 7).

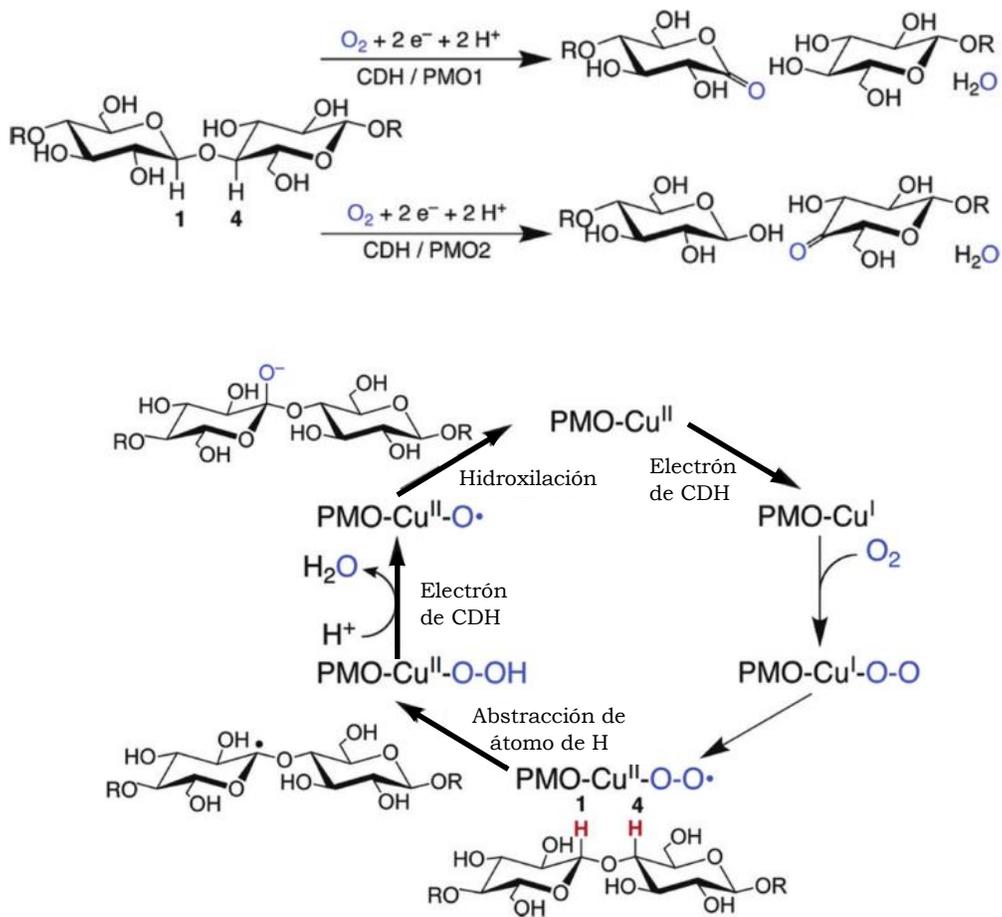


Figura 7. Propuesta degradaci3n celulosa por PMO's.[22]

Modelos biomiméticos y propuesta de ligante

Debido a la complejidad de las metalo-biomoléculas, así como a las dificultades ocasionalmente encontradas para su caracterización estructural, espectroscópica y electrónica, la química bioinorgánica se ha enfocado a la síntesis biomimética. Ésta se ha dirigido al diseño, síntesis y caracterización de compuestos inorgánicos inspirados en sitios activos de metaloenzimas, para así revelar las funciones de residuos específicos de aminoácidos.^[4] Como se mencionó anteriormente, las proteínas coordinan iones metálicos a través de átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre provenientes de ligantes biológicos endógenos, tabla 3.

Los ligantes amido, amidato, amino, carbonilo y carboxilato se hallan localizados en el C- o N-terminal de cadenas polipeptídicas, dentro de la cadena misma (excepto para amino y carboxilato), así como en cadenas laterales. Los ligantes restantes se encuentran exclusivamente en las cadenas laterales.

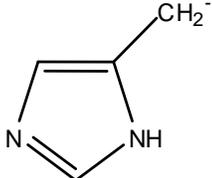
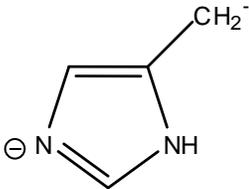
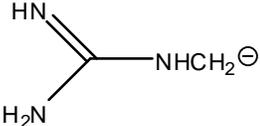
Grupo coordinante		Ejemplos	pKa
<i>Donadores N</i>			
Amino	Cadena lateral	H ₂ N·Lys	9-11
	N-Terminal	H ₂ N·X(cualquier residuo)	
Amido	Cadena principal (-NHC(O)-)	HN·X(cualquier residuo)	
	Cadena lateral (-C(O)NH ₂)	HN·Asn, HN·Gln	≥13
Amidato	Cadena principal (-N-C(O)-)	-N·X(cualquier residuo)	
	Cadena lateral (-C(O)NH)	-N·Asn, -N·Gln	
Imidazolil		N·His	
Imidazolato		-N·His	6-7
Guanidina		H ₂ N·Arg	>12

Tabla 3. Ligantes biológicos endógenos.^[27,28]

Las ventajas de los modelos moleculares biomiméticos sobre las metaloenzimas propiamente son que los primeros pueden ser diseñados, empleando una gran

variedad de elementos metálicos catalíticos, ligantes y disolventes, en rangos modestos de temperatura y para una gran variedad de procesos químicos.

En este contexto, una característica especial es el uso de las segunda y tercera series de metales de transición, las cuales son naturalmente más reactivas a sustratos tales como H_2 , N_2 , compuestos de carbono aromáticos y alifáticos; para reacciones con O_2 , los metales de la primera serie de transición son más apropiados. El uso de ligantes quelato puede hacer que el ión metálico esté en condiciones electrónicas y geométricas para ayudar a la catálisis, además de proveer estabilidad a los complejos. Los átomos donadores de los ligantes pueden ser O, N o S como en las enzimas, o elementos como P o C que no se presentan en enzimas.^[29--31]

Los heterociclos que contienen nitrógeno representan una clase importante de compuestos debido a sus propiedades σ -donadoras y π -aceptores hacia metales de transición, las cuales pueden ser afinadas con base en la identidad del heterociclo. Por ejemplo, el heterociclo imidazol es ubicuo en la naturaleza para la unión del metal de transición en los sitios activos de las metaloenzimas y confiere a los centros metálicos propiedades específicas. En este contexto, las oxidaciones químicas y bioquímicas promovidas por el par redox Cu^{2+}/Cu^+ son objeto de una intensa investigación debido a su participación en la oxidación selectiva de una amplia gama de sustratos orgánicos.^[32-34] En el caso de metaloenzimas dependientes de cobre, el estudio de su notable selectividad se ha visto favorecido por el desarrollo de modelos sintéticos, los cuales facilitan

la comprensión de los factores que rigen los detalles íntimos de la activación de dioxígeno y la posterior oxidación de sustratos. Aunque el imidazol pareciera ser la opción ideal de heterociclo nitrogenado para el desarrollo de complejos de modelo, la mayoría de los ejemplos incorporan grupos pirazolilo,^[35-37] piridilo^[34,38,39] y amino,^[32-34,40,41] quizás debido a su accesibilidad sintética.

En este contexto, hemos abarcado en el presente trabajo bencimidazoles 2-sustituídos para ensamblar ligantes quelantes para complejos de $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, basado en el valor de $\text{p}K_a$ del 2-metilbencimidazol protonado (6.10),^[42] así como su constante de asociación con Cu^{2+} ($\log K_{as}$ 4.43),^[43] en relación con los valores reportados para la histidina ($\text{p}K_a$ 6.17, $\log K_{as}$ no es comparable debido a la formación de quelato con histidina).^[44] Informes sobre ligantes quelantes de complejos de cobre a base de bencimidazoles siguen siendo relativamente escasos,^[45-49] con la notable excepción de los ligantes binucleantes desarrollados por Casella, Costas y colaboradores (Fig. 8).^[50-52]

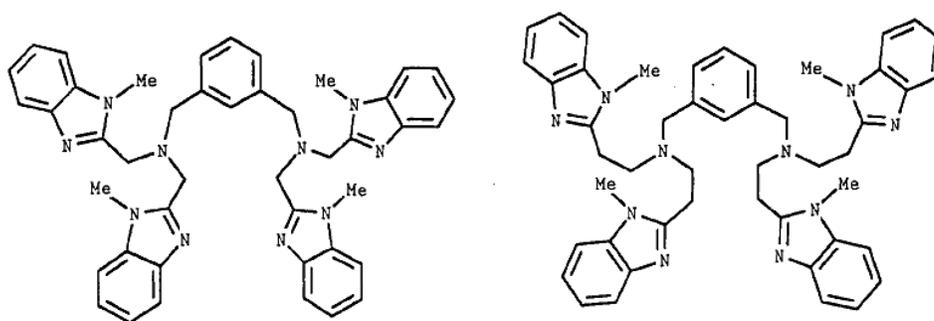


Figura 8. Ligantes binucleantes desarrollados por Casella, Costas y colaboradores.^[50-52]

Sin embargo, la química de los ligantes basados en bencimidazol parece estar madurando a un ritmo rápido, como se evidencia en el creciente número de informes que aprovechan sus propiedades como N-donadores versátiles.^[53-58]

La contribución de nuestro grupo de investigación a este campo, ha implicado el desarrollo de sistemas de cobre de inspiración biológica con bencimidazoles 2-sustituídos como plataformas para ligantes tripodales tetradentados.^[59-61] La bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina **2BB** en la Figura 9, representa un candidato viable para estudios espectroscópicos y estructurales de complejos de cobre como una primera aproximación para modelar sistemas inspirados en los sitios activos mononucleares de PMO's. Nuestro interés fue estimulado además por el átomo de nitrógeno metilado en uno de los imidazoles de histidina,^[24] ya que **2BB** consiste de bencimidazoles metilados.

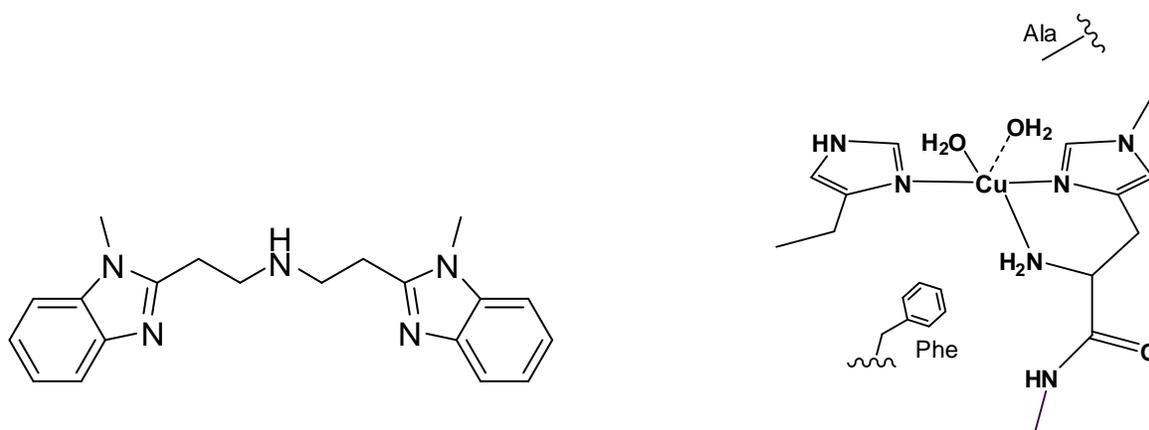


Figura 9. Ligante empleado bis[(1-metil-2-bencimidazolilo)etil]amina (**2BB**) y sitio activo de las enzimas AA9-AA11.^[24,62,63]

II. Hipótesis

Los ligantes bencimidazólicos N-metilados como donadores de nitrógeno brindarán características electrónicas y estructurales, semejantes a las de los sitios activos de las enzimas monooxigenasas AA9, AA10 y AA11, a los complejos de cobre correspondientes. Estudios espectroscópicos permitirán identificar especies reactivas formadas por la activación de O₂ que proporcionarán información sobre la capacidad de los complejos para degradar a la celobiosa como modelo del polisacárido celulosa.

III. Objetivos

Objetivo General

Sintetizar y caracterizar complejos de coordinación de Cu con donadores bencimidazólicos inspirados en los sitios activos de las monooxigenasas AA9, AA10 y AA11 en sus distintos estados de oxidación (I y II). Estudiar su reactividad frente a oxígeno y obtener de esta forma información sobre el modo de degradación de los polisacáridos por parte de las metaloenzimas antes mencionadas, para proponer un mecanismo de reacción congruente con lo reportado para los sistemas biológicos.

Objetivos Específicos

- Diseñar, sintetizar y caracterizar ligantes que contengan en su esqueleto átomos donadores N de grupos bencimidazol con disposición similar a los sitios activos de AA9, AA10 y AA11.
- Sintetizar y caracterizar complejos de cobre en sus dos estados de oxidación más comunes Cu^+ y Cu^{2+} con el ligante obtenido.
- Estudiar el efecto del ligante sobre el potencial de media onda del par redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, así como la reactividad del complejo Cu-O₂ frente a celobiosa como modelo del polisacárido celulosa.

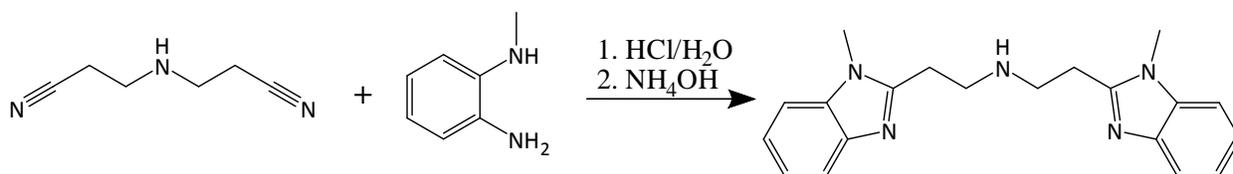
IV. Resultados y discusión

4.1. Síntesis y caracterización

Tal como se mencionó en los antecedentes, las enzimas líticas de polisacáridos AA9-AA11 poseen un sitio activo mononuclear de cobre tipo 2 con un conjunto de donadores N₃, definido por el motivo estructural de 'abrazo de histidina' proveniente de una histidina N-terminal que se enlaza a través del imidazol y el grupo amino, así como la coordinación adicional a otro residuo de histidina. Partiendo de esta evidencia estructural, se emprendió la síntesis de un ligante que tuviera la capacidad de ofrecer un ambiente de coordinación semejante al de dichas metaloenzimas: **2BB**.

4.1.1. Ligante

El procedimiento desarrollado previamente en el grupo de investigación para la síntesis del ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina **2BB** (**Esquema 1**), generó un rendimiento aceptable (60%).



Esquema 1. Esquema general de síntesis ligante **2BB**.

Las bandas principales obtenidas a través de espectroscopía de infrarrojo en cm⁻¹ que caracterizaron el ligante fueron: C=C-H fuera del plano aromáticos en 744(f) y 1438(m), bencimidazol en 1140(m) y 1199(f), Ar-NH de bencimidazol 1283(m) y 1332(m), estiramiento C=N en 1613.67(d), metilenos C-H en 2918-2948(d), banda C-H aromáticos en 3018-3051(d). Para el grupo N-H se asigna

como vibración de tensión a la banda en 3263 (d), y tentativamente la banda en 1514 como flexión N-H.

En el espectro de RMN ^1H , ilustración 1, se observan las señales características en $\delta(\text{ppm})$ de los sistemas aromáticos del bencimidazol en 7.53 y 7.26, así mismo se observa una señal ancha en 4.85 que podría corresponder al grupo NH, mientras que los grupos metileno se ven en desplazamientos de 3.29 (CH_2N) y 3.09 (CH_2C). El metilo se observó a un desplazamiento de 3.68. En el espectro de RMN ^{13}C , anexo IV, se observan las señales características en $\delta(\text{ppm})$ de los sistemas carbonos del bencimidazol en 154, 142, 136, 122, 122, 119 y 109 ppm; así mismo se observan señales de carbonos alifáticos a desplazamientos de 47, 30 y 26, asignadas como se muestra en la figura 10:

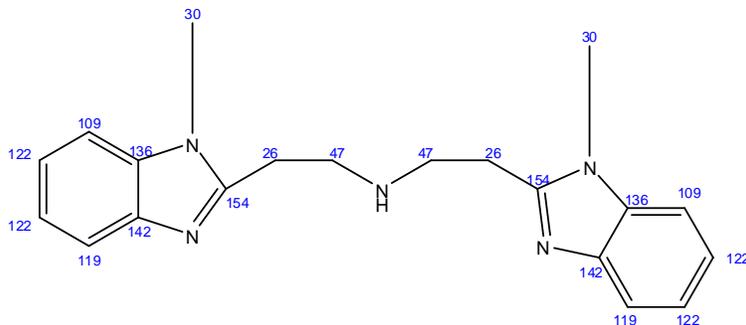


Fig. 10. Asignación de desplazamientos químicos para **2BB** con base a espectro ^{13}C (Anexo IV).

El análisis elemental por combustión encontrado fue (%): C, 59,57; H, 5,88; N, 16,39, correspondiente al compuesto $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_5$ identificando al ligante como la especie **2BB**.2HCl, debido a que la neutralización no se llevó a cabo cuantitativamente.

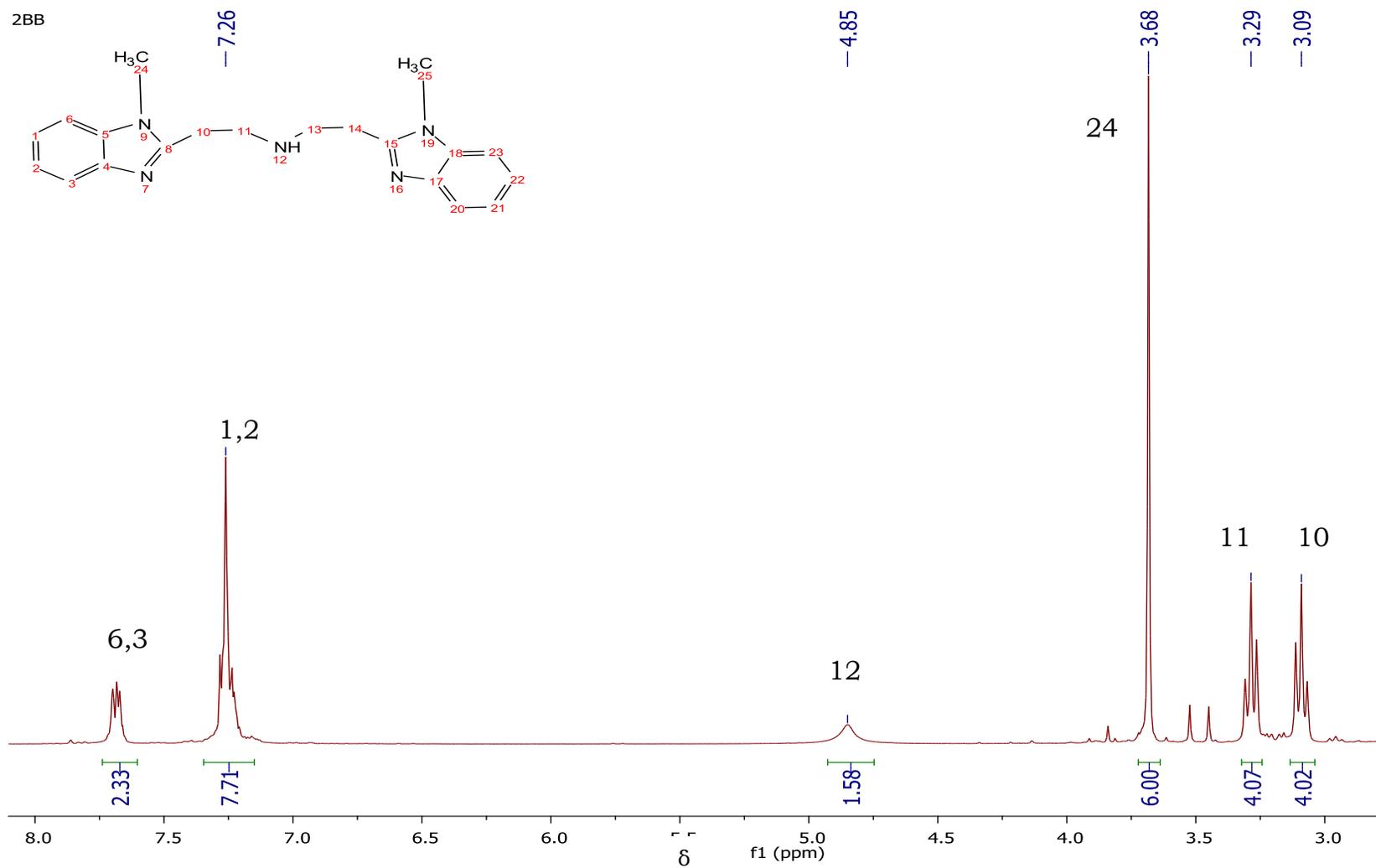
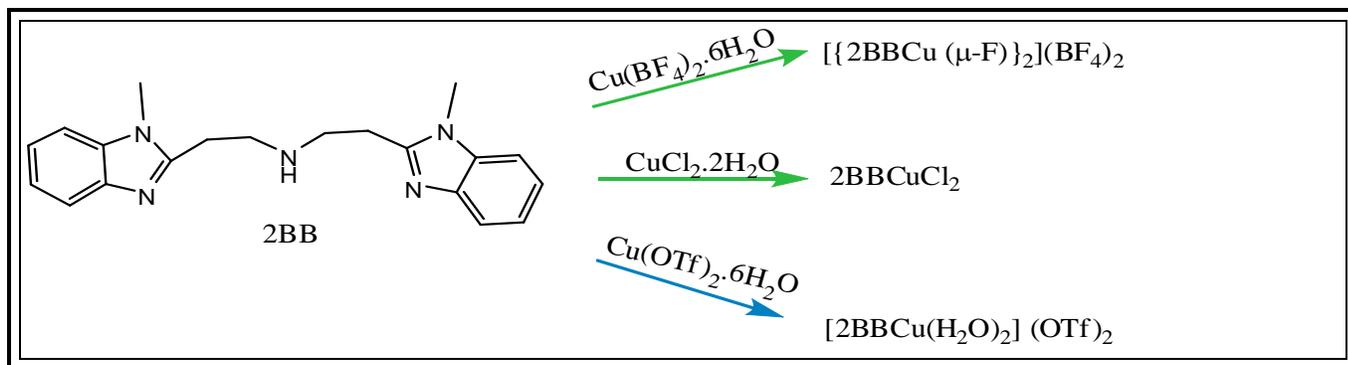


Ilustración 1. Espectro RMN ^1H para el ligante **2BB** en CDCl_3 a una frecuencia de 400 MHz.

4.1.2. Complejos cúpricos

El método general para la preparación de los complejos cúpricos a partir del ligante **2BB** implicó la reacción con la sal de Cu^{2+} apropiada en cantidades equimolares a reflujo de metanol:



Esquema 2. Esquema general de síntesis complejos cúpricos.

El subsiguiente aislamiento de productos micro-cristalinos en las reacciones con $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y $\text{Cu}(\text{OTf})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ permitió la caracterización espectroscópica de los complejos correspondientes. Los espectros de IR evidencian la presencia de grupos bencimidazol debido a la banda de estiramiento $\text{C}=\text{N}$ alrededor de 1615 cm^{-1} , mientras que el pico ancho alrededor de 3100 cm^{-1} corresponde al estiramiento N-H de la amina secundaria en el **2BB** coordinado.

Adicionalmente, se llevó a cabo caracterización por espectrometría de masas por Ionización por Electrospray (ESI) o Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB). Para el complejo verde obtenido de la reacción entre **2BB** y $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,

nombrado $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})\}_2](\text{BF}_4)_2$, ESI fue la única técnica disponible debido a su baja solubilidad en disolventes orgánicos comunes; disoluciones acuosas revelaron la presencia de un pico en $m/z = 396$ asignado a la especie reducida $[2\text{BBCu}]^+$ en la ilustración 2, una ocurrencia común cuando se emplean ligantes quelantes que contienen bencimidazol.[65-67]

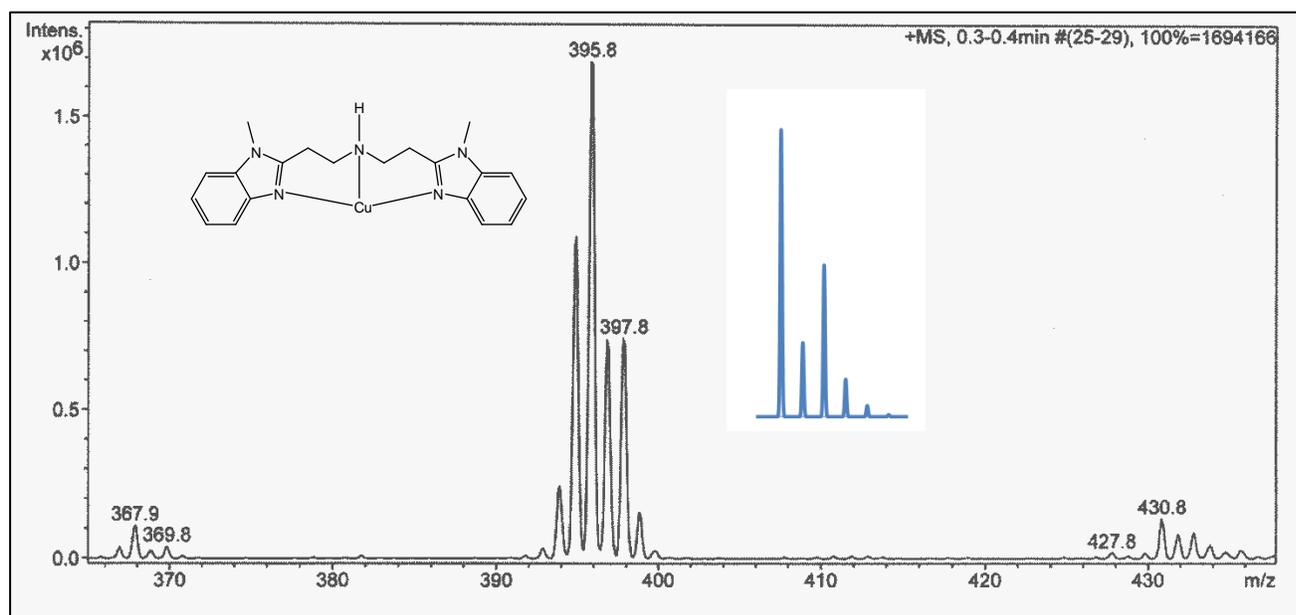


Ilustración 2. Espectro de masas ESI de $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})\}_2](\text{BF}_4)_2$ y patrón isotópico simulado (azul) de la especie reducida $[2\text{BBCu}]^+$

En contraste, ambos productos de las reacciones entre **2BB** y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Cu}(\text{OTf})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, que consistieron en microcristales verdes y azules de $[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ y 2BBCuCl_2 respectivamente, fueron solubles en una variedad de disolventes orgánicos; estos incluyeron etanol, metanol, y acetonitrilo, lo que los hizo susceptibles para el análisis por la técnica FAB en espectrometría de masas: en el primer caso, el pico en $m/z = 396$, coherente

con la especie reducida $[2BBCu]^+$ también se observó. En el último caso se detectó un pico en $m/z = 545$, el cual fue asignado al complejo catiónico cúprico $[2BBCu(OTf)]^+$, ilustración 3.

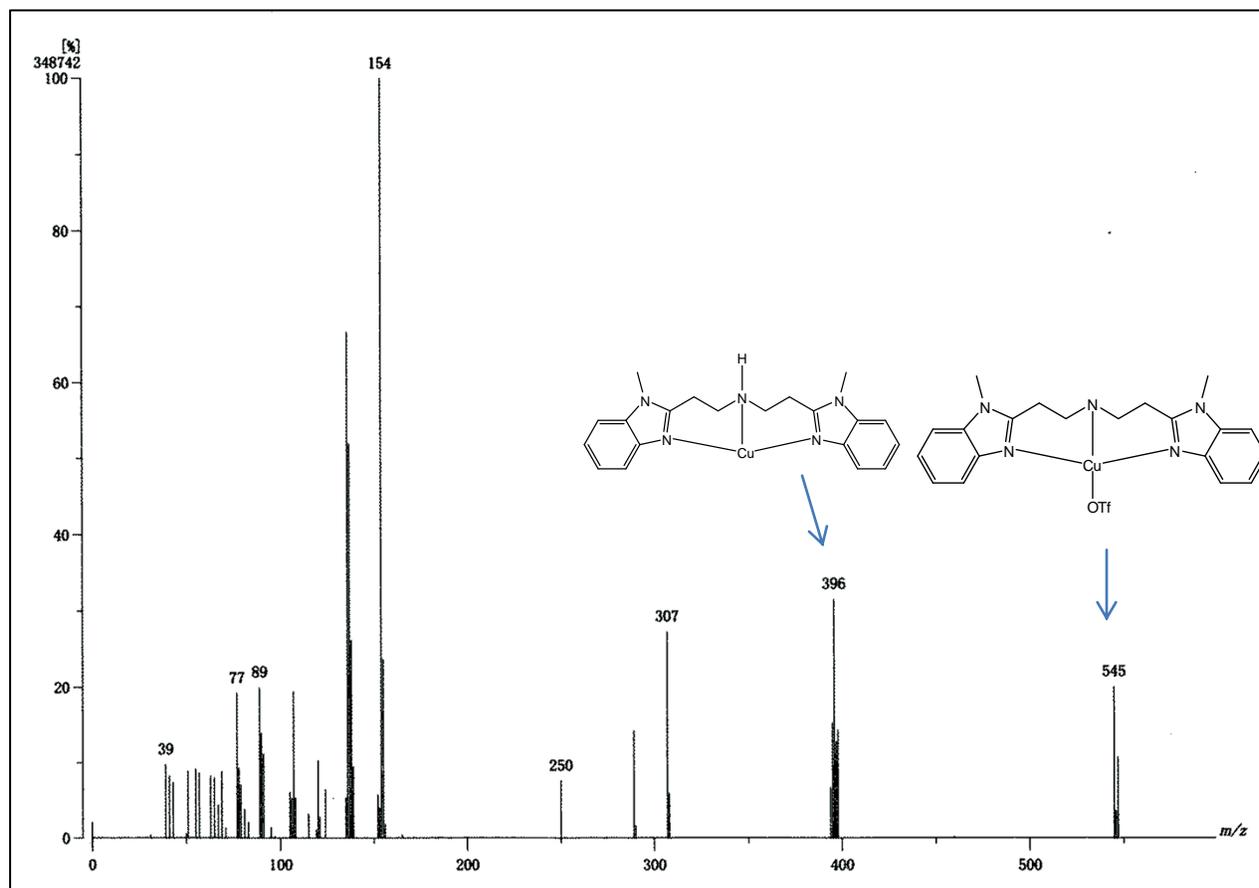


Ilustración 3. Espectro de masas FAB de $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$.

Por otra parte, para el complejo $\{[2BBCu(\mu-F)]_2\}(BF_4)$ el espectro de UV-vis obtenido en metanol (ver anexo V), evidenció la presencia de cinco bandas principales: la primera correspondiente a transiciones intraligante del bencimidazol en $\lambda = 245$ nm, cuyo coeficiente de absorptividad molar es de $\epsilon = 14530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; la segunda y tercera respectivamente en $\lambda = 272$ nm con $\epsilon =$

15730 M⁻¹cm⁻¹ y $\lambda = 279$ nm con $\varepsilon = 15490$ M⁻¹cm⁻¹, correspondientes ya sea al bencimidazol o a la transferencia de carga bencimidazol→Cu²⁺, y otras dos bandas asignadas a transiciones *d-d* del cobre, en $\lambda = 720$ nm con $\varepsilon = 255$ M⁻¹cm⁻¹ y $\lambda = 952$ nm con $\varepsilon = 123$ M⁻¹cm⁻¹. Un comportamiento semejante se evidenció en los espectros UV-vis de los complejos **2BBCuCl₂** y **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂**. A manera de cuadro comparativo, en la tabla 4 se muestra la asignación de bandas para los tres complejos cúpricos:

Complejo	Banda		
	Bencimidazol	Transferencia de carga N→Cu ²⁺	Transiciones <i>d-d</i>
[{2BBCu (μ-F)}₂](BF₄)	$\lambda = 245$ con $\varepsilon = 14530$ M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda = 272$ con $\varepsilon = 15730$ M ⁻¹ cm ⁻¹ $\lambda = 279$ con $\varepsilon = 15490$ M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda = 720$ con $\varepsilon = 255$ M ⁻¹ cm ⁻¹ $\lambda = 952$ con $\varepsilon = 123$ M ⁻¹ cm ⁻¹
2BBCuCl₂	$\lambda = 245$ con $\varepsilon = 39900$ M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda = 272$ con $\varepsilon = 43450$ M ⁻¹ cm ⁻¹ $\lambda = 279$ con $\varepsilon =$ 43340 M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda = 723$ con $\varepsilon = 157$ M ⁻¹ cm ⁻¹ $\lambda = 960$ con $\varepsilon = 124$ M ⁻¹ cm ⁻¹
[2BBCu(H₂O)₂](OTf)	$\lambda = 247$ con $\varepsilon = 50500$ M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda = 272$ con $\varepsilon = 55940$ M ⁻¹ cm ⁻¹ $\lambda = 279$ con $\varepsilon = 55280$ M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda = 722$ con $\varepsilon = 82$ M ⁻¹ cm ⁻¹ $\lambda = 966$ con $\varepsilon = 62$ M ⁻¹ cm ⁻¹

Tabla 4. Comparación de bandas UV-vis complejos cúpricos obtenidos.

Además se llevó a cabo tanto en el estado sólido como en disolución la caracterización por espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) en frecuencia de banda X (9.4 GHz). Las muestras poco solubles de $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2\}(\text{BF}_4)_2]$ se analizaron inicialmente en el estado sólido, ya que las disoluciones acuosas no proporcionaron una señal adecuada. Las muestras sólidas dieron lugar a señales muy complejas, incluso a 77 K, lo cual atribuimos tentativamente a las interacciones magnéticas entre centros paramagnéticos de Cu^{2+} , consistente con especies diméricas que probablemente tiene acoplamiento magnético adicional al anión puente de ^{19}F con $S = \frac{1}{2}$, sin embargo, la señal axial con pobre resolución observada en disolución metanólica a 77 K es característica de centros aislados de Cu^{2+} en un entorno piramidal cuadrado distorsionado (Fig. 11).

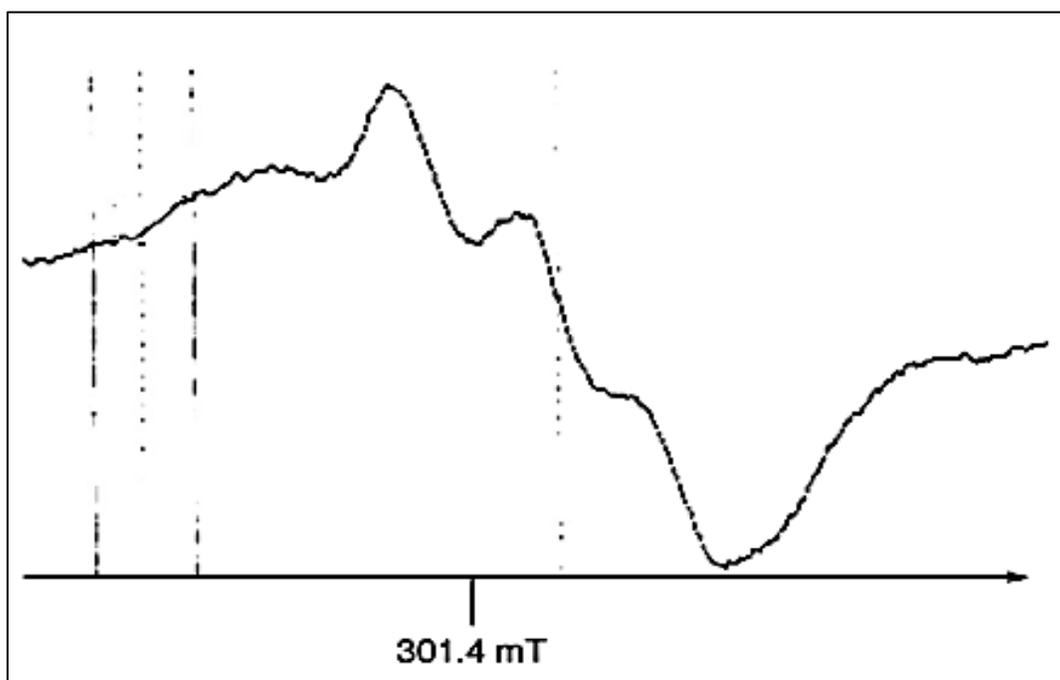


Fig. 11. Espectros RPE de $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2\}(\text{BF}_4)_2]$ en metanol a 77 K.

En contraste, los espectros de RPE, ya sea en estado sólido o en disoluciones de acetonitrilo congelado de **2BBCuCl₂** y **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂**, se caracterizan por tener señales axiales prácticamente idénticas consistentes con centros de Cu²⁺ aislados en entornos de coordinación bipiramidales trigonales ($g_{\perp} > g_{\parallel}$, estado fundamental dz^2), basado en los valores determinados de $g_{\parallel} = 2.021$ y $g_{\perp} = 2.157$ (Fig. 12); la resolución de los espectros no nos permiten determinar las constantes de acoplamiento hiperfino.

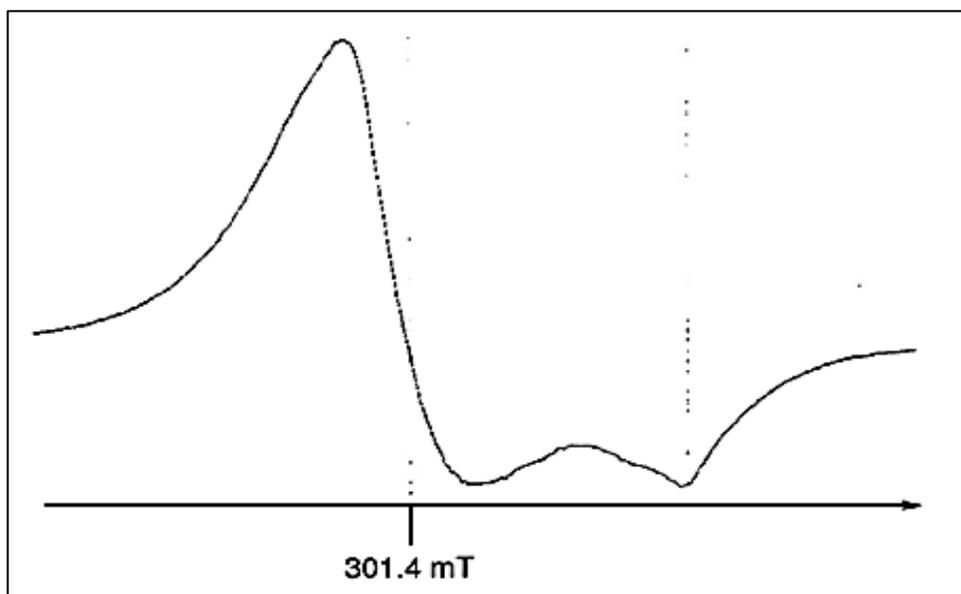


Fig. 12. Espectros de RPE de **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂** en disolución de acetonitrilo.

Los sitios activos de AA10 y AA11 se han descrito como poseedores de centros mononucleares Cu²⁺ en un entorno axial distorsionado con carácter significativo dx^2-y^2 SOMO basado en sus espectros de RPE.^[25,26] Mientras que los espectros de **2BBCuCl₂** y **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂** difieren de los determinados

para las metaloenzimas, la presencia del fluoruro más fuertemente coordinado $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2\}(\text{BF}_4)_2]$ parece favorecer una geometría piramidal de base cuadrada en disolución, que se asemeja más a las características de RPE de AA10 y AA11.

4.1.2.1 Estructuras en estado sólido

Para establecer de forma inequívoca la identidad de todos los complejos cúpricos, sus estructuras en estado sólido se determinaron por cristalografía de rayos X (Tabla 1 de Anexos). Monocristales de $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2\}(\text{BF}_4)_2]$ se obtuvieron por evaporación lenta de una disolución acuosa durante un período de dos semanas en el grupo espacial monoclinico $P2_1/n$. La naturaleza dimérica de $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2\}(\text{BF}_4)_2]$ se confirmó de este modo, explicando su baja solubilidad (Fig. 13).

La estructura de dicobre se encuentra puenteada por ligantes fluoruro, probablemente derivados de los contraiones tetrafluoroborato en la sal inicial de Cu^{2+} . Los aniones BF_4^- están desordenados en dos posiciones con factores ocupacionales de 0.58 y 0.42; el átomo de hidrógeno de la amina central se ubicó en el mapa de densidad electrónica, y se refinó con una distancia restringida de 0.90 Å. **2BB** actúa como un ligante tridentado definiendo una forma de T alrededor de los centros de cobre, similar al conjunto de donadores N_3 proporcionado por las proteínas en el sitio activo de varias PMO's. Los bencimidazoles N-donadores están en posiciones *trans* uno respecto al otro, y

cis con respecto a la amina central. Una primera inspección de la geometría general de coordinación alrededor de los iones Cu(II) revela que está cerca de ser una pirámide de base cuadrada (Fig. 13).

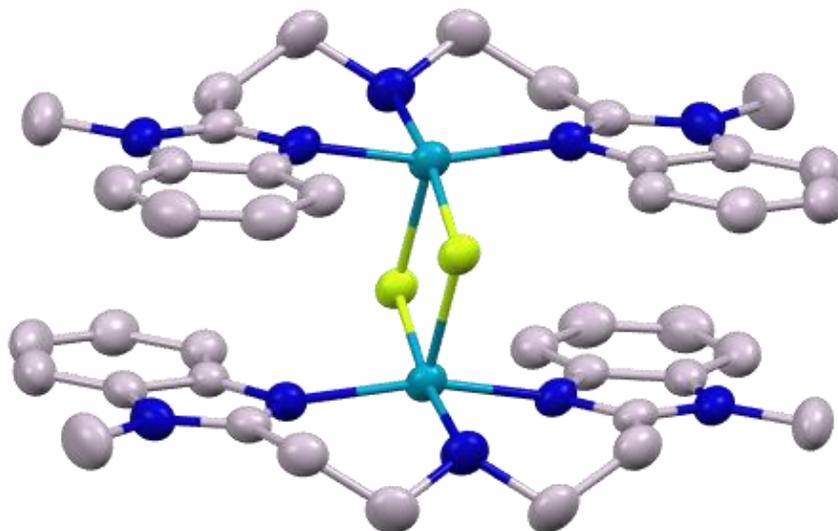


Fig. 13. Diagrama de Mercury de $[\{2BBCu(\mu-F)\}_2](BF_4)_2$ al 50% de probabilidad; átomos de hidrógeno y aniones tetrafluoroborato se omiten para mayor claridad. Código de colores: turquesa, cobre; gris, carbono; azul, nitrógeno; limón, flúor.

La determinación del grado de desviación de una geometría piramidal de base cuadrada ideal implica los ángulos entre ligantes *trans* en el plano basal, definidos como α y β , para calcular un valor de $\tau = 0.08$ ($\tau = 0$ para una pirámide de base cuadrada idealizada, $\tau = 1$ para un bipirámide trigonal).^[64] Curiosamente, la amina secundaria N13 y los donadores F5 *trans* se encuentran ligeramente por encima del plano basal (Fig. 14), mientras que en la mayoría de los casos todos los donadores basales están situados debajo de

dicho plano. Esto resulta en una descripción alternativa para la geometría de coordinación alrededor de los iones Cu^{2+} iones como tetraédrica distorsionada monoocluida.[65]

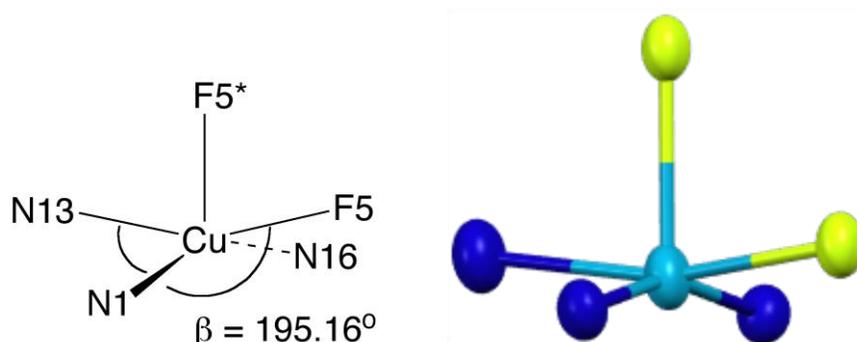


Fig. 14. Representación esquemática de la geometría de coordinación alrededor del centros de Cu en $[\{2\text{BBCu}(\mu\text{-F})\}_2](\text{BF}_4)_2$.

Se obtuvieron cristales de calidad de rayos X de 2BBCuCl_2 y $[\text{2BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ a partir de disoluciones metanólicas concentradas, en el primer caso en forma de prismas verdes en el grupo espacial ortorrómbico $Pnma$, y en el último en forma de cristales de color azul en el grupo espacial monoclinico $P2_1/n$. El primer complejo consta de una especie mononuclear con una molécula de H_2O desordenada en la celda unitaria; el átomo de oxígeno se encuentra en una posición especial, desordenada sobre dos posiciones y se refinó con factores de ocupación 0.52 y 0.48 (Fig. 15).

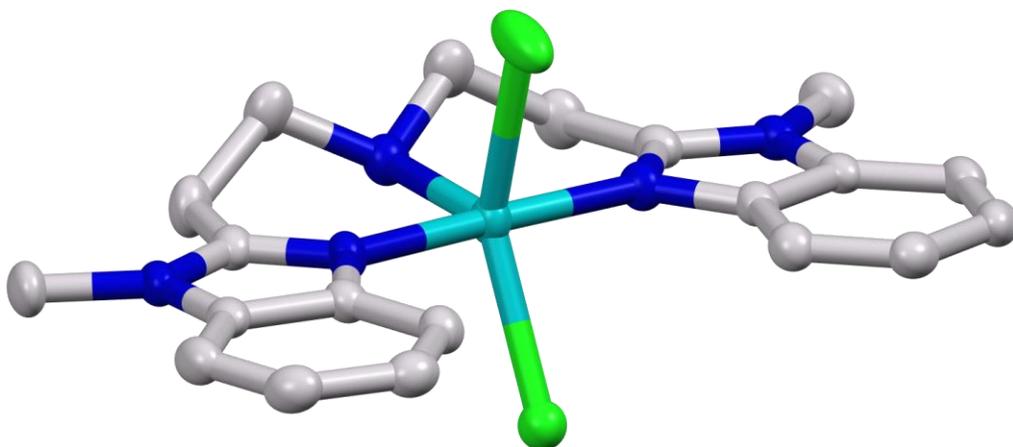


Fig. 15. Diagrama de Mercury de **2BBCuCl₂** al 50% de probabilidad; átomos de hidrógeno y una molécula de H₂O se omiten para mayor claridad. Verde: cloro.

Según lo establecido en disolución congelada mediante espectroscopia RPE, el ión Cu²⁺ se encuentra en un ambiente de coordinación de bipiramidal trigonal con los donadores N-benzimidazólicos en las posiciones axiales con un ángulo N1-Cu1-N1* de 175.44 (16)°, y la amina central y los dos cloruros definiendo el plano trigonal, con ángulos que van desde 105° a 138° (Tabla 2 Anexos). En general, la geometría de coordinación alrededor del ión cúprico en el análogo de triflato es muy similar, pero los ligantes cloruro se sustituyen por las moléculas de agua debido a la naturaleza débilmente coordinante de los contraiones en la estructura de **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂** (Fig. 16).

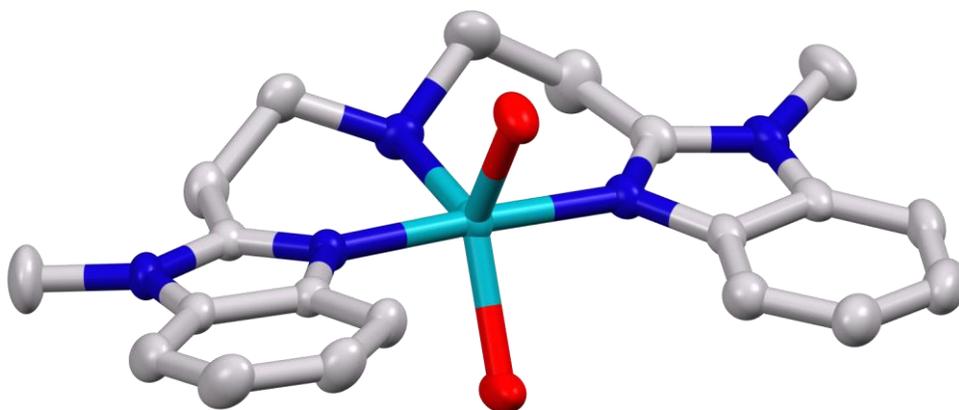


Fig. 16. Diagrama de Mercury $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ al 50% de probabilidad; átomos de hidrógeno, con ocupación menor, y aniones triflato se omiten para mayor claridad. Rojo: oxígeno.

El fragmento CH_2NH de la amina central está desordenado sobre dos posiciones, que se modelaron con 62% y 48% de ocupación. Los átomos de hidrógeno unidos a O y N- se localizaron en el mapa de Fourier, y se refinaron con distancias restringidas de 0.85 y 0.90 Å, respectivamente. Los ángulos N1-Cu1-N11 entre los donadores bencimidazólicos apicales es de $175.54(9)^\circ$, mientras que los ángulos de enlace alrededor del plano trigonal definidos por O7, O8 y N2 varían de 117° a 123° (Tabla 2 de Anexos).

En las estructuras de estado sólido determinadas para todos los complejos cúpricos con **2BB**, las longitudes de enlace Cu-N a los donadores bencimidazol se mantienen relativamente constantes, con un valor promedio de 1.99 Å, aunque los más cortos en las series corresponden a 1.958(2) Å en $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ debido a consideraciones electrostáticas (es el único complejo catiónico); la distancia media Cu-N a la amina central es de 2.11 Å.

A pesar del hecho de que la geometría de coordinación en **2BBCuCl₂** y **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂** es bipiramidal trigonal y no tetragonal como se describe para los sitios activos de AA9-AA11,^[24-26] la geometría en forma de T impuesta por el ligante **2BB** es muy similar en términos de los parámetros métricos (Tabla 5). Por otra parte, el mismo modo tricoordinado es observado incluso en la forma reducida de AA10,^[25] con distancias Cu-N prácticamente idénticas de 2.0 y 2.3 Å para el imidazol y el átomo de nitrógeno de la amina, respectivamente.

PARÁMETRO	COMPLEJOS 2BB-Cu ²⁺	AA9-AA11
Longitud de enlace Cu-N a los donadores bencimidazol	1.99 Å	La longitud media de enlace Cu-N y los imidazoles de Histidina es de 2.0 Å
	En triflato 1.958(2) Å, debido a consideraciones electrostáticas	
Distancia media Cu-N a la amina central	2.11 Å	Longitud de enlace Cu-N a la amina primaria 2.3 Å
Ángulo <i>trans</i> entre N de imidazol y los centros de Cu	170°	Cerca de 165°
Ángulo entre los <i>cis</i> -N (imidazol)-Cu-N (donadores amina)	92°	Alrededor de 97°

Tabla 5. Comparación de parámetros métricos de los sitios activos con respecto a los complejos cúpricos obtenidos.

4.1.3. Complejo cuproso

El complejo de cobre (I) se sintetizó con el ligante **2BB** a partir de la sal CuCl, siguiendo la metodología descrita en la parte experimental del presente reporte, para trabajar con muestras sensibles al aire. Una vez obtenido el complejo nombrado como **[2BBCuCl](CH₃CN)₃**, que consistió de un sólido amarillo-café con punto de fusión 150-152°C, parcialmente soluble en THF y CH₃CN, soluble en CH₂Cl₂ y C₂H₂Cl₄, se procedió a caracterizar. El espectro de UV-vis obtenido en THF (ver anexo V), evidenció la presencia de cinco bandas principales, las cuales se asignaron conforme se indica en la tabla 6:

Complejo	Banda
	Transferencia intraligante L→L (Bencimidazol)
[2BBCuCl](CH₃CN)₃	$\lambda = 274$ con $\varepsilon = 7952 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
	$\lambda = 280$ con $\varepsilon = 7858 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
	$\lambda = 302$ con $\varepsilon = 3524 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
	$\lambda = 326$ con $\varepsilon = 2149 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
	$\lambda = 342$ con $\varepsilon = 1873 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Tabla 6. Asignación de bandas de UV-Visible del complejo **[2BBCuCl](CH₃CN)₃**.

Por espectroscopía infrarrojo se evidencia la presencia de grupos bencimidazol debido a la banda de estiramiento C=N en 1612 cm^{-1} , mientras que el pico ancho en 3128 cm^{-1} corresponde al estiramiento N-H de la amina secundaria en el **2BB** coordinado. Se llevó a cabo caracterización adicional por espectrometría de masas ESI en acetonitrilo, revelando la presencia de un pico en m/z 396 (ilustración 4) asignado a la especie $[\mathbf{2BBCu}]^+$, de forma análoga a lo observado con los complejos cúpricos (ilustración 2).^[66] Además, se evidencia una pequeña cantidad del fragmento oxidado $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{ClCuN}_8^+$ en $m/z = 545$.

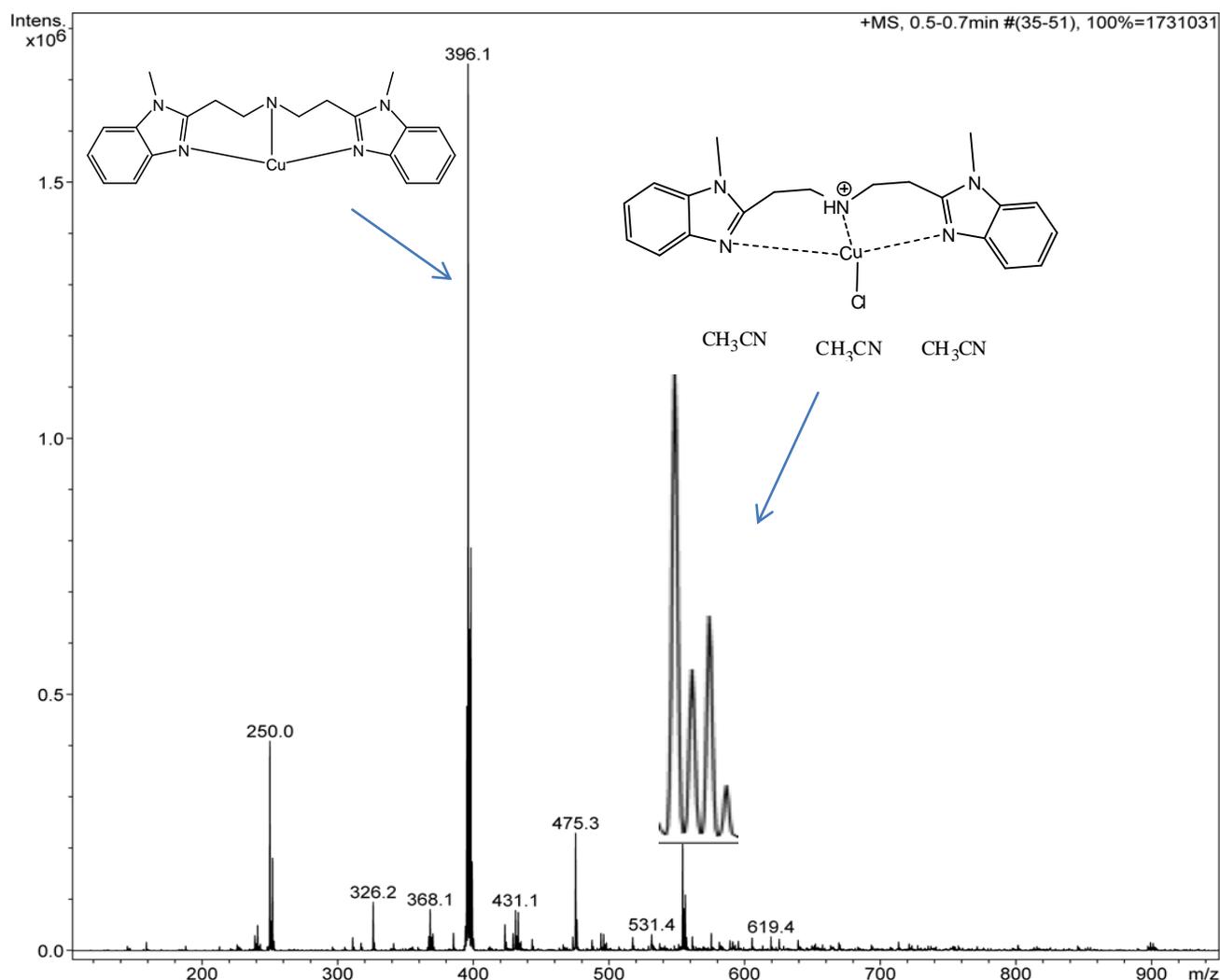


Ilustración 4. Espectro de masas ESI para el complejo $[\mathbf{2BBCuCl}](\text{CH}_3\text{CN})_3$.

El análisis elemental por combustión encontrado fue (%): C, 60.19; H, 6.04; N, 17.15, correspondiendo al compuesto $C_{32}H_{45}ClCuN_8$ identificando al complejo como la especie **[2BBCuCl](CH₃CN)₃(C₆H₁₄)** con una molécula de hexano de solvatación, además de 3 de acetonitrilo. No se obtuvieron cristales de calidad suficiente para ser analizadas por difracción de rayos X y establecer la identidad inequívoca del complejo en estado sólido.

4.2. Estudio electroquímico

Con miras a determinar las propiedades redox del sistema generado, se realizaron experimentos empleando la técnica de voltamperometría cíclica en disoluciones 1 mM de acetonitrilo grado Biotec del ligante **2BB** y del complejo generados *in situ* procedente de la reacción entre 0.1 mmol (1.67 mg) del ligante **2BB** y 0.1 mmol (2.9 mg) de la sal $[Cu(NCCH_3)_4]OTf$ bajo atmósfera de nitrógeno. La velocidad de barrido fue de 0.1 Vs^{-1} , referenciada al par redox ferricinio/ferroceno (Fc^+/Fc).

Como resultado se determinó que el complejo de cobre (I) presenta un proceso oxidativo reversible para el par $[2BBCu]^+/[2BBCu]^{2+}$, cuyo potencial de media onda $E_{1/2} = -138 \text{ mV}$ vs Fc^+/Fc , un potencial de pico anódico $E_{pa} = -87 \text{ mV}$ y un potencial de pico catódico $E_{pc} = -188 \text{ mV}$. Hay un $\Delta E_p = 0.10$ (Ver Ilustraciones 5 y 6).

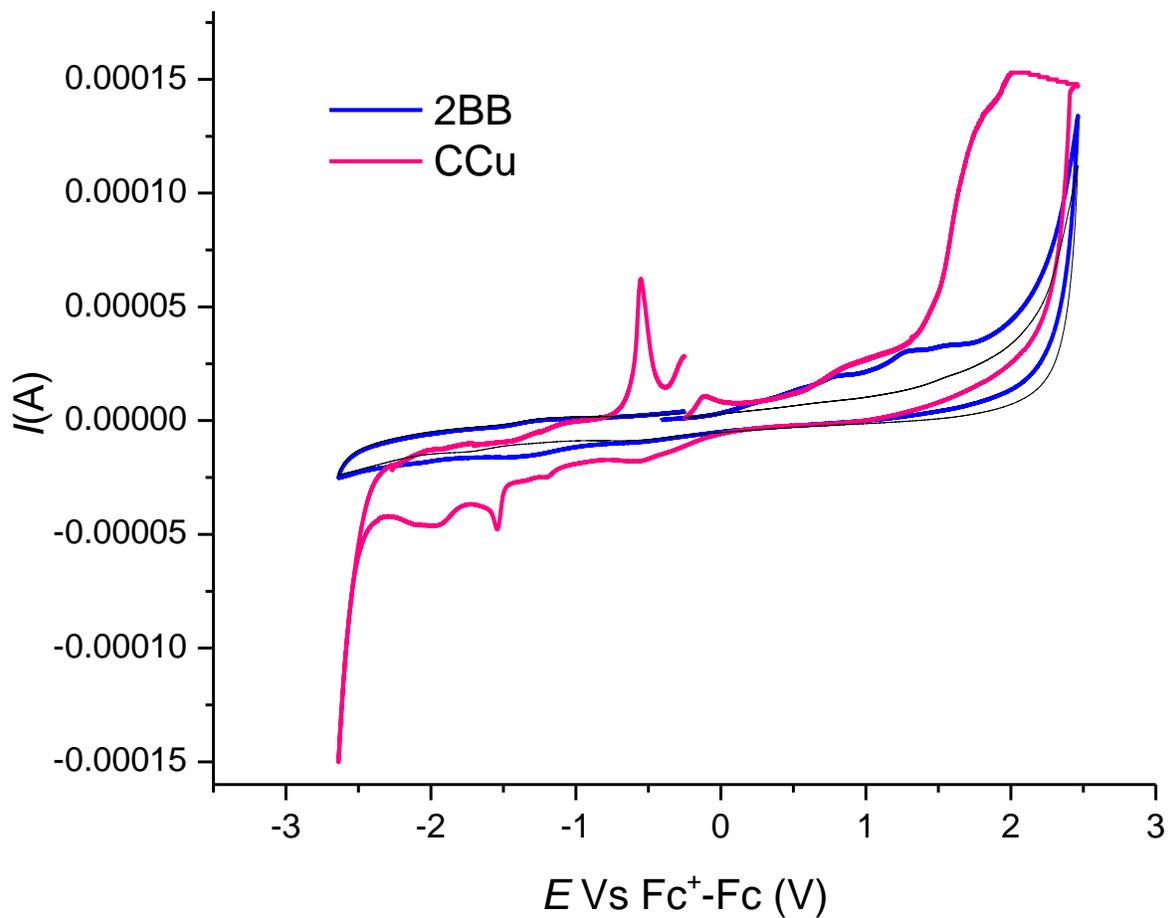


Ilustración 5. Voltamperogramas anódicos de ligante **2BB** y el complejo [**2BB**Cu]OTf (vs Fc⁺/Fc, señalado como CCu) a una concentración de 1 mM en CH₃CN, electrodo de trabajo carbono vítreo y electrolito soporte (ES) hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, concentración 0.1 M

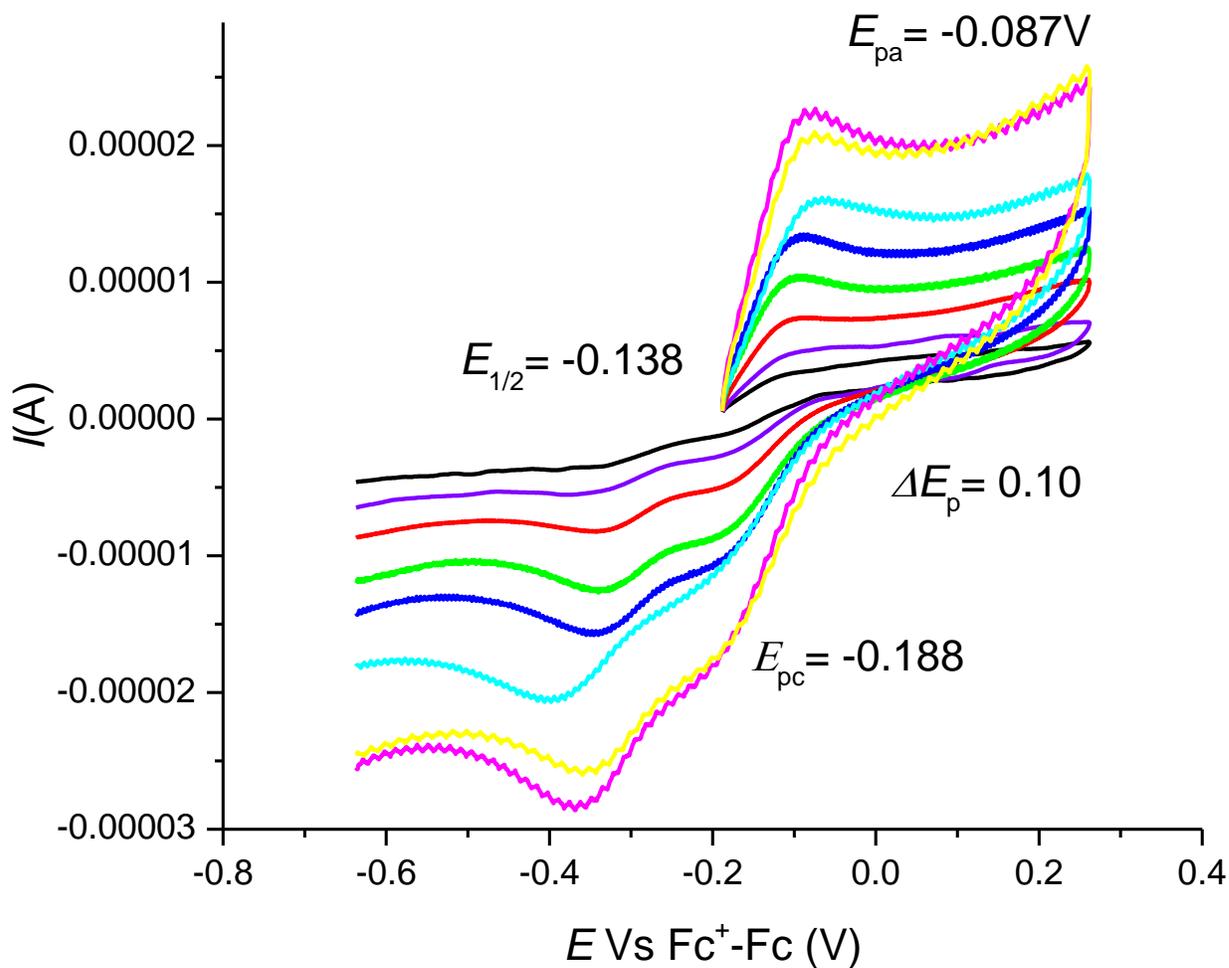


Ilustración 6. Voltamperogramas de velocidad de barrido del complejo [2BBCu]OTf (vs Fc⁺/Fc) a una concentración de 1 mM en CH₃CN.

Al obtener valores negativos de potencial $E_{1/2} = -138$ mV, queda entonces evidenciado que el sistema estabiliza especies de alto estado de oxidación, es decir que el Cu²⁺ es la especie favorecida del par redox Cu²⁺/Cu⁺.

4.3. Estudios de reactividad frente a Oxígeno

En informes anteriores sobre los estudios de complejos relacionados bis(benzimidazol)amina-cuprosos requeridos para la reacción con O₂ y posteriores ensayos de actividad oxigenasa, los estudios fueron obstaculizados por la baja solubilidad en diclorometano de los complejos correspondientes con tetrafluoroborato y hexafluorofosfato como contraiones.^[67] Sin embargo, una prueba de reactividad inicial entre **2BB** y [Cu(NCCH₃)₄]OTf en acetonitrilo resultó en especies solubles susceptibles para estudios de reactividad con oxígeno. Entonces empleando el complejo cuproso, se procedió a intentar identificar las especies reactivas cobre-oxígeno con objetivo de proponer un mecanismo de degradación de polisacáridos recalcitrantes. Para ello, se siguió la reacción a través de espectroscopía UV-vis a baja temperatura en THF bajo atmósfera de N₂, entre dicho complejo y la celobiosa (como modelo dimérico de la celulosa; 10 equivalentes con respecto a Cu) antes y posterior al burbujeo de oxígeno molecular.

Los espectros obtenidos no evidenciaron bandas identificables que pudieran ser útiles para proponer un mecanismo de dicha degradación (anexo V). No obstante, al extraer la mezcla con una disolución saturada de EDTA para eliminar el cobre del medio de reacción, seguido de extracciones con acetato de etilo, los espectros de masas ESI evidenciaron la presencia de un pico en $m/z = 239$, que corresponde al producto doblemente oxidado C₆H₉Na₂O₇, como se muestra en la ilustración 7.

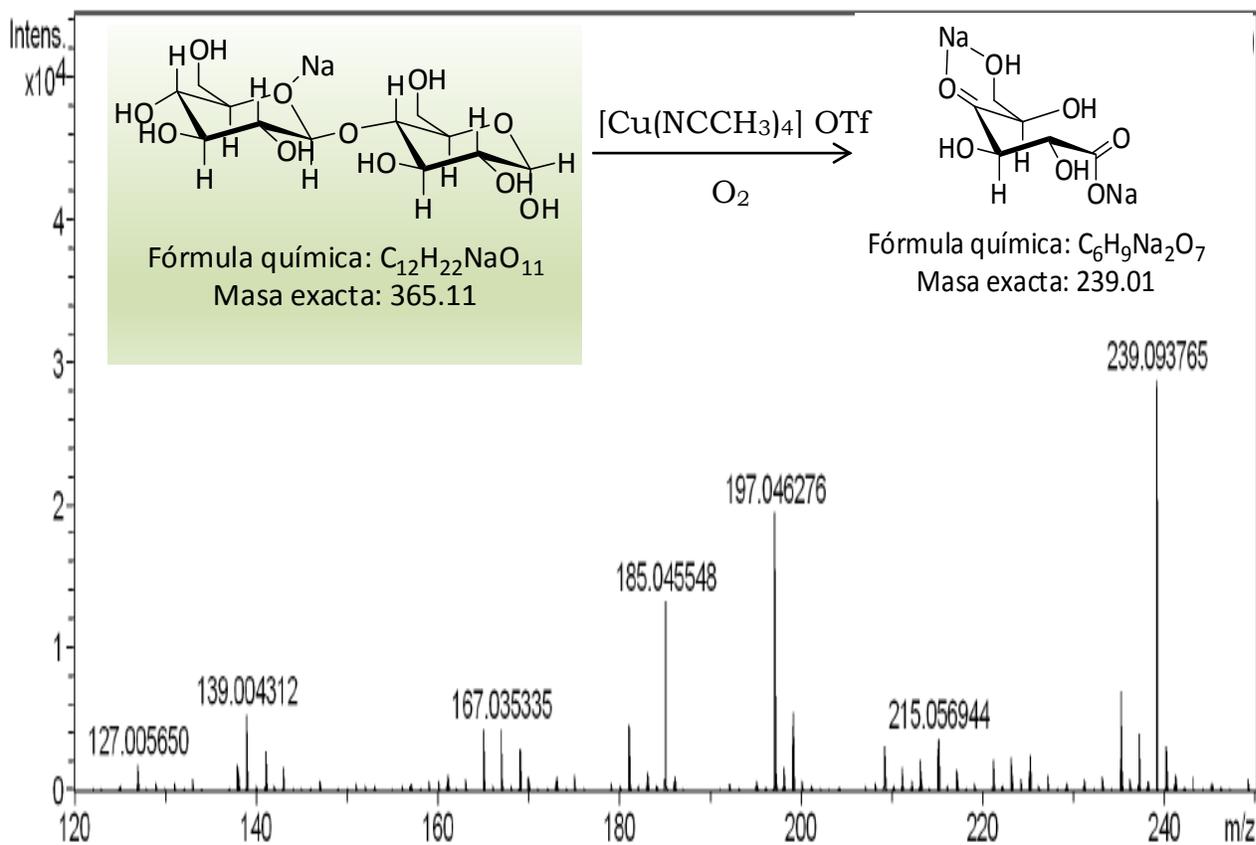


Ilustración 7. Espectro de masas ESI para el producto de oxidación de celobiosa.

Aun después de identificar esta especie, no se ha podido proponer un mecanismo de reacción dado que no se pudo llevar a cabo la identificación formal de las especies reactivas cobre-oxígeno que intervinieron en el proceso de degradación que se siguió a través de espectroscopía UV-vis, por lo cual se plantea como perspectiva el seguimiento de este estudio.

V. Conclusiones

- El ligante bis[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina **2BB** proporciona un entorno de coordinación similar al de los sitios activos de las PMO's dependientes de cobre, incluyendo la naturaleza N-metilada de los donadores heterocíclicos bencimidazol a los iones Cu^{2+} .
- La caracterización espectroscópica de los complejos cúpricos y cuprosos demuestra que el ligante **2BB** sustenta especies monoméricas en disolución, que pueden reducirse con relativa facilidad, como indirectamente demuestra por la detección de las especies $[\mathbf{2BBCu}]^+$.
- En el estado sólido, **2BB** da lugar a complejos mono- o bimetálicos, dependiendo de la identidad de los contraiones. En todos los casos, se retiene una disposición en forma de T del conjunto donador N_3 , emulando estructuralmente el ambiente de coordinación en el sitio activo de las familias AA9-AA11 de las monooxigenasas que proporcionan el “abrazo de histidina” y el imidazol de una histidina adicional.
- El estudio de las propiedades redox del ligante **2BB** y su complejo de Cu(I) aportó información del efecto de los átomos donadores de nitrógeno sobre el ión metálico en términos del potencial de media onda del par redox. Se determinó un potencial de media onda de $E_{1/2} = -138 \text{ mV vs Fc}^+/\text{Fc}$, que al ser negativo, indica que la especie más estable es Cu^{2+} del par redox $[\mathbf{2BBCu}]^+ / [\mathbf{2BBCu}]^{2+}$.
- En los estudios preliminares de reactividad a baja temperatura por UV-vis no se observaron bandas identificables de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, se evidenció la escisión oxidativa de la celobiosa, lo

cual demuestra que los modelos propuestos poseen actividad extrapolable hacia polímeros recalcitrantes, semejante a la actividad de las metaloenzimas de referencia, abriendo nuevas posibilidades para la conversión de biomasa recalcitrante en biocombustibles. Actualmente estamos explorando la estructura y reactividad de los complejos de **2BB** en este sentido.

VI. Parte

Experimental

6.1. Reactivos y técnicas

Los disolventes y reactivos se obtuvieron de proveedores comerciales, y se usaron sin purificación adicional. Los espectros de UV-vis se obtuvieron en un espectrómetro Agilent 8453 entre 200 y 1000 nm empleando disoluciones en THF, CH₃OH o CH₃CN. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin Elmer 203-B en el intervalo 4000-400 cm⁻¹ como discos de KBr. Los espectros de RMN se obtuvieron a 300 (¹H) y 75 MHz (¹³C) con un espectrómetro JEOL Eclipse 300 en disolventes deuterados: CDCl₃ 99.8% D, C₂D₂Cl₄ 99.8% D obtenidos de Sigma-Aldrich. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-SX-102A a un voltaje de aceleración de 10 kV, con una matriz de alcohol nitrobencílico y átomos de xenón a 6 keV (FAB-Fast Atom Bombardment) o un espectrómetro Bruker Daltonics Esquire 6000 espectrómetro con trampa de iones (ESI-electrospray). Los análisis elementales fueron obtenidos con un equipo Exeter Analytical CE-440. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato electrotérmico Mel-Temp y están sin corregir.

Los análisis de Voltamperometría cíclica de barrido se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno en acetonitrilo grado biotecnológico, con un potenciostato-galvanostato CH Instruments serie 600C, utilizando NBu₄PF₆ (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio) a una concentración 0.1 M como electrolito soporte; se empleó electrodo de trabajo de carbono vítreo ($\Phi = 7.1\text{mm}^2$), electrodo de referencia electrodo de plata (Ag/disolución de AgBr) y electrodo auxiliar de platino (Pt/disolución de NBu₄PF₆). 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 0.1 Vs^{-1} . De acuerdo con la convención de la IUPAC, el voltamperograma del par ferricinio/ferroceno (Fc^+/Fc) se obtuvo 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 se dividió por la concentración molar exacta de la especie electroactiva.

6.2. Procedimientos trabajo en ambiente anhidro

Las reacciones y los compuestos sensibles a la humedad o al oxígeno fueron manipulados en atmósfera de N_2 en una caja de guantes MBraun o en línea de vacío/ N_2 utilizando técnicas Schlenk. Los disolventes fueron secados utilizando métodos estándar y destilados bajo N_2 .

6.3. Espectroscopia RPE

Las determinaciones de RPE se realizaron a temperatura ambiente o 77 K en tubos de cuarzo con un espectrómetro Jeol JES-TE300 de 1.4 T operando a frecuencias de banda X (9.4 GHz) con una modulación de campo de 100 kHz y una cavidad cilíndrica (modo TE_{011}); los espectros fueron adquiridos en estado sólido y en acetonitrilo congelado o disoluciones de acetonitrilo/diclorometano. Las mediciones externas del campo magnético estático se hicieron con un gaussómetro de precisión Jeol ES-FC5. El programa ESPRIT-382, v1.916 fue utilizado para la adquisición y manipulación de espectros.

6.4. Cristalografía de rayos X

Los datos cristalográficos seleccionados se presentan en la **Tabla 1 del Anexo I**. Cristales individuales se montaron en un difractorómetro Bruker SMART equipado con un detector de área Apex CCD. Los marcos fueron colectados por barridos omega, y se integran con el paquete de software Bruker SAINT utilizando la unidad de celda apropiada.^[68] Las estructuras fueron resueltas mediante el programa SHELXS-97,^[69] y refinadas por la matriz completa de mínimos cuadrados en F^2 con SHELXL-97.^[76] Factores ponderados R, R_w , y el ajuste “goodness-of-fit” S, se basaron en F^2 . El criterio observado de ($F^2 > 2\sigma F^2$) sólo se utilizó para el cálculo de los factores R. Todos los átomos distintos 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 y 0.98 Å para los átomos de carbono aromáticos y saturados, respectivamente. A los parámetros térmicos isotrópicos de los átomos de hidrógeno les fueron asignados los valores de $U_{iso} = 1.2$ veces los parámetros térmicos del átomo al que está unido.

6.5. Procedimientos sintéticos

6.5.1. Síntesis del ligante **2BB**: *bis*[(1-metil-2-bencimidazolil)etil]amina

El ligante **2BB** se preparó a través de la reacción a reflujo de una disolución 11.4 mmol (1.4 g) de 3,3-iminodipropionitrilo y N-metil-*o*-fenilendiamina 23.9 mmol (2.9 g) en 60 mL de HCl de concentración 3 mM por 4 días.^[50] La disolución resultante, de color café, se enfrió en baño de hielo y posteriormente

se basificó adicionando gota a gota NH_4OH concentrado. El precipitado formado se recolectó por filtración y se lavó varias veces con hidróxido de amonio diluido. El producto fue cristalizado en etanol agua 1:1, evidenciando un rendimiento del 60%. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.53 (m, 2 H, Ar), 7.26 (m, 6 H, Ar), 4.85 (br, 1 H, NH), 3.68 (s, 6 H, NCH_3), 3.29 (t, 4 H, CH_2N) 3.09 (t, 2 H, CH_2C). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 154 (C Bencimidazol), 142 (C Bencimidazol), 136 (C Bencimidazol), 122 (CH Bencimidazol), 122 (CH Bencimidazol), 119 (CH Bencimidazol) y 109(CH Bencimidazol), 47 (CH_2 Alifático), 30 (CH_3 Alifático) y 26 (CH_2 Alifático) δ /ppm. IR (KBr) $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$: 3263, 3051, 3018, 2948, 2918, 1738, 1673, 1613, 1514, 1476, 1438, 1405, 1371, 1332, 1283, 1199, 1140, 989, 960, 933, 846, 744, 703, 658, 571, 535, 436, EI MS: $m/z = 378$. Análisis Elemental calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_5$ (%) C, 58.97; H, 6.43; N, 17.19; (%) encontrado: C, 59.57; H, 5.88; N, 16.39.

6.5.2. Síntesis de los complejos de Cu^{2+}

[{2BBCu(μ -F)} $_2$](BF $_4$) $_2$: a una disolución de **2BB** (150 mg, 0.45 mmol) en 10 mL de metanol añadió $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (155 mg, 0.45 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo a 40°C durante 4 h. Después de enfriar a temperatura ambiente un sólido verde se comenzó a depositar, los volátiles se evaporaron a presión reducida, y el sólido resultante se lavó con 2×10 ml de éter dietílico para dar **[{2BBCu(μ -F)} $_2$](BF $_4$)** en 82% de rendimiento (186 mg). P.f. $188\text{-}190^\circ\text{C}$; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$: 3417, 3132, 3054, 2934, 2902, 2862, 1613, 1518, 1490, 1457,

1411, 1358, 1330, 1295, 1259, 1237, 1182, 1149, 1123, 1091, 1028, 1007, 931, 862, 829, 763, 563, 505, 435. ESI MS: $m/z = 396$ [**2BBCu**]⁺. UV-Vis (metanol) λ en nm (ϵ en $M^{-1}.cm^{-1}$): 245 (14530), 272 (15730), 279 (15490), 720 (255), 952 (123). Análisis Elemental calculado para $C_{40}H_{46}B_2Cu_2F_{10}N_{10}$ [**2BBCu**(μ -**F**)₂](**BF**₄)₂·2H₂O (%): C, 46.12; H, 4.84; N, 13.45. Encontrado (%): C, 45.97; H, 4.34; N 13.29%.

[2BBCuCl₂]: a **2BB** (150 mg, 0.45 mmol) en 10 mL de metanol se añadió CuCl₂·2H₂O (77 mg, 0,45 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo a 40°C durante 4 h. Rendimiento del 78% (164 mg). P.f. 198-200 °C; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3180, 3056, 2929, 2884, 1612, 1495, 1456, 1413, 1361, 1329, 1292, 1237, 1193, 1152, 1127, 1095, 1029, 1008, 976, 932, 861, 828, 761, 567, 505, 438 FAB MS: $m/z = 396$ [**2BBCu**]⁺. UV-Vis (metanol) λ en nm (ϵ en $M^{-1}.cm^{-1}$): 245 (39900), 272 (43450), 279 (43340), 723 (157), 960 (124). Análisis Elemental calculado para $C_{20}H_{23}Cl_2CuN_5$ [**2BBCuCl₂]** (%): C, 51.34; H, 4.95; N, 14.97. Encontrado(%): C, 50.92; H, 4.55; N 14.61.

[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂: a **2BB** (150 mg, 0.45 mmol) en 10 mL de metanol se adicionó Cu(OTf)₂·6H₂O (201 mg, 0.45 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo a 40°C durante 4 h. Rendimiento del 97% (319 mg) P.f. 198-200 °C; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3356, 3241, 2953, 1640, 1617, 1500, 1459, 1415, 1331, 1283, 1229, 1153, 1088, 1027, 976, 935, 859, 750, 632, 571, 514, 436. FAB MS: $m/z = 545$ [**2BBCu(OTf)**]⁺, 396 [**2BBCu**]⁺. UV-Vis (metanol) λ en nm (ϵ en $M^{-1}.cm^{-1}$): 247 (50500), 272 (55940), 279 (55280), 722 (82), 966 (62). Análisis Elemental

calculado para $C_{22}H_{27}CuF_6N_5O_8S_2$ **[[2BBCu(H₂O)_{1,5}](OTf)₂]** (%): C, 36.59; H, 3.63; N, 9.70. Encontrado (%): C, 37.14; H, 4.04; N 9.76%.

6.5.3. Síntesis de los complejos de Cu⁺

[2BBCuCl](CH₃CN)₃: En un tubo Schlenk en la caja de guantes se tomaron 100 mg de **2BB** (0.30 mmol) en 10 mL de CH₃CN anhidro y se adicionaron 30 mg de CuCl (0.30 mmol) y se dejó agitar durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla se pasó a línea de vacío/N₂ y se redujo el volumen del sistema a sequedad (se depositó un sólido color amarillo-café) y el sólido resultante se lavó con hexano anhidro a través de cánula y se filtró –usando el mismo método–, para dar **[2BBCuCl](CH₃CN)₃]** en 82% de rendimiento (83 mg). P.f. 150-152 °C; IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3356, 3241, 2953, 1640, 1617, 1500, 1459, 1415, 1331, 1283, 1229, 1153, 1088, 1027, 976, 935, 859, 750, 632, 571, 514, 436. ESI MS: m/z = 554 **[2BBCuCl](CH₃CN)₃]⁺, 396 **[2BBCu]⁺**. UV-VIS (CH₂Cl₂)) λ en nm (ϵ en M⁻¹.cm⁻¹): 274(7952), 280(7858), 302 (3524), 326(2149), 342 (1873), 482(5537), 643 (348). Análisis Elemental calculado para $C_{26}H_{32}ClCuN_8$ **[2BBCuCl](CH₃CN)₃** (%): C, 59.98; H, 7.08; Cl, 5.53; Cu, 9.92; N, 17.49; el encontrado fue (%): C, 60.19; H, 6.04; N, 17.15, correspondiendo al compuesto $C_{32}H_{45}ClCuN_8$ identificando al complejo como la especie **[2BBCuCl](CH₃CN)₃(C₆H₁₄)**.**

Anexos

Anexo I: Datos Cristalográficos

Tabla 1. Resumen datos cristalográficos

	2BBCu(μ-F)₂](BF₄)₂	2BBCuCl₂H₂O	[2BBCu(H₂O)₂](Otf)₂
Fórmula	C ₄₀ H ₄₆ B ₂ Cu ₂ F ₁₀ N ₁₀	C ₄₀ H ₄₆ Cl ₄ Cu ₂ N ₁₀ O	C ₂₂ H ₂₇ CuF ₆ N ₅ O ₈ S
Peso Molecular	1005.57	951.75	731.14
Sistema Cristalino	monoclínico	Ortorrómico	monoclínico
Grupo espacial	<i>P2₁/n</i>	<i>Pnma</i>	<i>P2₁/n</i>
λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Color de cristal	verde	verde	azul
T (°K)	298(2)	298(2)	298(2)
Dimensión de cristal (mm)	0.42 x 0.16 x 0.16	0.40 x 0.18 x 0.10	0.40 x 0.29 x 0.15
a (°Å)	12.3882(12)	9.2032(6)	8.65590(10)
b (°Å)	8.3300(8)	16.9362(12)	25.8626(3)
c (°Å)	20.405(2)	14.0998(10)	13.13890(10)
α (°Å)	90	90	90
β (°Å)	102.368(2)	90	95.4710(10)
γ (°Å)	90	90	90
V (°Å ³)	2056.8(3)	2197.7(3)	2927.93(5)
Rangos <i>hkl</i>	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14 -10 ≤ <i>k</i> ≤ 10 -24 ≤ <i>l</i> ≤ 24	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11 -20 ≤ <i>k</i> ≤ 20 -16 ≤ <i>l</i> ≤ 17	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 10 -31 ≤ <i>k</i> ≤ 27 -15 ≤ <i>l</i> ≤ 15
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1.624	1.438	1.659
Z	2	2	4
F(000)	1028	980	1492
μ (mm ⁻¹)	1.125	1.255	0.981
Rango θ (°)	1.77 – 25.40	1.88 – 25.36	2.22 – 25.36
Corrección de absorción	Empírica	Empírica	Empírica

T_{\max}, T_{\min}	0.8595, 0.6533	0.9150, 0.7625	0.9016, 0.8038
Método de refinamiento	Matriz -completa mínimos-cuadrados en F^2	Matriz -completa mínimos-cuadrados en F^2	Matriz -completa mínimos-cuadrados en F^2
Reflexiones independientes	3757	2080	5342
Datos/restricciones/ parámetros	3757/115/322	2080/2/143	5342/63/437
Bondad de ajuste(GOF)en F^2	1.025	1.048	1.053
R	0.0407	0.0439	0.0395
R_w	0.1089	0.1067	0.1033
Mayor diferencia en pico, agujero (eA^{-3})	0.389, -0.239	0.791, -0.206	0.473, -0.405

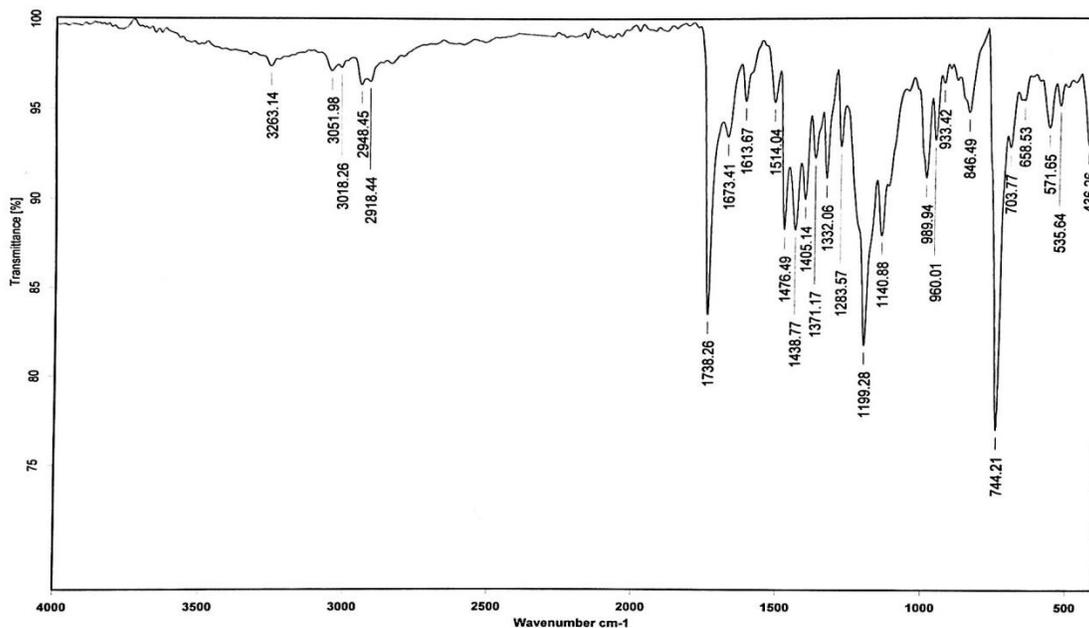
Tabla 2. Distancias de enlace seleccionadas (Å) y ángulos (°) para **[{2BBCu (μ-F)}₂](BF₄)₂**, **2BBCuCl₂** y **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂**

[{2BBCu (μ-F)}₂](BF₄)₂			
Cu-F5	1.889(2)	F5-Cu-F5*	82.48(8)
Cu-F5*	2.225(2)	F5-Cu-N1	90.18(9)
Cu-N1	2.012(3)	F5-Cu-N13	164.85(12)
Cu-N13	2.048(3)	F5-Cu-N16	89.50(9)
Cu-N16	2.013(3)	F5*-Cu-N1	102.28(9)
		F5*-Cu-N13	82.39(11)
		F5*-Cu-N16	97.34(10)
		N1-Cu-N13	92.50(12)
		N1-Cu-N16	160.17(12)
		N13-Cu-N16	92.98(12)
		Cu-F5-Cu*	97.52(8)
2BBCuCl₂			
Cu1-Cl1	2.438(2)	Cl1-Cu1-Cl2	137.94(6)
Cu1-Cl2	2.369(1)	Cl1-Cu1-N1	89.03(8)
Cu1-N1	1.973(3)	Cl1-Cu1-N1*	89.03(8)
Cu1-N1*	1.973(3)	Cl1-Cu1-N2	104.70(13)
Cu1-N2	2.132(4)	Cl2-Cu1-N1	89.34(8)
		Cl2-Cu1-N1*	89.34(8)
		Cl2-Cu1-N2	117.36(12)
		N1-C1-N1*	175.44(16)
		N1-C1-N2	92.24(8)
		N1*-C1-N2	92.24(8)
[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂			
Cu1-O7	2.163(2)	O7-Cu1-O8	120.25(11)
Cu1-O8	2.068(2)	O7-Cu1-N1	89.27(8)
Cu1-N1	1.958(2)	O7-Cu1-N2	116.57(17)

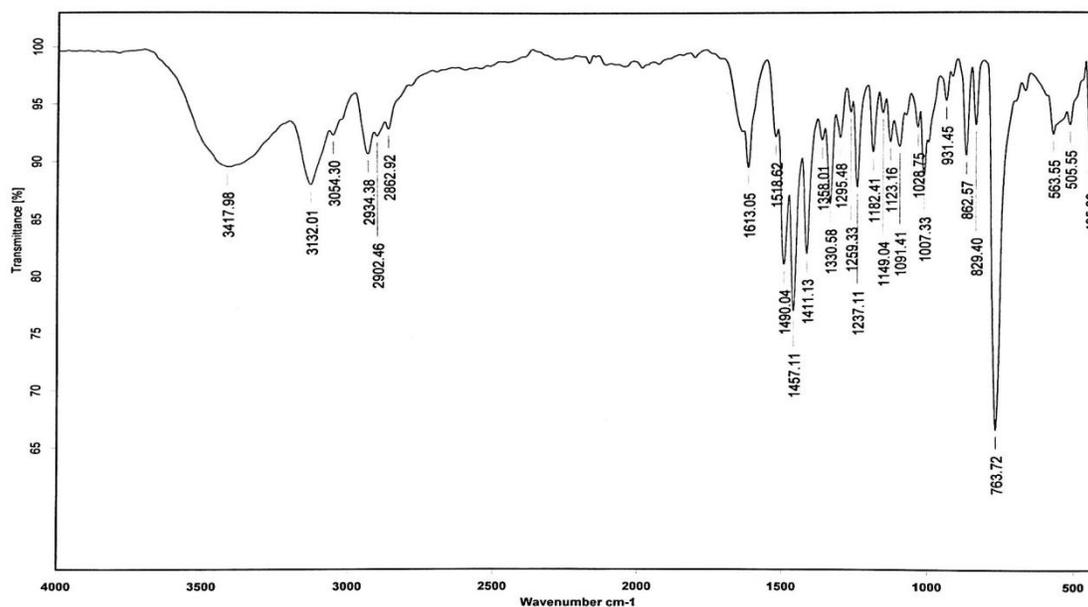
Cu1-N2	2.152(5)	O7-Cu1-N11	88.50(8)
Cu1-N11	1.958(2)	O8-Cu1-N1	90.09(9)
		O8-Cu1-N2	123.16(18)
		O8-Cu1-N11	87.70(9)
		N1-Cu1-N2	91.74(12)
		N1-Cu1-N11	175.54(9)
		N2-Cu1-N11	92.71(12)

*Simetría relacionada al ligante Fluoruro, Código de simetría: -x, -y, -z.

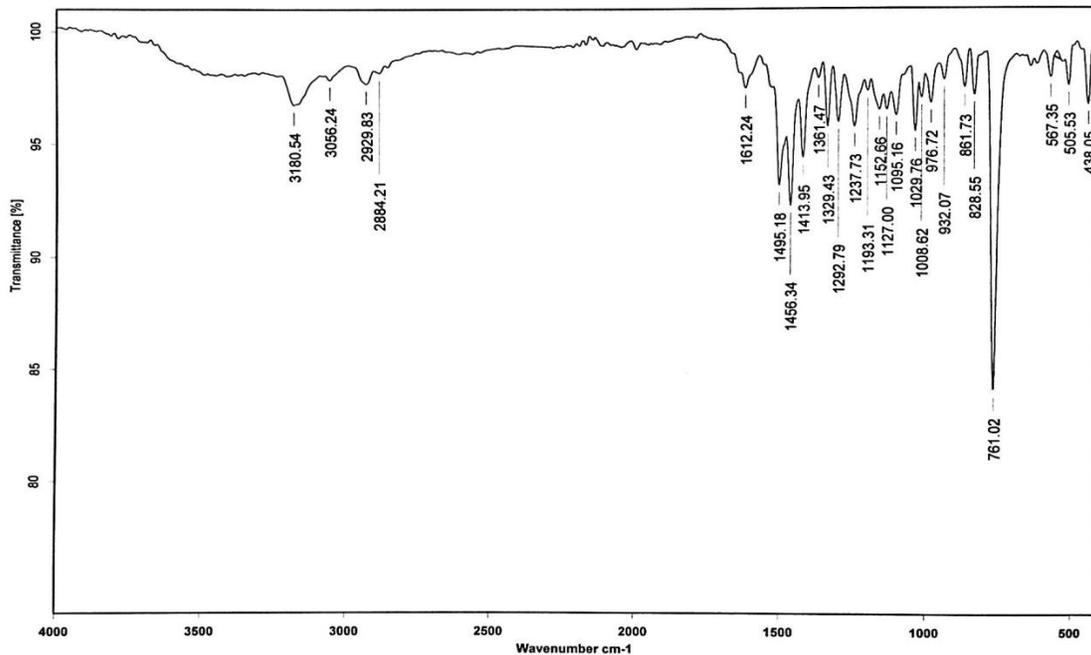
Anexo II: Espectros de Infrarrojo



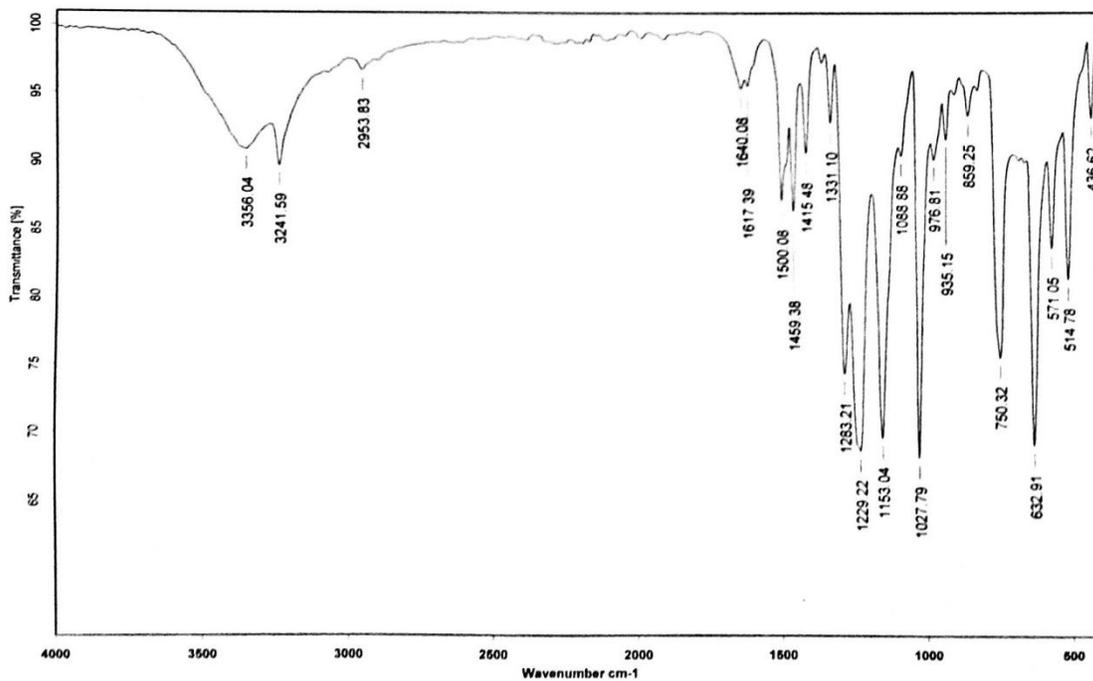
Espectro de infrarrojo por el método de pastilla de KBr para el ligante 2BB de 400 a 4000 cm⁻¹



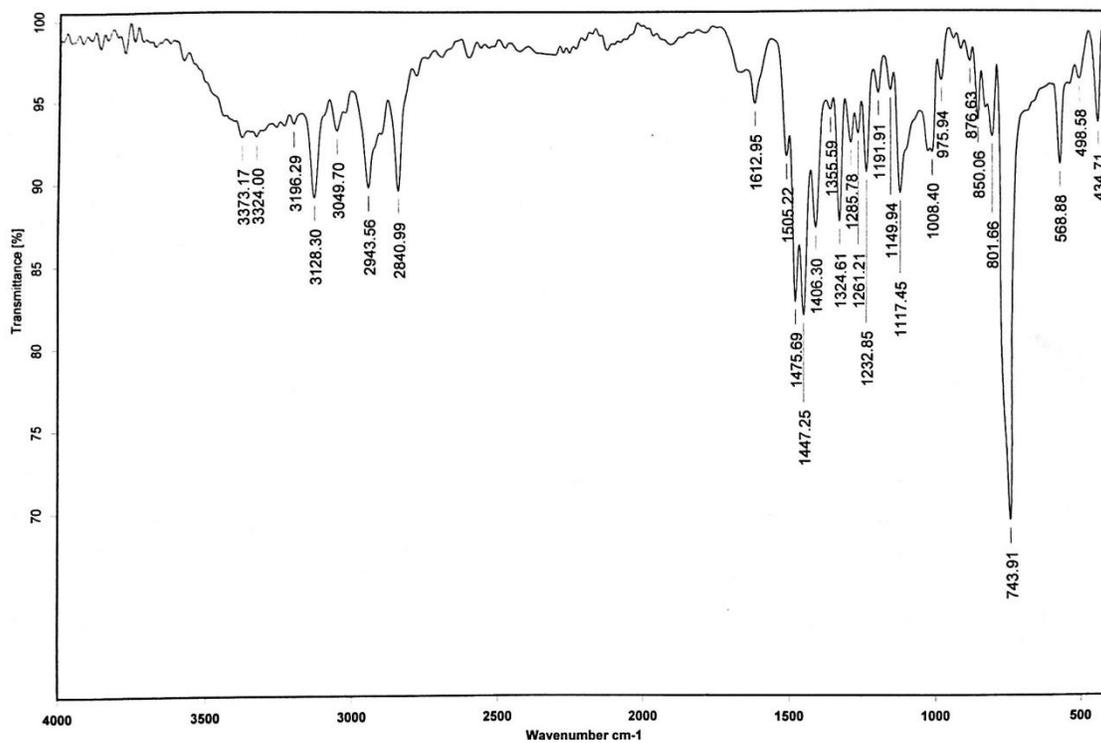
Espectro de infrarrojo por el método de pastilla de KBr para el complejo $[2BBCu(\mu-F)_2](BF_4)_2$ de 400 a 4000 cm⁻¹



Espectro de infrarojo por el método de pastilla de KBr para el complejo $2BBCuCl_2$ de 400 a 4000 cm^{-1}

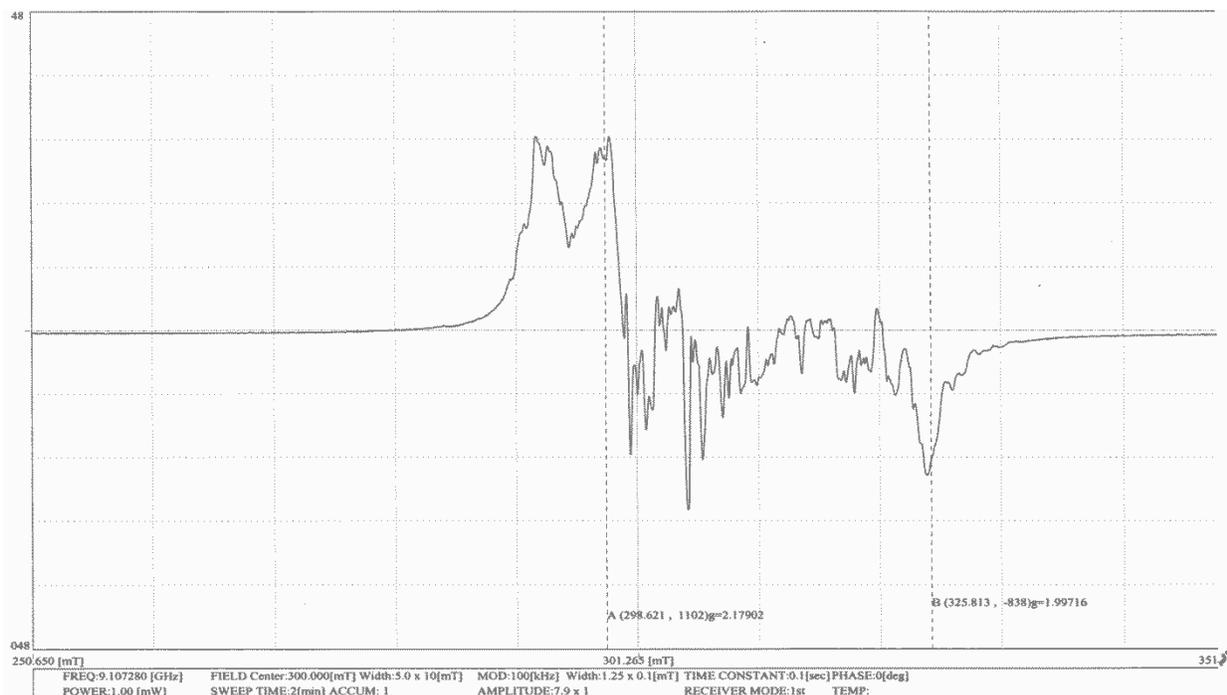


Espectro de infrarojo por el método de pastilla de KBr para el complejo $[2BBCu(H_2O)_2] (OTf)_2$ de 400 a 4000 cm^{-1}

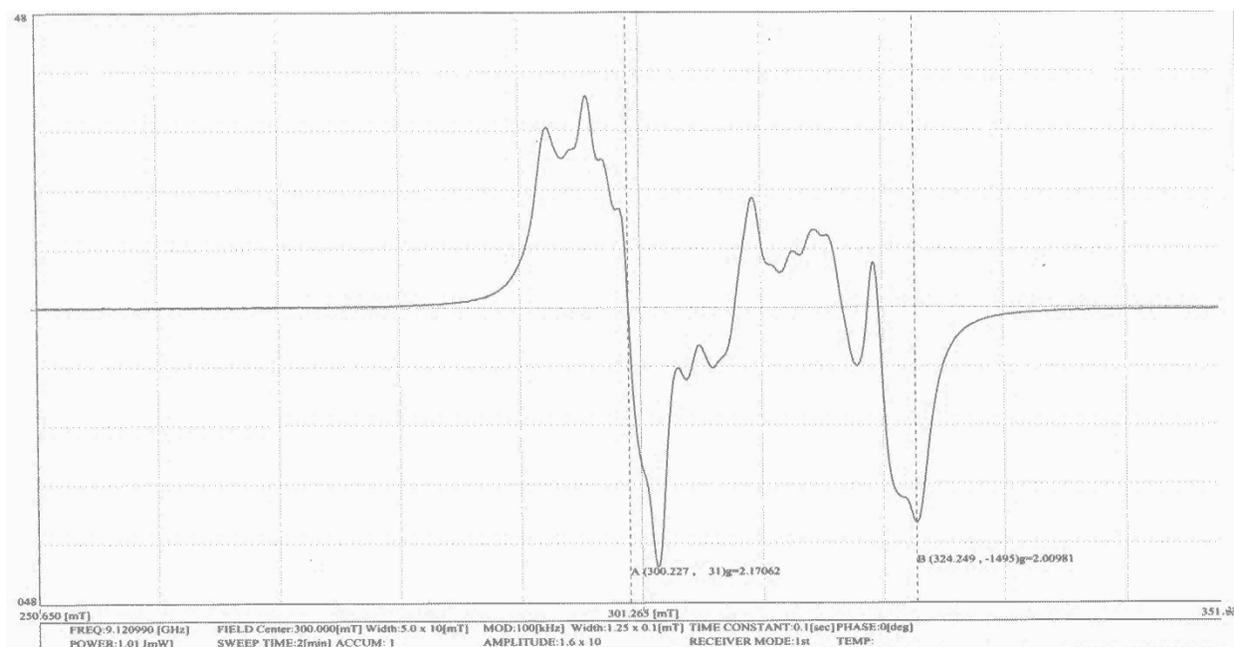


Espectro de infrarojo por el método de pastilla de KBr para el complejo $[2BBCuCl]THF(CH_3CN)_2$ de 400 a 4000 cm^{-1}

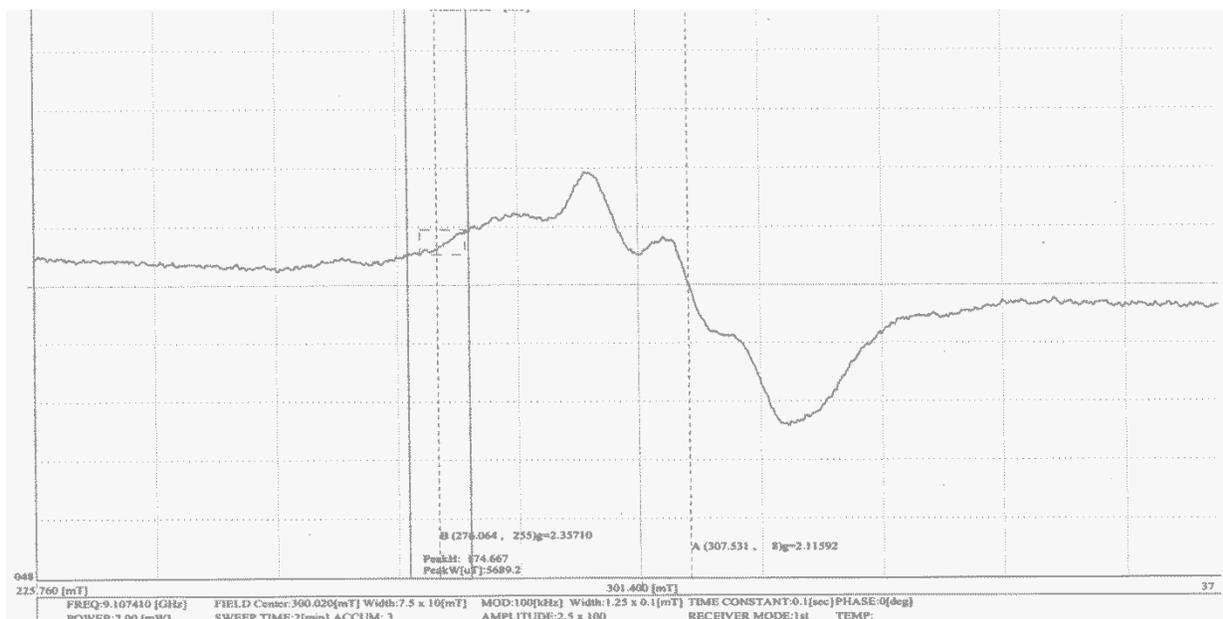
Anexo III: Espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica



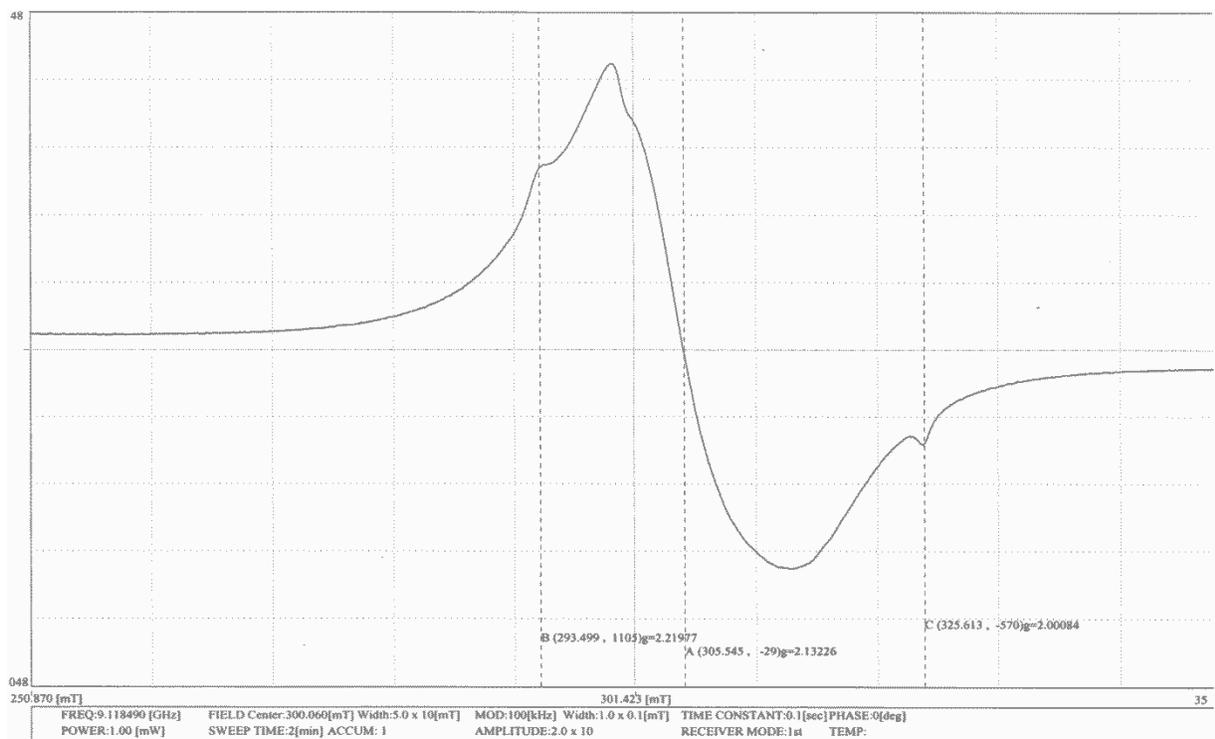
Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo $[2BBCu(\mu-F)_2](BF_4)_2$, banda X (9.4 GHz), tomado en sólido a 77 K.



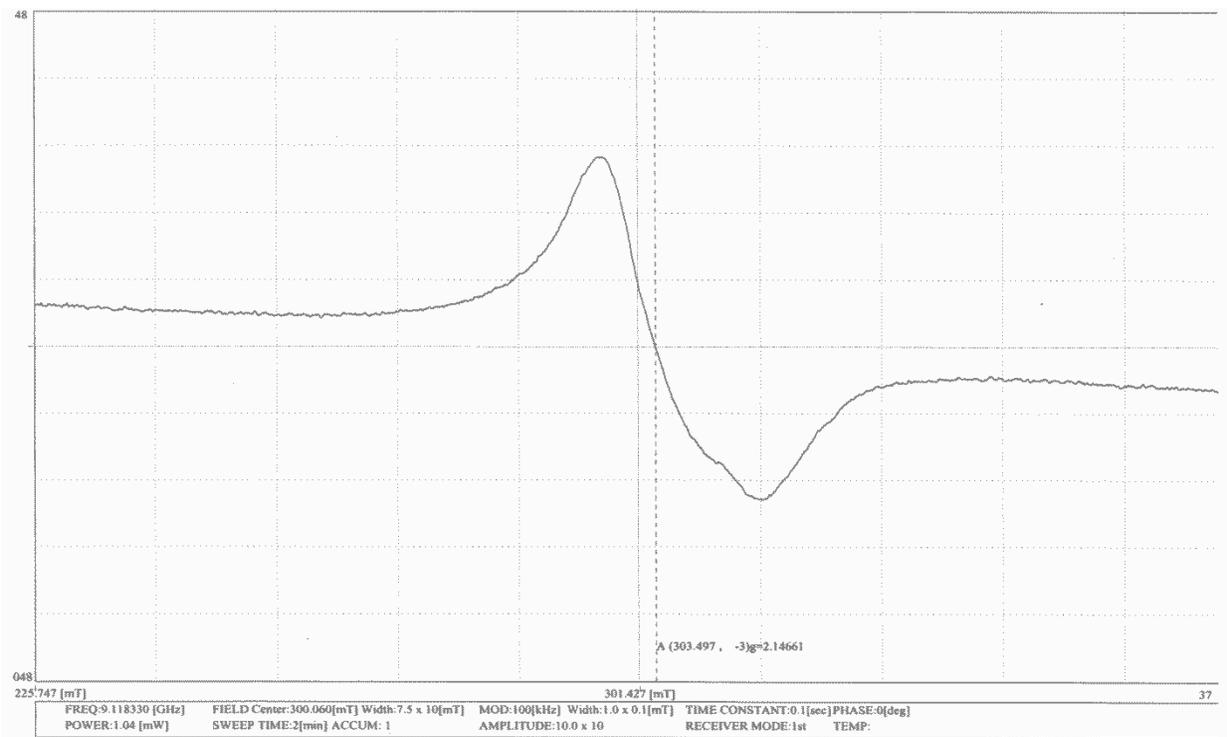
Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo $[2BBCu(\mu-F)_2](BF_4)_2$, banda X (9.4 GHz), tomado en sólido a temperatura ambiente.



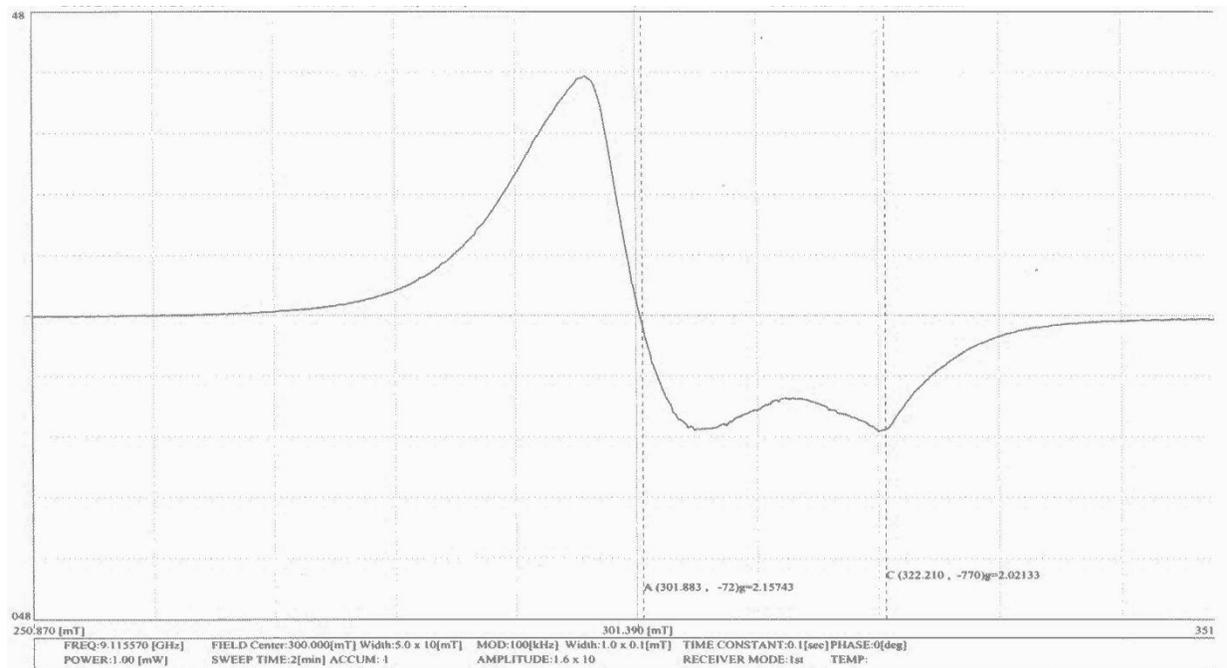
Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo $[\{2BBCu(\mu-F)\}_2](BF_4)_2$, banda X (9.4 GHz), tomado en disolución de CH_3OH a 77 K, concentración 0.001M



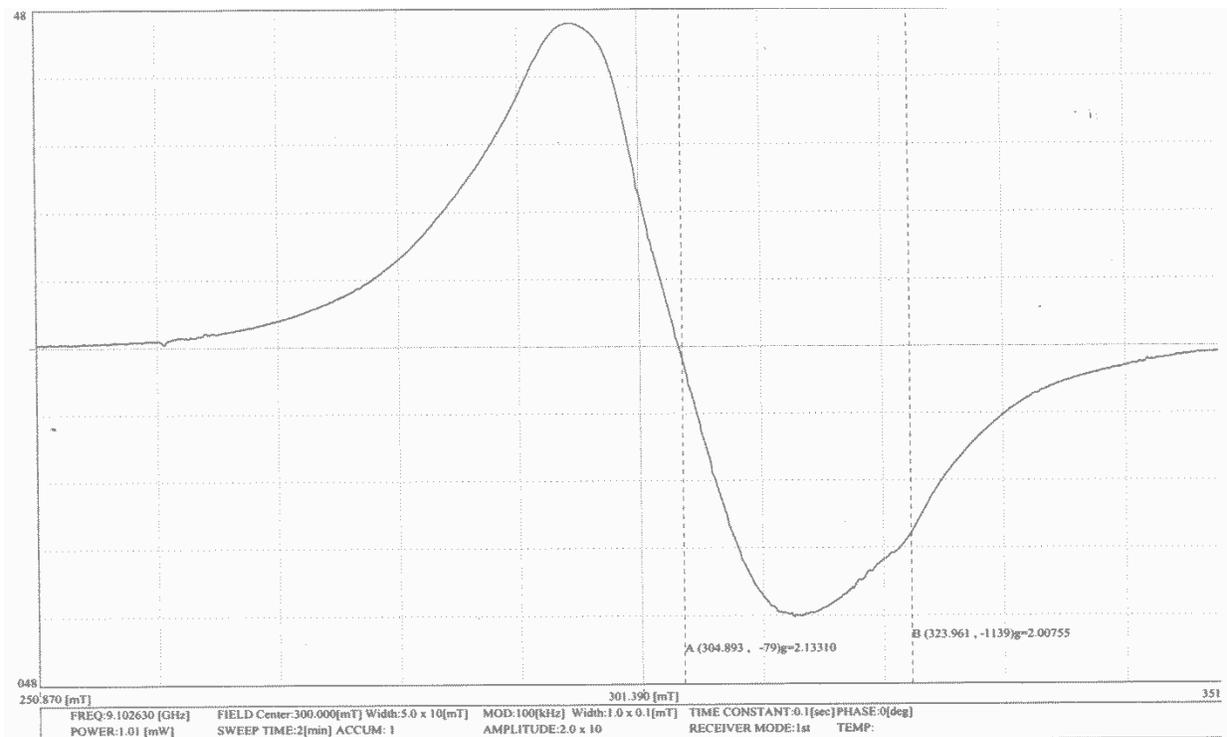
Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo $2BBCuCl_2$, banda X (9.4 GHz), tomado en sólido a 77 K



Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo 2BBCuCl_2 , banda X (9.4 GHz), tomado en disolución de CH_3CN a 77 K, concentración 0.001M

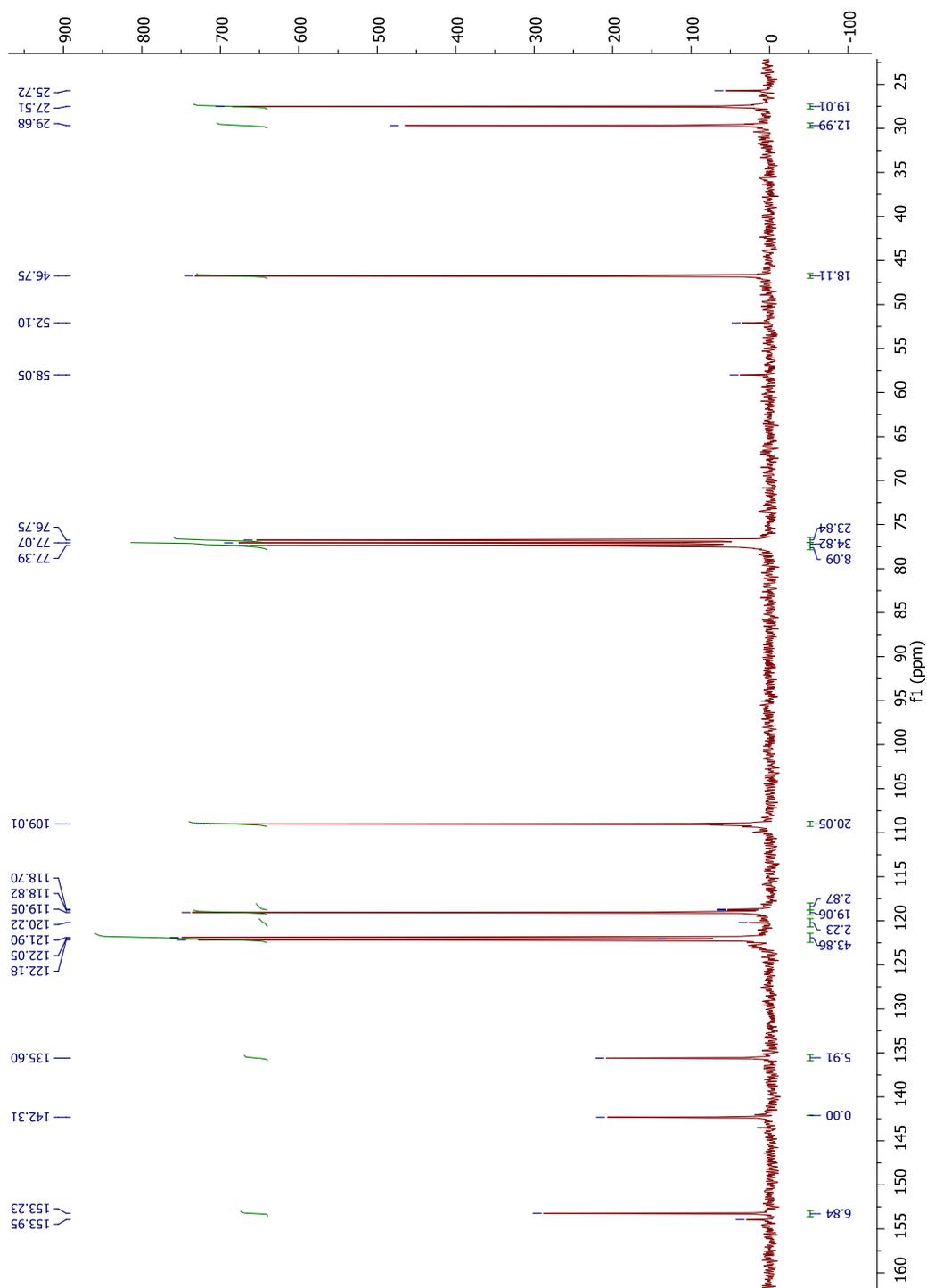


Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo $[\text{2BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$, banda X (9.4 GHz), tomado en sólido a 77 K



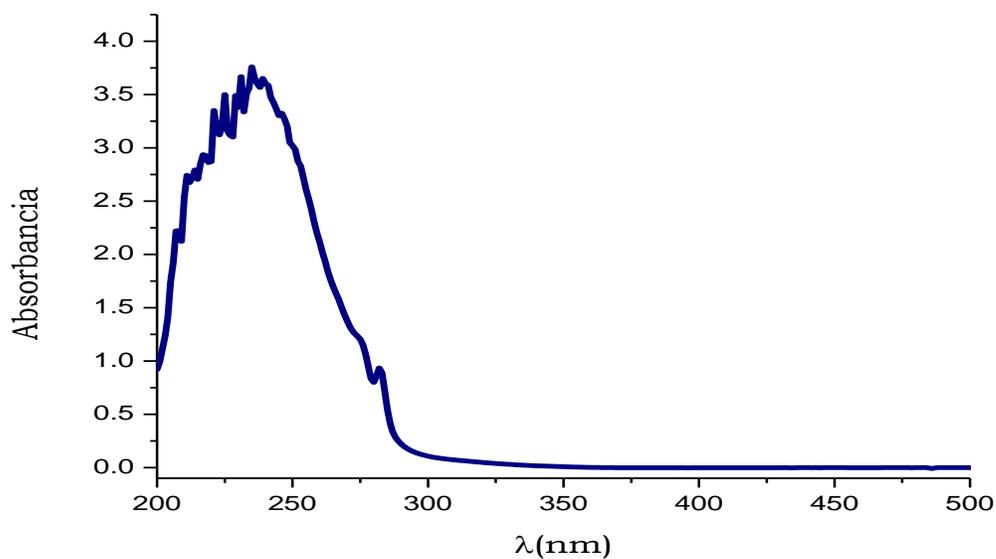
Espectro de resonancia paramagnética electrónica para el complejo $[2BBCu(H_2O)_2] (OTf)_2$, banda X (9.4 GHz), tomado en disolución de CH_3CN a 77 K, concentración 0.001M

Anexo IV: Espectros de RMN ¹³C

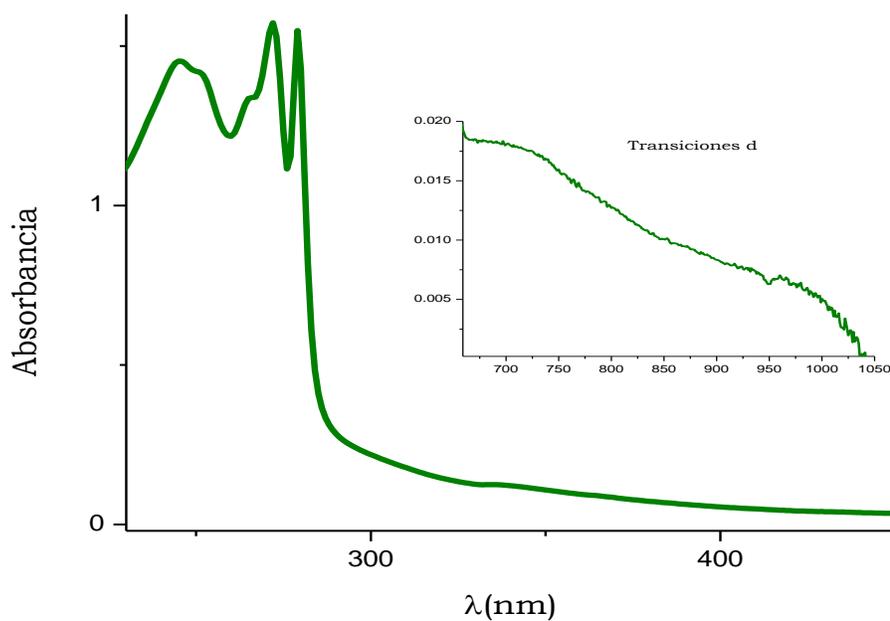


**Espectro de resonancia magnética nuclear de protón para el ligante 2BB.
En disolvente CDCl₃ a una frecuencia de 300 MHz.**

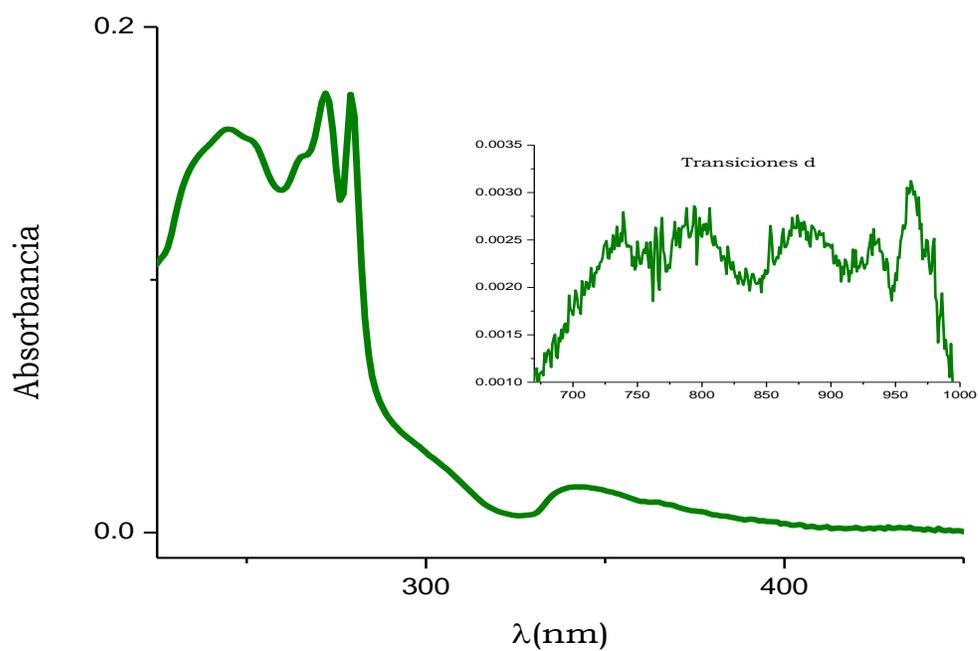
Anexo V: Espectros UV-Visible



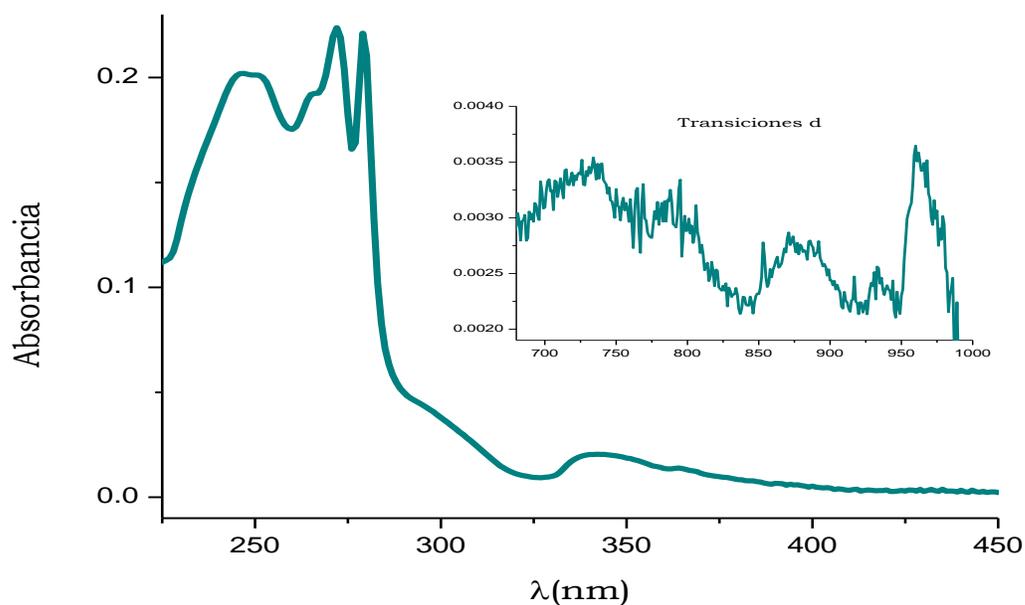
Espectro UV-Visible para el ligante 2BB tomado en MeOH a una concentración 0.001M



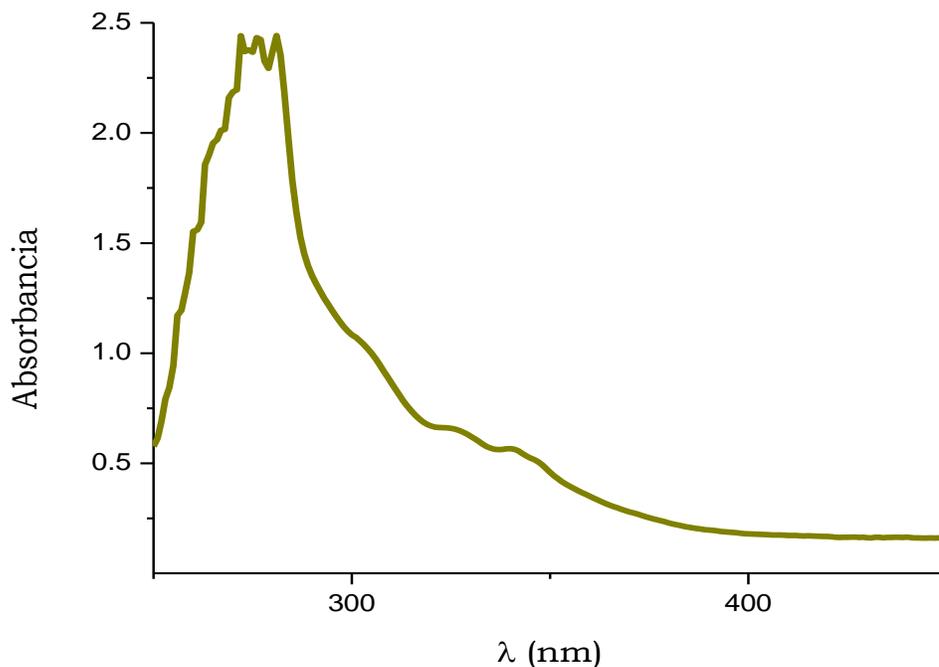
Espectro UV-Visible para el complejo $[\{2BBCu(\mu-F)\}_2](BF_4)_2$ tomado en MeOH a una concentración 0.001M



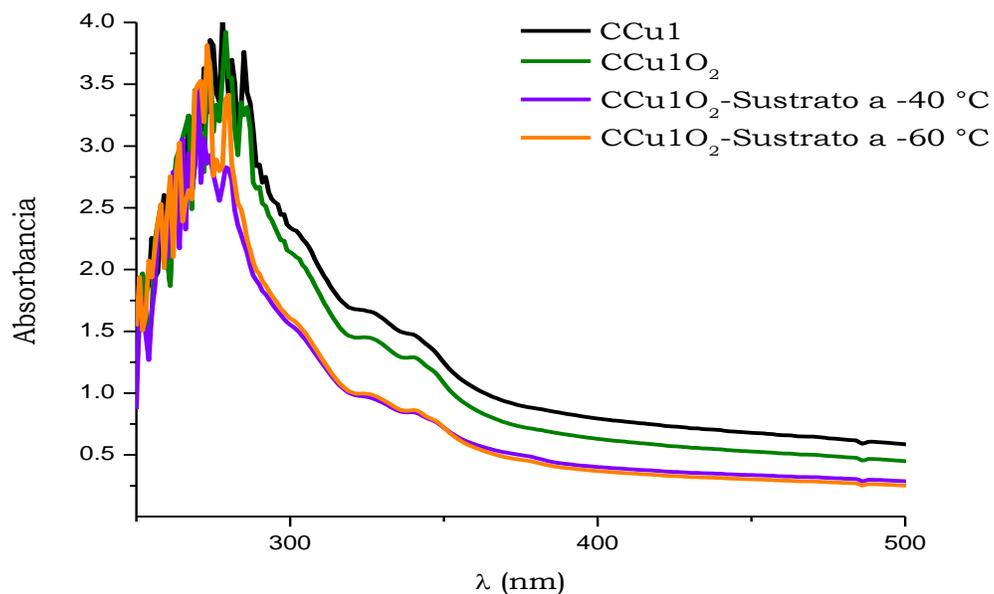
Espectro UV-Visible para el complejo $2BBCuCl_2$ tomado en MeOH a una concentración 0.001M



Espectro UV-Visible para el complejo $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ tomado en MeOH a una concentración 0.001M



Espectro UV-Visible para el complejo $[2BBCuCl]THF(CH_3CN)_2$ tomado en MeOH a una concentración 0.001M



Reactividad frente a O_2 de complejo $[2BBCu] OTf$ en la degradación de celobiosa tomado en MeOH a una concentración 0.003M

Anexo VI: Artículo publicado

Inorganica Chimica Acta 422 (2014) 152–157



Contents lists available at ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ica



Bis(benzimidazolyl)amine copper complexes with a synthetic 'histidine brace' structural motif relevant to polysaccharide monooxygenases



Ivan Castillo^{a,*}, Andrea C. Neira^a, Ebbe Nordlander^b, Erica Zeglio^b

^aInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, CU, México DF 04510, México

^bInorganic Chemistry Research Group, Chemical Physics, Center for Chemistry and Chemical Engineering, Lund University, Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2014

Received in revised form 27 June 2014

Accepted 28 June 2014

Available online 5 July 2014

Dedicated to Don Tilley

Keywords:

Copper complexes

Benzimidazoles

X-ray crystal structures

Tridentate ligands

ABSTRACT

Reaction of Cu²⁺ salts with the benzimidazole-*N*-methylated bis[(1-methyl-2-benzimidazolyl)ethyl]amine ligand **2BB** results in either bi- or monometallic complexes. Spectroscopic and solid state characterization reveals either square pyramidal or trigonal bipyramidal coordination geometries around the cupric ions. In [(2BBCu(μ-F))₂](BF₄)₂, the dicopper structure is determined by the bridging nature of the fluoro ligands, which complement the T-shape arrangement of N₃ donors provided by **2BB** to define a square pyramidal (or capped distorted tetrahedral) coordination geometry. The monocopper complexes 2BBCuCl₂ and [2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂ are characterized by a trigonal bipyramidal geometry both in solution and in the solid state. In all complexes, the T-shape N₃ donor set of **2BB** is analogous to the coordination environment of the copper ions provided by a 'histidine brace' and an additional histidine imidazole in the active site of polysaccharide monooxygenases.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nitrogen-containing heterocycles represent an important class of compounds due to their σ -donor and π -acceptor properties towards transition metals, which can be tuned based on the identity of the heterocycle. For example, the imidazole heterocycle of histidine is ubiquitous in nature for transition metal binding in metalloenzyme active sites, conferring the metal centers specific properties. In this context, chemical and biochemical oxidations promoted by the Cu^{2+/+} redox couple are the subject of intense research due to their involvement in the selective oxidation of a wide range of organic substrates [1]. In the case of copper-dependent metalloenzymes, the study of their remarkable selectivity has been aided by the development of synthetic models, which facilitate understanding of the factors that govern the intimate details of dioxygen activation and subsequent substrate oxidation. Although imidazole would appear as the ideal choice of nitrogen heterocycle for the development of model complexes, most examples incorporate pyrazolyl- [2], pyridyl- [1c,3], and amine-based ligands [1,4], perhaps due to their synthetic accessibility. In this context, we have recently exploited 2-substituted benzimidazoles to assemble chelating ligands for Cu^{2+/+} complexes, based on the pK_a value of protonated 2-methylbenzimidazole (6.10) [5], as well as its association constant with Cu²⁺ (log K 4.43) [6], relative to the

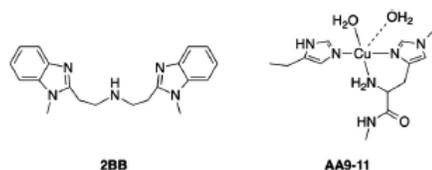
values reported for histidine (pK_a 6.17, log K not comparable due to chelate formation) [7].

Reports on chelating ligands for copper complexes based on benzimidazoles remain relatively scarce [8], with the notable exception of the binucleating scaffolds developed by Casella, Costas and coworkers [9]. Nonetheless, the chemistry of benzimidazole-based ligands appears to be maturing at a fast pace, as evidenced in the growing number of reports that exploit their properties as versatile N-donors [10]. Our contribution to this area has involved the development of biologically-inspired copper systems with 2-substituted benzimidazoles as platforms for tripodal tetradentate ligands [11]. As an extension to this approach, our attention has now focused on the recently described lytic polysaccharide monooxygenases (PMOs) [12], including the auxiliary activity (AA) family of copper-dependent enzymes [13], which feature a conserved type-2 binding site with an N₃ donor set defined by two histidine imidazoles, as well as a backbone nitrogen from one of the histidine residues in the structural motif known as the 'histidine brace' (Scheme 1) [13a,14]. These enzymes oxidatively cleave recalcitrant polysaccharides, with potential applications in biomass conversion. The bis[(1-methyl-2-benzimidazolyl)ethyl]amine **2BB** in Scheme 1 represents a viable candidate for spectroscopic and structural studies of copper complexes as a first approximation to model systems inspired on the mononuclear active sites of PMOs; our interest was further spurred by the methylated nitrogen atom in one of the histidine imidazoles [13a], since **2BB** consist of methylated benzimidazole moieties. Thus, we

* Corresponding author. Fax: +52 55 56162217.
E-mail address: joseivan@unam.mx (I. Castillo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2014.06.027>

0020-1693/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. Ligand employed (**2BB**) and active site of polysaccharide monooxygenases AA9–AA11.

herein report our initial findings on the reactivity of the **2BB**/ Cu^{2+} system.

2. Experimental

2.1. Reagents and techniques

Solvents and reagents were obtained from commercial suppliers, and were used without further purification. Ligand **2BB** was prepared according to the literature procedure [15]. Infrared spectra were obtained with a Perkin Elmer 203-B spectrometer in the range $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ as KBr disks. 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). Melting points were determined on an Electrothermal Mel-Temp apparatus and are uncorrected.

2.2. Synthetic procedures

[{2BBCu(μ -F)}₂](BF₄)₂: General procedure for complex synthesis: to a solution of **2BB** (150 mg, 0.45 mmol) in 10 mL methanol was added $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (155 mg, 0.45 mmol), and the mixture was heated to reflux for 4 h. After cooling to room temperature a green solid started to deposit, volatiles were evaporated under reduced pressure, and the resulting solid was washed with $2 \times 10\text{ mL}$ of diethyl ether to afford **[{2BBCu(μ -F)}₂](BF₄)₂ in 82% yield (186 mg). Mp. 188–190 °C; IR (KBr): 3417, 3132, 3054, 2934, 2902, 2862, 1613, 1518, 1490, 1457, 1411, 1358, 1330, 1295, 1259, 1237, 1182, 1149, 1123, 1091, 1028, 1007, 931, 862, 829, 763, 563, 505, 435. ESI MS: m/z 396 **[2BBCu]⁺**. UV–Vis (methanol): 245 (14530), 272 (15730), 279 (15490), 720 (255), 952 (123). Anal. Calc. for $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{B}_2\text{Cu}_2\text{F}_{10}\text{N}_{10}$ **[{2BBCu(μ -F)}₂](BF₄)₂·2H₂O (%): C, 46.12; H, 4.84; N, 13.45. Found: C, 45.97; H, 4.34; N 13.29%.****

[2BBCuCl₂]: **2BB** (150 mg, 0.45 mmol) in 10 mL methanol was added $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (77 mg, 0.45 mmol), Yield 78% (164 mg). Mp. 198–200 °C; IR (KBr): 3180, 3056, 2929, 2884, 1612, 1495, 1456, 1413, 1361, 1329, 1292, 1237, 1193, 1152, 1127, 1095, 1029, 1008, 976, 932, 861, 828,761, 567, 505, 438. FAB MS: m/z 396 **[2BBCu]⁺**. UV–Vis (methanol): 245 (39900), 272 (43450), 279 (43340), 723 (157), 960 (124). Anal. Calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{CuN}_5$ **[2BBCuCl₂]** (%): C, 51.34; H, 4.95; N, 14.97. Found: C, 50.92; H, 4.55; N 14.61.

[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂: **2BB** (150 mg, 0.45 mmol) in 10 mL methanol was added $\text{Cu}(\text{OTf})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (201 g, 0.45 mmol), Yield 97% (319 mg). Mp. 198–200 °C; IR (KBr): 3356, 3241, 2953, 1640, 1617, 1500, 1459, 1415, 1331,1283, 1229, 1153, 1088, 1027, 976, 935, 859, 750, 632, 571, 514, 436. FAB MS: m/z 545 **[2BBCu(OTf)]⁺**, 396 **[2BBCu]⁺**. UV–Vis (methanol): 247 (50,500), 272 (55,940), 279 (55,280), 722 (82), 966 (62). Anal. Calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{CuF}_6\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2$ **[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂** (%): C, 36.59; H, 3.63; N, 9.70. Found: C, 37.14; H, 4.04; N 9.76%.

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 the solid state and in frozen acetonitrile or acetonitrile/dichloromethane solutions. The external measurement of the static magnetic field was made with a precision gaussmeter Jeol ES-FCS. Spectral acquisition, manipulations, and simulations were performed using the program *ESPRIT-382*, v1.916.

2.4. X-ray crystallography

Selected crystallographic data are presented in Table 1. Single crystals were mounted on a Bruker SMART diffractometer equipped with an Apex CCD area detector. Frames were collected by omega scans, and integrated with the Bruker SAINT software package using the appropriate unit cell [16]. The structures were solved using the SHELXS-97 program [17], and refined by full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-97 [18]. 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 and 0.98 Å for aromatic and saturated 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.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization

The general method for the preparation of cupric **2BB** complexes involves the reaction with the appropriate Cu^{2+} salt in equimolar amounts in refluxing methanol (Scheme 2). Isolation of microcrystalline products in the reactions with $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and $\text{Cu}(\text{OTf})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ allowed spectroscopic characterization of the corresponding complexes. IR spectra evidence the presence of the benzimidazole groups due to the C=N stretching band around 1615 cm^{-1} , while the broad peak around 3100 cm^{-1} corresponds to the N–H stretch of the secondary amine in coordinated **2BB**. Additional characterization was carried out either by Electrospray Ionization (ESI) or Fast Atom Bombardment (FAB) mass spectrometry. For the green complex obtained from the reaction between **2BB** and $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, namely **[{2BBCu(μ -F)}₂](BF₄)₂, ESI MS was the only technique available due to its low solubility in common organic solvents; aqueous solutions revealed the presence of a peak at m/z 396 assigned to the reduced species **[2BBCu]⁺**, a common occurrence when benzimidazole-containing chelating ligands are employed [11]. In contrast, both products of the reactions between **2BB** and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ or $\text{Cu}(\text{OTf})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, consisting of green (**2BBCuCl₂**) and blue (**[2BBCu(H₂O)₂](OTf)₂**) microcrystals, respectively, are soluble in a variety of organic solvents. These include ethanol, methanol, and acetonitrile, thus making them amenable for FAB MS analysis: in the former case, the peak at m/z 396 consistent with the reduced species **[2BBCu]⁺** was also observed; in the latter case a peak at m/z 545 was detected, which was assigned to the cationic cupric complex **[2BBCu(OTf)]⁺**.**

Further characterization by X-band Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy was undertaken both in the solid state and in solution. The poorly soluble samples of **[{2BBCu(μ -F)}₂](BF₄)₂ were analyzed initially in the solid state, since**

Table 1
Summary of crystallographic data.

	$[(2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2)(\text{BF}_4)_2]$	$2\text{BBCuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$
Formula	$\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{B}_2\text{Cu}_2\text{F}_{10}\text{N}_{10}$	$\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{Cl}_4\text{Cu}_2\text{N}_{10}\text{O}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{CuF}_6\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$
Molecular weight	1005.57	951.75	731.14
Crystal system	monoclinic	orthorhombic	monoclinic
Space group	$P2_1/n$	$Pnma$	$P2_1/n$
a (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal color	green	green	blue
T (K)	298(2)	298(2)	298(2)
Crystal dimensions (mm)	$0.42 \times 0.16 \times 0.16$	$0.40 \times 0.18 \times 0.10$	$0.40 \times 0.29 \times 0.15$
a (Å)	12.3882(12)	9.2032(6)	8.6590(10)
b (Å)	8.3300(8)	16.9362(12)	25.8626(3)
c (Å)	20.405(2)	14.0998(10)	13.1389(10)
α (°)	90	90	90
β (°)	102.368(2)	90	95.4710(10)
γ (°)	90	90	90
V (Å ³)	2056.8(3)	2197.7(3)	2927.93(5)
hkl ranges	$-14 \leq h \leq 14$ $-10 \leq k \leq 10$ $-24 \leq l \leq 24$	$-11 \leq h \leq 11$ $-20 \leq k \leq 20$ $-16 \leq l \leq 17$	$-10 \leq h \leq 10$ $-31 \leq k \leq 27$ $-15 \leq l \leq 15$
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1.624	1.438	1.659
Z	2	2	4
$R(000)$	1028	980	1492
μ (mm ⁻¹)	1.125	1.255	0.981
θ range (°)	1.77–25.40	1.88–25.36	2.22–25.36
Absorption correction	empirical	empirical	empirical
$T_{\text{max}}, T_{\text{min}}$	0.8595, 0.6533	0.9150, 0.7625	0.9016, 0.8038
Refinement method	full-matrix least-squares on F^2	full-matrix least-squares on F^2	full-matrix least-squares on F^2
Independent reflections	3757	2080	5342
Data/restraints/parameters	3757/115/322	2080/2/143	5342/63/437
Goodness-of-fit (GOF) on F^2	1.025	1.048	1.053
R	0.0407	0.0439	0.0395
R_w	0.1089	0.1067	0.1033
Largest difference in peak, hole (e Å ⁻³)	0.389, -0.239	0.791, -0.206	0.473, -0.405



Scheme 2. Synthesis of Cu^{2+} complexes.

aqueous solutions did not provide an adequate signal. The solid samples gave rise to extremely complex signals even at 77 K, which we tentatively attribute to magnetic interactions between paramagnetic Cu^{2+} centers, consistent with a dimeric species that likely has additional magnetic coupling to the $S = 1/2$ ^{19}F bridging anions (see below); however poorly resolved, the axial signal observed in methanolic solution at 77 K is characteristic of isolated Cu^{2+} centers in a distorted square pyramidal environment (Fig. 1a). In contrast, the EPR spectra of either solid state or frozen acetonitrile solutions of 2BBCuCl_2 and $[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ are characterized by virtually identical axial signals consistent with isolated Cu^{2+} centers in trigonal bipyramidal coordination environments ($g_{\perp} > g_{\parallel}$, d_{z^2} ground state), based on the g values determined: $g_{\parallel} = 2.021$ and $g_{\perp} = 2.157$ (Fig. 1b); the resolution of the spectra did not allow us to determine hyperfine coupling constants. The active sites of AA10 and AA11 have been described as possessing mononuclear Cu^{2+} centers in a distorted axial environment with significant $d_{x^2-y^2}$ SOMO character based on their EPR spectra [13b,c]. While the spectra of 2BBCuCl_2 and $[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ differ from those determined for the metalloenzymes, the presence of the more strongly coordination fluoride in $[(2\text{BBCu}$

$(\mu\text{-F})_2](\text{BF}_4)_2$ appears to favor a square pyramidal geometry in solution that more closely resembles the EPR features of AA10 and AA11.

3.2. Solid-state structures

In order to unambiguously establish the identity of all cupric complexes, their solid-state structures were determined by X-ray crystallography (Table 1). Single crystals of $[(2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2)(\text{BF}_4)_2]$ were obtained by slow evaporation of a concentrated aqueous solution over a period of two weeks in the monoclinic space group $P2_1/n$. The dimeric nature of $[(2\text{BBCu}(\mu\text{-F})_2)(\text{BF}_4)_2]$ was thus confirmed, accounting for its low solubility (Fig. 1). The dicopper structure is bridged by fluoride ligands, likely arising from the tetrafluoroborate counterions in the original Cu^{2+} salt. The BF_4 anion is disordered over two positions with occupational factors of 0.58 and 0.42; the hydrogen atom of the central amine was located in the difference Fourier map, and it was refined with a restrained distance of 0.90 Å. **2BB** acts as a tridentate ligand defining a T-shape around the copper centers, similar to the N_3 donor set provided by the proteins in the active site of several PMOs. The benzimidazole N-donors are in *trans* positions relative to each other, and *cis* relative to the central amine. A first inspection of the overall coordination geometry around the Cu1 ions reveals that it is close to a square pyramid (Fig. 2). Determination of the degree of deviation from an ideal square pyramidal geometry involves the angles between *trans* ligands in the basal plane, defined as α and β , to calculate a value of $\tau = 0.08$ ($\tau = 0$ for an idealized square pyramid, $\tau = 1$ for a trigonal bipyramid) [19]. Curiously, the secondary amine N13 and F5 *trans* donors lie slightly above the basal plane (Fig. 3), whereas in most cases all basal donors are located below such plane. This results in an alternate description for the coordination geometry around the Cu^{2+} ions as capped distorted tetrahedra [20].

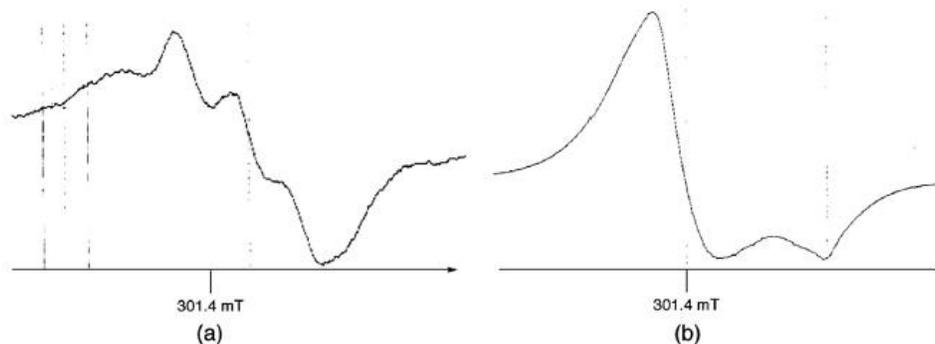


Fig. 1. EPR spectra of (a) $[(2BBCu(\mu-F))_2](BF_4)_2$ in methanol and (b) $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ in acetonitrile solution.

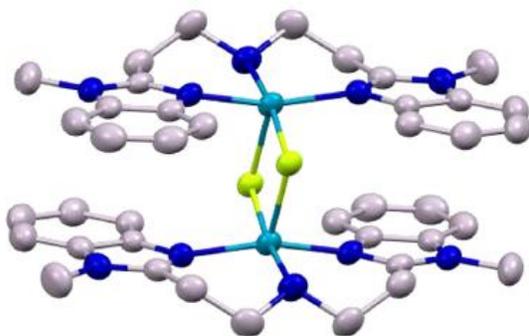


Fig. 2. Mercury diagram of $[(2BBCu(\mu-F))_2](BF_4)_2$ at the 50% probability level; hydrogen atoms and tetrafluoroborate anions are omitted for clarity. Color code: turquoise, copper; gray, carbon; blue, nitrogen; lemon, fluorine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

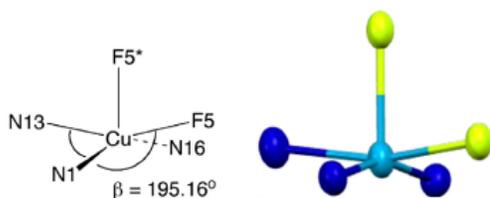


Fig. 3. Schematic representation of the coordination geometry around the Cu centers in $[(2BBCu(\mu-F))_2](BF_4)_2$.

X-ray quality crystals of $2BBCuCl_2$ and $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ were obtained from concentrated methanolic solutions, in the former case as green prisms in the orthorhombic space group $Pnma$, and in the latter as blue crystals in the monoclinic space group $P2_1/n$. The former complex consists of a mononuclear species with a disordered molecule of H_2O in the unit cell; the latter sits at a special position, and was refined over with occupancy factors of 0.52 and 0.48 (Fig. 4). As established in frozen solution by EPR spectroscopy, the Cu^{2+} ion is in a trigonal bipyramidal coordination environment with the benzimidazole N-donors in the apical positions at a $N1-Cu-N1'$ angle of $175.44(16)^\circ$, and the central amine and both chlorides defining the trigonal plane, with angles ranging from 105° to 138° (Table 2). Overall, the coordination geometry

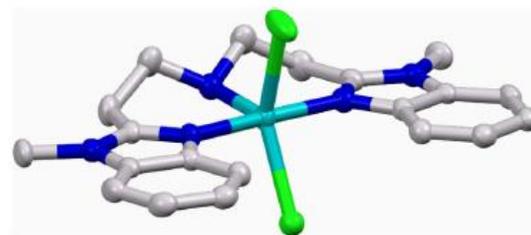


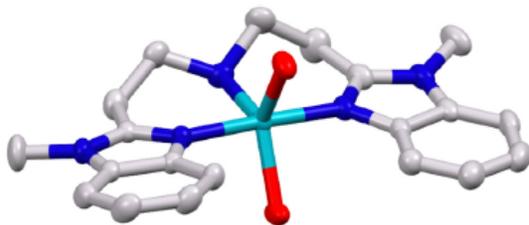
Fig. 4. Mercury diagram of $2BBCuCl_2$ at the 50% probability level; hydrogen atoms and a molecule of H_2O are omitted for clarity. Color code: green, chlorine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

around the cupric ion in the triflate analogue is very similar, but the chloride ligands are replaced by water molecules due to the weakly coordinating nature of the counteranions in the structure of $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ (Fig. 5). The CH_2NH fragment of the central amine is disordered over two positions, which were modeled with 62% and 48% occupancies. O- and N-bound hydrogen atoms were located in the Fourier map, and they were refined with restrained distances of 0.85 and 0.90 Å, respectively. The $N1-Cu-N11$ angles between the apical benzimidazolic donors is $175.54(9)^\circ$, while the bond angles around the trigonal plane defined by O7, O8, and N2 vary from 117° to 123° (Table 2).

In the solid state structures determined for all cupric complexes with 2BB, the Cu–N bond lengths to the benzimidazole donors remain relatively constant, with an average value of 1.99 Å, although the shortest in the series correspond to 1.958(2) Å in $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ due to electrostatic considerations; the average Cu–N distance to the central amine is 2.11 Å. Despite the fact that the coordination geometry in $2BBCuCl_2$ and $[2BBCu(H_2O)_2](OTf)_2$ is trigonal bipyramidal, and not tetragonal as described for the active sites of AA9–AA11 [13], the T-shape geometry imposed by the 2BB ligand is very similar in terms of the metric parameters. The average Cu–N bond length to the histidine imidazoles is 2.0 Å, and the Cu–N bond length to the primary amine is 2.3 Å in the AA9–AA11 enzymes; the corresponding *trans* angle between the imidazole nitrogen atoms and the copper centers is close to 165° , while the angles between the *cis* N(imidazole)–Cu–N(amine) donors are around 97° . In the 2BB– Cu^{2+} complexes, these angles average 170° and 92° . Moreover, the same tricoordinate mode is observed even in the reduced form of AA10 [13b], with virtually identical Cu–N distances of 2.0 and 2.3 Å for the imidazole and amine nitrogen atoms, respectively. Previous reports on the studies

Table 2Selected bond distances (Å) and angles (°) for $[(2\text{BBCu}(\mu\text{-F}))_2](\text{BF}_4)_2$, 2BBCuCl_2 , and $[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$.

$[(2\text{BBCu}(\mu\text{-F}))_2](\text{BF}_4)_2$			
Cu–F5	1.889(2)	F5–Cu–F5*	82.48(8)
Cu–F5*	2.225(2)	F5–Cu–N1	90.18(9)
Cu–N1	2.012(3)	F5–Cu–N13	164.85(12)
Cu–N13	2.048(3)	F5–Cu–N16	89.50(9)
Cu–N16	2.013(3)	F5*–Cu–N1	102.28(9)
		F5*–Cu–N13	82.39(11)
		F5*–Cu–N16	97.34(10)
		N1–Cu–N13	92.50(12)
		N1–Cu–N16	160.17(12)
		N13–Cu–N16	92.98(12)
		Cu–F5–Cu*	97.52(8)
2BBCuCl_2			
Cu1–Cl1	2.438(2)	Cl1–Cu1–Cl2	137.94(6)
Cu1–Cl2	2.369(1)	Cl1–Cu1–N1	89.03(8)
Cu1–N1	1.973(3)	Cl1–Cu1–N1*	89.03(8)
Cu1–N1*	1.973(3)	Cl1–Cu1–N2	104.70(13)
Cu1–N2	2.132(4)	Cl2–Cu1–N1	89.34(8)
		Cl2–Cu1–N1*	89.34(8)
		Cl2–Cu1–N2	117.36(12)
		N1–Cu1–N1*	175.44(16)
		N1–Cu1–N2	92.24(8)
		N1*–Cu1–N2	92.24(8)
$[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$			
Cu1–O7	2.163(2)	O7–Cu1–O8	120.25(11)
Cu1–O8	2.068(2)	O7–Cu1–N1	89.27(8)
Cu1–N1	1.958(2)	O7–Cu1–N2	116.57(17)
Cu1–N2	2.152(5)	O7–Cu1–N11	88.50(8)
Cu1–N11	1.958(2)	O8–Cu1–N1	90.09(9)
		O8–Cu1–N2	123.16(18)
		O8–Cu1–N11	87.70(9)
		N1–Cu1–N2	91.74(12)
		N1–Cu1–N11	175.54(9)
		N2–Cu1–N11	92.71(12)

* Symmetry-related fluoride ligand, symmetry code: $-x, -y, -z$.**Fig. 5.** Mercury diagram of $[2\text{BBCu}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OTf})_2$ at the 50% probability level; hydrogen, minor-occupancy atoms, and triflate anions are omitted for clarity. Color code: red, oxygen. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of related bis(benzimidazole)amine–cuprous complexes required for O_2 binding and subsequent oxygenase activity tests were hampered by the low solubility in dichloromethane of the corresponding complexes with tetrafluoroborate and hexafluorophosphate as counterions [21]. However, an initial reactivity test between **2BB** and $[\text{Cu}(\text{NCCCH}_3)_4]\text{OTf}$ in acetonitrile resulted in soluble species amenable for reactivity studies with dioxygen, which we will examine in due course.

4. Conclusions

The bis(benzimidazole)amine ligand **2BB** provides Cu^{2+} ions a coordination environment similar to that of the active sites of copper-dependent PMOs, including the N-methylated nature of the heterocyclic benzimidazole donors. The spectroscopic

characterization of the cupric complexes demonstrates that the **2BB** ligand platform supports monomeric species in solution, which may be reduced with relative ease as indirectly evidenced by the detection of the $[2\text{BBCu}]^+$ cuprous species. In the solid state, **2BB** gives rise to either bi- or monometallic complexes, depending on the identity of the counteranions. In either case, a T-shape arrangement of the N_3 donor set is retained, structurally emulating the coordination environment in the active site of the AA9–AA11 families of PMOs provided by the histidine brace and an additional histidine imidazole. We are currently exploring the structure and reactivity of both cupric and cuprous complexes of **2BB**, and will report the results of our investigations in forthcoming work.

Acknowledgment

The authors thank Simón Hernández-Ortega for crystallographic work, Carmen Márquez and Luis Velasco for mass spectrometry measurements, María de la Paz Orta for combustion analysis, Rocío Patiño for IR determinations, Virginia Gómez-Vidales for EPR spectroscopy, CONACYT (Proyecto 151837, Beca 293842) and DGAPA-PAPIIT (IN210214) for financial support.

Appendix A. Supplementary material

CCDC 999331–999333 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2014.06.027>.

References

- [1] (a) L.M. Mirica, X. Ottenwaelder, T.D.P. Stack, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1013; (b) E.A. Lewis, W.B. Tolman, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1047; (c) R.A. Himes, K.D. Karlin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 119.
- [2] (a) C. Mealli, C.S. Arcus, J.L. Wilkinson, T.J. Marks, J.A. Ibers, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 711; (b) M.R. Malachowski, H.B. Huynh, L.J. Tomlinson, R.S. Kelly, J.W. Furbee Jr., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1995) 31; (c) Z. Chen, N. Karasek, D.C. Craig, S.B. Colbran, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 3445.
- [3] (a) K.D. Karlin, S. Kaderli, A.D. Zuberbühler, *Acc. Chem. Res.* 30 (1997) 139; (b) S. Itoh, S. Fukuzumi, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 592.
- [4] (a) J.A. Halfern, S. Mahapatra, E.C. Wilkinson, S. Kaderli, V.G. Young Jr., L. Que Jr., A.D. Zuberbühler, W.B. Tolman, *Science* 271 (1996) 1397; (b) S. Schindler, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2000) 2311.
- [5] D.J. Rabiger, M.M. Jolliffe, *J. Org. Chem.* 29 (1964) 476.
- [6] B. Ölköseven, I. Kizilcikli, A. Tavman, B. Akkurt, *Rev. Inorg. Chem.* 21 (2001) 369.
- [7] N.C. Li, B.E. Doody, J.M. White, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 5859.
- [8] (a) L.K. Thompson, B. Ramaswamy, R.D. Dawe, *Can. J. Chem.* 56 (1978) 1311; (b) A.W. Addison, H.M.J. Hendriks, J. Reedijk, L.K. Thompson, *Inorg. Chem.* 20 (1981) 103; (c) R. Balamurugan, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 2246; (d) M. Vaidyanathan, R. Balamurugan, U. Sivagnanam, M. Palaniandavar, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2001) 3498; (e) R. Loganathan, S. Ramakrishnan, E. Suresh, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 5512.
- [9] (a) L. Casella, M. Gullotti, R. Radelli, P. Di Gennaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1991) 1611; (b) L. Casella, E. Monzani, M. Gullotti, D. Cavagnino, G. Cerina, L. Santagostini, *R. Ugo, Inorg. Chem.* 35 (1996) 7516; (c) I. Garcia-Bosch, A. Company, J.R. Frisch, M. Torrent-Sucarrat, M. Cardellach, I. Gamba, M. Güell, L. Casella, L. Que Jr., X. Ribas, J.M. Luis, M. Costas, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 2406.
- [10] (a) A. Majumdar, U.-P. Apfel, Y. Jiang, P. Moëne-Loccoz, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 167; (b) J.R. Frisch, R. McDonnell, E.V. Rybak-Akimova, L. Que Jr., *Inorg. Chem.* 52 (2013) 2627; (c) M.A.H. Moelands, S. Nijse, E. Folkertsma, B. de Bruin, M. Lutz, A.L. Spek, R.J.M. Klein, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 7394; (d) W.-W. Yang, Y.-W. Zhong, S. Yoshikawa, J.-Y. Shao, S. Masaoka, K. Sakai, J. Yao, M. Haga, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 890; (e) M.S. Seo, N.H. Kim, K.-B. Cho, J.E. So, S.K. Park, M. Clémancey, R. Garcia-

- Serres, J.-M. Latour, S. Shaik, W. Nam, Chem. Sci. 2 (2011) 1039;
(f) D. Saha, S. Das, D. Maity, S. Dutta, S. Baitalik, Inorg. Chem. 50 (2011) 46.
- [11] (a) 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;
(b) I. Castillo, V.M. Ugalde-Saldivar, L.A. Rodríguez Solano, B.N. Sánchez Eguía, E. Zeglio, E. Nordlander, Dalton Trans. 41 (2012) 9394;
P.R. Martínez-Alanis, B.N. Sánchez, Chem. Eur. J. 19 (2013) 6067.
- [12] (a) C.M. Phillips, W.T. Beason IV, J.H. Cate, M.A. Marletta, ACS Chem. Biol. 6 (2011) 1399;
(b) W.T. Beason, C.M. Phillips, J.H.D. Cate, M.A. Marletta, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 890.
- [13] (a) R.J. Quinlan, M.D. Sweeney, L.L. Leggio, H. Otten, J.-C.N. Poulsen, K.S. Johansen, K.B.R.M. Krogh, C.I. Jorgensen, M. Tovborg, A. Anthonsen, T. Tryfona, C.P. Walter, P. Dupree, F. Xu, G.J. Davies, P.H. Walton, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 (2011) 15079;
(b) G.R. Hemsworth, E.J. Taylor, R.Q. Kim, R.C. Gregory, S.J. Lewis, J.P. Turkenburg, A. Parkin, G.J. Davies, P.H. Walton, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 6069;
(c) G.R. Hemsworth, B. Henrissat, G.J. Davies, P.H. Walton, Chem. Biol. 10 (2014) 122.
- [14] (a) R.L. Lieberman, A.C. Rosenzweig, Nature 434 (2005) 177;
(b) R. Balasubramanian, S.M. Smith, S. Rawat, L.A. Yatsunyk, T.L. Stemmler, Nature 465 (2010) 115.
- [15] L. Casella, E. Monzani, M. Gullotti, F. Gliubich, L. De Gioia, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1994) 3203.
- [16] Bruker AXS, *SMT Software Reference Manual v. 6.23C*, Madison, 2002.
- [17] G.M. Sheldrick, *SHELXS-97*, Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Germany, 1990.
- [18] G.M. Sheldrick, *SHELXL-97*, Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [19] A.W. Addison, T.N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G.C. Verschoor, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1984) 1349.
- [20] C. Lee, C. Mellot-Draznieks, B. Slater, G. Wu, W.T.A. Harrison, C.N.R. Rao, A.K. Cheetham, Chem. Commun. (2006) 2687.
- [21] T.N. Sorrell, M.L. Garrity, Inorg. Chem. 30 (1991) 210.

Bibliografia

- [1] R. J. P. Williams, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1–25.
- [2] Messerschmidt, R. Huber, T. Parlos, K. Weighardt Handbook of Metalloproteins, vols. I and II, J. Wiley, New York, 2001.
- [3] A. Messerschmidt, W. Bode, M. Cyglar Handbook of Metalloproteins, vol. III, J. Wiley, New York, 2004.
- [4] R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* 96(1996), 2239– 2314.
- [5] J.J.R. Frausto da Silva, R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Oxford University Press, New York, 2001.
- [6] R.R. Crichton, J.L. Pierre, *Biometals.* 14 (2001) 99–112.
- [7] M.A. Saito, D.M. Sigman, F.M.M. Morel, *Inorg. Chim. Acta.* 356 (2003) 308–318.
- [8] J. T. Rubino, K. J. Franz, *J. Inorg. Biochem.* 107 (2012) 129–143.
- [9] J.S. Griffith, L.E. Orgel, *Q. Rev. Chem. Soc.* 11 (1957) 381–393.
- [10] A.F. Holleman, E. Wiberg, *Inorganic Chemistry*, 34th Ed., Academic Press 2001.
- [11] R. R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry, A New Introduction to Molecular Structure and Function*, 2nd Ed., Elsevier 2012.
- [12] R.K. Szilagy, E.I. Solomon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 (2002) 250–258.

- [13]** W. Kaim, B. Schwederski. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life, An Introduction and Guide*. John Wiley & Sons. 1st Ed. US, 1994.
- [14]** I. Bertini, H. Gray, S. Lippard and J. Valentine. *Bioinorganic Chemistry*. 1st Ed. University Science Books. US, 1994.
- [15]** M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. J. Que, *Chem. Rev.* 104 (2004) 939-986.
- [16]** W. Nam, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 465-465.
- [17]** K. Ray, F.F. Pfaff, B. Wang, and W. Nam, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 13942-13958.
- [18]** J.J. Warren, T.A. Tronic, J.M. Mayer, *Chem. Rev.* 110 (2010) 6961-7001.
- [19]** M.C.Y. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11(2007) 677-684.
- [20]** W.T. Beeson, V.V. Vu, E.A. Span, C.M. Phillips, M.A. Marletta, *Annu. Rev. Biochem.* 84 (2015) 923-946.
- [21]** C.M. Phillips, W.T. Beeson IV, J.H. Cate, M.A. Marletta, *ACS Chem. Biol.* 6 (2011) 1399-1406.
- [22]** W.T. Beeson, C.M. Phillips, J.H.D. Cate, M.A. Marletta, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 890-892.
- [23]** R.J. Quinlan, M.D. Sweeney, L.L. Leggio, H. Otten, J.-C.N. Poulsen, K.S. Johansen, K.B.R.M. Krogh, C.I. Jorgensen, M. Tovborg, A. Anthonsen, T. Tryfona, C.P. Walter, P. Dupree, F. Xu, G.J. Davies, P.H. Walton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011) 15079-15084.

- [24]** G.R. Hemsworth, E.J. Taylor, R.Q. Kim, R.C. Gregory, S.J. Lewis, J.P. Turkenburg, A. Parkin, G.J. Davies, P.H. Walton, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 6069-6077.
- [25]** G.R. Hemsworth, B. Henrissat, G.J. Davies, P.H. Walton, *Chem. Biol.* 10 (2014) 122-126.
- [26]** C. R. Cantor, P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry. Part 1, The Conformation of Biological Macromolecules*, W.H. Freeman & Co., New York, 1980.
- [27]** J. A. Fee, W. D. Phillips, *Biochim. Biophys. Acta.* 412(1975) 26-38.
- [28]** K.D. Karlin, Y. Gultneh, *Prog. Inorg.Chem.* 35 (1987) 219-327.
- [29]** Z. Tyeklar, K.D. Karlin, *Acc. Chem. Res.* 22(1989) 241-248.
- [30]** T.N. Sorell, *Tetrahedron.* 45(1989) 3-68.
- [31]** L.M. Mirica, X. Ottenwaelder, T.D.P. Stack. *Chem. Rev.* 104 (2004)1013-1045.
- [32]** E.A. Lewis, W.B. Tolman, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1047-1076.
- [33]** R.A. Himes, K.D. Karlin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 119-131.
- [34]** C. Mealli, C.S. Arcus, J.L. Wilkinson, T.J. Marks, J.A. Ibers, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 711-718.
- [35]** M.R. Malachowski, H.B. Huynh, L.J. Tomlinson, R.S. Kelly, J.W. Furbee Jr, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1995) 31-36.
- [36]** Z. Chen, N. Karasek, D.C. Craig, S.B. Colbran, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 3445-3452.

- [37] K.D. Karlin, S. Kaderli, A.D. Zuberbühler, *Acc. Chem. Res.* 30 (1997) 139-147.
- [38] S. Itoh, S. Fukuzumi, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 592-600.
- [39] J.A. Halfern, S. Mahapatra, E.C. Wilkinson, S. Kaderli, V.G. Young Jr., L. Que Jr., A.D. Zuberbühler, W.B. Tolman, *Science*. 271 (1996) 1397-1400.
- [40] S. Schindler, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2000) 2311-2326.
- [41] D.J. Rabiger, M.M. Joullié, *J. Org. Chem.* 29 (1964) 476-482.
- [42] B. Ülküseven, I. Kizilcikli, A. Tavman, B. Akkurt, *Rev. Inorg. Chem.* 21 (2001) 369-379.
- [43] N.C. Li, B.E. Doody, J.M. White, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 5859.
- [44] L.K. Thompson, B. Ramaswamy, R.D. Dawe, *Can. J. Chem.* 56 (1978) 1311-1318.
- [45] A.W. Addison, H.M.J. Hendriks, J. Reedijk, L.K. Thompson, *Inorg. Chem.* 20 (1981) 103-110.
- [46] R. Balamurugan, M. Palaniandavar. *Inorg. Chem.* 40 (2001) 2246-2255.
- [47] M. Vaidyanathan, R. Balamurugan, U. Sivagnanam, M. Palaniandavar, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2001) 3498-3506.
- [48] R. Loganathan, S. Ramakrishnan, E. Suresh, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 5512-5532.
- [49] L. Casella, M. Gullotti, R. Radelli, P. Di Gennaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1991) 1611-1612.
- [50] L. Casella, E. Monzani, M. Gullotti, D. Cavagnino, G. Cerina, L. Santagostini, R. Ugo, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 7516-7525.

- [51]** I. Garcia-Bosch, A. Company, J.R. Frisch, M. Torrent-Sucarrat, M. Cardellach, I. Gamba, M. Güell, L. Casella, L. Que Jr., X. Ribas, J.M. Luis, M. Costas, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 2406-2409.
- [52]** A. Majumdar, U.-P. Apfel, Y. Jiang, P. Moënné-Loccoz, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 167-181.
- [53]** J.R. Frisch, R. McDonnell, E.V. Rybak-Akimova, L.Jr. Que, *Inorg Chem.* 52 (2013) 2627-2636.
- [54]** M.A.H. Moelands, S. Nijse, E. Folkertsma, B. de Bruin, M. Lutz, A.L. Spek, R.J.M. Klein, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 7394-7410.
- [55]** W.-W. Yang, Y.-W. Zhong, S. Yoshikawa, J.-Y. Shao, S. Masaoka, K. Sakai, J. Yao, M. Haga, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 890-899.
- [56]** M.S. Seo, N.H. Kim, K.-B. Cho, J.E. So, S.K. Park, M. Clémancey, R. Garcia-Serres, J.-M. Latour, S. Shaik, W. Nam, *Chem. Sci.* 2 (2011) 1039-1045.
- [57]** D. Saha, S. Das, D. Maity, S. Dutta, S. Baitalik. *Inorg. Chem.* 50 (2011) 46-61.
- [58]** 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.
- [59]** I. Castillo, V.M. Ugalde-Saldívar, L.A. Rodríguez Solano, B.N. Sánchez Eguía, E. Zeglio, E. Nordlander, *Dalton Trans.* 41 (2012) 9394-9404.
- [60]** P.R. Martínez-Alanis, B.N. Sánchez, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 6067-6079.
- [61]** R.L. Lieberman, A.C. Rosenzweig, *Nature.* 434 (2005) 177-182.

- [62]** R. Balasubramanian, S.M. Smith, S. Rawat, L.A. Yatsunyk, T.L. Stemmler, *Nature*. 465 (2010) 115-119.
- [63]** A.W. Addison, T.N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G.C. Verschoor, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1 (1984) 1349-1356.
- [64]** C. Lee, C. Mellot-Draznieks, B. Slater, G. Wu, W.T.A. Harrison, C.N.R. Rao, A.K. Cheetham, *Chem. Commun.* 25 (2006) 2687-2689.
- [65]** I. Castillo, A.C. Neira, E. Nordlander, E. Zeglio, *Inorg. Chim. Acta*. 422 (2014) 152157.
- [66]** T.N. Sorrell, M.L. Garrity, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 210. Bruker AXS, saint Software Reference Manual v. 6.23C, Madison, 2002.
- [67]** Bruker AXS, SAINT Software Reference Manual v.6.23C, Madison, 2002.
- [68]** G.M. Sheldrick, SHELXS-97, Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Germany, 1990.
- [69]** G.M. Sheldrick, SHELXL-97, Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.